



**PROJET DE FIN D'ETUDES**

**Licence en Sciences & Techniques :**  
**Sciences Biologiques appliquées et Santé**

**Validation statistique du dosage  
des Phénothiazines par  
spectrophotométrie UV-Visible.**

**Présenté par :** Manouri Mohammed Amine

**Encadré par :**

Pr.Khabbal Youssef : CHU Hassan II-Fès

Pr.Sefrioui Samira : Professeur à La FST de Fès

**Soutenu le :** 17 /06 /15

Devant le jury composé de :

Pr Sefrioui Samira

Pr Sqalli Hakima

Pr Khabbal Youssef

Année Universitaire : 2014-2015



# *Remerciements*

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes sincères remerciements et mon profond respect aux Professeurs, **Sefrioui Samira** et **Khabbal Youssef** pour leur encadrement continu, leur disponibilité et pour leurs conseils précieux tout au long de la réalisation de ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde admiration.

Aux membres de jury, qui m'ont honoré en acceptant de juger ce travail, qu'ils me permettent de leur exprimer ma profonde gratitude et mes remerciements les plus vifs.

J'adresse mes remerciements aux enseignants de la filière des Sciences Biologiques Appliquées et Santé pour leur contribution à notre formation.

Enfin, que toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail trouve ici l'expression de notre sincère gratitude.



---

## **Présentation du lieu de stage**

### **CHU HASSAN II-FES**

Le secteur de la santé connaît une nouvelle dynamique avec l'ouverture récente du CHU Hassan II à Fès. En effet, cet établissement public couvre les besoins d'une population estimée à plus de 3 millions d'habitants issus des régions de Fès Boulemane, Meknès-Tafilalet et Taza-Al Hoceima-Taounate. Ce centre est l'une des plus grandes infrastructures médicales réalisées au Maroc depuis l'indépendance.

### **Historique de CHU Hassan II**

Date de création : 30 Août 2001

Date de mise en service : 05 Août 2002

Date de départ au travail : 01 Septembre 2008

### **Les missions**

- Dispenser des soins médicaux;
- Conduire des travaux de recherche médicale dans le strict respect de l'intégrité physique et morale et de la dignité des malades;
- Participer à l'enseignement clinique universitaire et postuniversitaire médical et pharmaceutique ainsi qu'à la formation du personnel paramédical.

### **Organisation**

Le Centre Hospitalier Hassan II de Fès est constitué d'une direction et des formations hospitalières composés de :

- Hôpital des spécialités,
- Hôpital mère et enfant,
- Hôpital d'oncologie et de médecine nucléaire,
- Hôpital OMAR DRISSI,
- Hôpital IBN AL HASSAN.



---

## Liste des abréviations

UV	: Ultra-violet.
CHU	: Centre Hospitalier Universitaire.
HPLC	: Chromatographie en Phase Liquide à haute Performance.
ISO	: Organisation internationale de normalisation.
D2	: Récepteurs Dopaminergiques de types 2.
H1	: Récepteurs Histaminergiques de type 1.
CEE	: Comité d'Etude Européenne.
DO	: Densité optique.
LD	: Limite de détection.
Nm	: Nanomètre.
LQ	: Limite de quantification.
DDL	: Degré de liberté.
SCE	: La somme des carrés des écarts
CM	: le carré moyen



## Sommaire

<b>Introduction</b> .....	3
<b>I- Les phénothiazines</b> .....	4
1- Définition.....	4
2- Utilisation.....	4
3- Structure chimique.....	4
4- Pharmacocinétique des phénothiazines.....	5
a- Absorption.....	5
b- Distribution.....	5
c- Métabolisme.....	5
d- Elimination.....	5
5- Pharmacodynamie des phénothiazines.....	6
6-La chlorpromazine (Largactil).....	6
a- Indications thérapeutiques.....	6
b- En cas de surdosage.....	7
c- Les effets secondaires possibles de la chlorpromazine.....	7
<b>II- Validation statistique</b> .....	7
1- Le processus de la validation d'une méthode d'analyse.....	7
a- Définition.....	8
b- Types de validation.....	8
2- Performances statistiques d'une méthode de mesure basée sur la courbe d'étalonnage.....	9
a- La sensibilité.....	9
b- La linéarité.....	9
c- Limite de détection, Limite de quantification.....	9
d- La fidélité.....	9
e- La répétabilité.....	10
<b>III- Principe de la spectrophotométrie</b> .....	10
1-Loi de Beer-Lambert.....	11
2- Les spectres dans l'UV / visible.....	12
<b>IV- Matériel et méthodes</b> .....	13
1- Appareillage.....	14
2- Matrice.....	14
3- Principe.....	14



---

4- Réactifs.....	14
5- Matériel.....	15
6-Méthode.....	15
<b>V- Résultats.....</b>	<b>17</b>
1-Recherche de la longueur d'onde d'absorption.....	18
2-Droite d'étalonnage.....	18
3-Vérification de la linéarité.....	18
4-Vérification de la fidélité.....	19
a- Test de Crubs.....	21
b- Test de Cochran.....	21
5- Répétabilité et reproductibilité de la méthode.....	22
a- Test d'ANOVA-1.....	22
b- Limite de répétabilité.....	23
c- Fidélité intermédiaire.....	23
d- Limite de reproductibilité.....	23
6-Vérification de la justesse.....	24
<b>Conclusion.....</b>	<b>25</b>
<b>Bibliographie et Webographie.....</b>	<b>26</b>



---

## **Introduction**

Les phénothiazines est une famille médicamenteuse connue principalement pour ses propriétés neuroleptiques, indiquée pour le traitement des psychoses dont la plus représentative est la schizophrénie.

Ainsi, à dose thérapeutique, les phénothiazines présentent de puissantes actions sédatives et antipsychotiques, avec réduction de la tension émotionnelle, de l'agitation, de l'agressivité et des productions délirantes.

Le traitement par ces médicaments présente souvent une efficacité thérapeutique. Des effets indésirables sont observés notamment l'hépatotoxicité. Ces effets sont souvent liés aux doses administrées non adaptées de ces médicaments. Le suivi thérapeutique par le dosage de médicaments permet d'ajuster la posologie à chaque patient pour mieux optimiser le traitement et minimiser le risque d'effet indésirable.

Le dosage des phénothiazines qui s'inscrit dans le cadre du suivi thérapeutique adapté par laboratoire du Centre Hospitalier Hassan-II est réalisé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et spectrophotométrie.

L'objectif de ce travail, est le dosage des phénothiazines pour le suivi thérapeutique afin d'offrir aux cliniciens un outil pratique pour améliorer l'efficacité du traitement. Ce projet porte essentiellement sur la validation du dosage des phénothiazines par spectrophotométrie. Ce rapport s'articule sur deux axes :

- Une partie théorique introduisant les techniques de dosage des phénothiazines.
- Une partie expérimentale qui traitera de la validation du dosage des phénothiazines.



# Synthèse bibliographique

## I- Les phénothiazines [1]

Ce sont des médicaments qui appartiennent à la première classe des neuroleptiques.

### 1- Définition

La phénothiazine est un composé chimique qui a donné son nom à la classe pharmacologique des phénothiazines, c'est un agent insecticide et anthelminthique synthétisé initialement en 1883 à partir du bleu de méthylène.

### 2- Utilisation

La Phénothiazine est utilisée dans la fabrication de colorants, dans la synthèse des médicaments antipsychotiques, comme inhibiteur de polymérisation, et comme antioxydant. Il est utilisé en tant que pesticide pour lutter contre les insectes et est employé dans la médecine vétérinaire.

### 3- Structure chimique

Ces composés possèdent une structure tricyclique (figure 1) correspondant à la fusion d'un cycle thiazine -1,4 avec deux cycles benzéniques. Deux substituants se greffent sur cette structure de base :

- ✓ R1 : une chaîne azotée, l'amine latérale étant toujours séparée par trois carbones de l'azote intranucléaire.
- ✓ R2 : détermine la sous-classe de la substance, elle peut être :

**Aliphatiques** : propriétés sédatives et neurovégétatives, qui comportent la chlorpromazine (Largactil), la Lévomépromazine (Nozinan).

**Pipéridines** : effets incisifs et neurologique puissants, sont représentées par la Thiopropérazine (*Majeptil*).

**Pipérazine** : exercent des effets antipsychotiques réducteurs. Sont la Thioridazine (*Melleril*), la Propéclazine (*Neuleptil*).

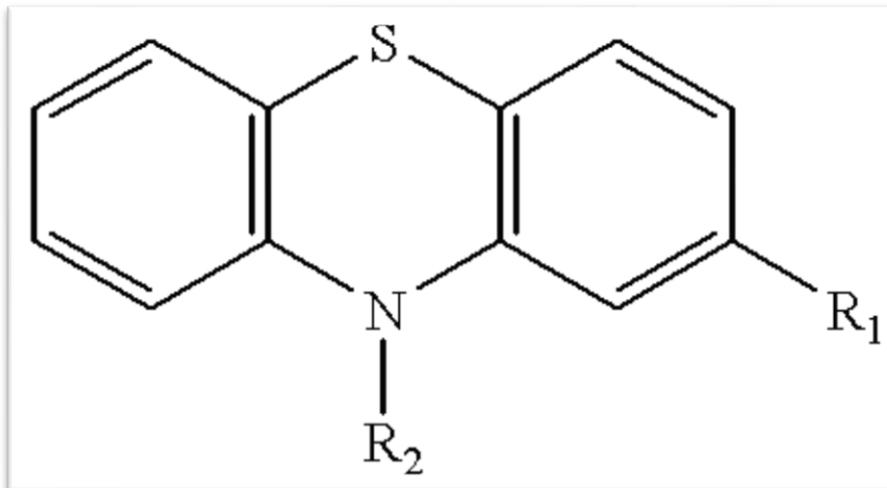


Figure 1 : Structure chimique des phénothiazines [2]

#### 4- Pharmacocinétique des phénothiazines

##### a- Absorption

Les phénothiazines administrées par voie orale sont bien absorbées par l'intestin grêle. Après l'administration orale d'une dose unique, les concentrations plasmatiques maximales moyennes sont atteintes au bout de 3 à 5 heures.

##### b- Distribution

Les phénothiazines sont bien distribuées dans les tissus corporels et se fixent à haut degré aux protéines plasmatique (90% - 95%).

##### c- Métabolisme

Les phénothiazines sont bien métabolisées dans une large mesure au premier passage, ceci se traduisant en générale par de faibles concentrations plasmatiques du principe actif inchangé. Le processus métabolique varie fortement d'un patient à l'autre et un grand nombre de métabolites peut être mis en évidence.

##### d- Elimination :

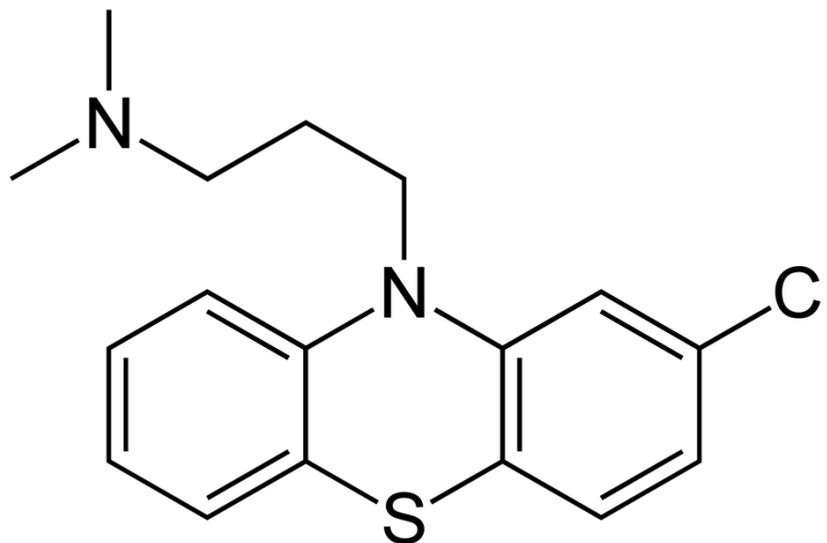
La demi-vie d'élimination est de 2 à 35 heures. Environ 33% du principe actif administré est éliminé dans les urines sous forme de 26-30 métabolites. La quantité restante du principe actif est excrétée par voie fécale.

## 5- Pharmacodynamie des phénothiazines

Les phénothiazines sont des antagonistes, plus ou moins puissants, des récepteurs dopaminergiques D2, histaminergiques H1, cholinergiques muscariniques et adrénergiques.

## 6-La chlorpromazine (Largactil)

La chlorpromazine (figure2) appartient à la classe des médicaments appelés phénothiazines. Elle s'utilise pour soigner la manie (état des troubles bipolaires) et les troubles psychotiques comme la schizophrénie.



**FIGURE 2 : Structure chimique de la Chlorpromazine. [3]**

### a- Indications thérapeutiques

La chlorpromazine est un médicament qui agit sur les neurotransmetteurs sécrétés dans le cerveau.

L'indication première de la chlorpromazine est d'induire le calme, de réduire l'agitation et l'anxiété surtout lorsque celles-ci sont associées à un état psychotique (la schizophrénie par exemple), mais aussi dans d'autres états d'hyperactivité chez l'adulte. Elle est également utilisée pour traiter les nausées, les vomissements, l'anxiété avant une chirurgie, le hoquet chronique, la porphyrie aiguë intermittente et les symptômes du tétanos.



## **b- En cas de surdosage**

**Les symptômes du surdosage** induit des effets secondaires tolérables à savoir : la bouche sèche, la constipation, le ballonnement ou des crampes d'estomac, la fièvre, la raideur musculaire, les mouvements musculaires saccadés, les modifications du rythme cardiaque, la somnolence extrême et l'évanouissement.

## **c- Les effets secondaires possibles de la chlorpromazine :**

La chlorpromazine présente des effets secondaires moins tolérés, ils ressemblent généralement aux signes d'une réaction allergique comme l'urticaire, difficulté à respirer et gonflement du visage.

- Contractions ou mouvements incontrôlables des yeux, des lèvres, de la langue, du visage, du bras ou des jambes;
- tremblements incontrôlables, bave, difficulté à avaler, problèmes d'équilibre ou de marche;
- sensation d'agitation et de nervosité ;
- nausées et douleurs d'estomac, éruption cutanée et jaunisse ;
- pâleur de la peau, ecchymoses ou saignements, fièvre, maux de gorge, symptômes de grippe;
- une forte fièvre, une raideur des muscles, une confusion, une transpiration, une tachycardie, une respiration rapide;
- pathologies ophtalmologiques : diminution de la vision, yeux larmoyants, sensibilité accrue à la lumière;
- 

## **II-Validation statistique**

### **1- Le processus de la validation d'une méthode d'analyse**

Opération permettant d'assurer qu'un résultat a été obtenu dans des conditions techniques satisfaisantes et que celui-ci est compatible avec le dossier biologique du patient. Cette validation est à la fois analytique et biologique.



La validation analytique comporte la vérification de la conformité des conditions d'exécution aux procédures et tient compte notamment des résultats obtenus avec les échantillons de contrôle.

Elle a pour principal objectif : s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, comptes tenus du but de l'analyse. [4]

## **a- Définition**

### **La méthode d'analyse**

Permet de réaliser une analyse, par description détaillée des différentes opérations nécessaires pour effectuer l'analyse de la substance à examiner. [5]

### **Validation**

C'est l'application déterminée avec un objectif clairement déterminé. Selon la norme *ISO 17025* ; la validation c'est la confirmation par examen et fourniture des preuves réelles que les exigences particulières d'un usage projeté donné sont remplies. [6]

### **La Validation d'une méthode [7]**

C'est la procédure par laquelle on démontre, preuves expérimentales à l'appui, que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée.

### **b- Types de validation [8]**

Il existe plusieurs degrés de validation suivant la nature de la méthode, ce à quoi elle est destinée et le domaine concerné:

- Méthode de contrôle en routine, utilisée sur plusieurs sites, contexte réglementaire fort : validation approfondie.
- Méthode utilisée ponctuellement dans un seul laboratoire, contexte réglementaire faible : validation rapide.

Dans le cadre d'une méthode déterminée, il n'est pas forcément nécessaire d'évaluer toutes les performances, on détermine quelques paramètres :



La sensibilité.  
La linéarité.  
La fidélité.  
La limite de détection.  
La limite de quantification.

## **2- Performances statistiques d'une méthode de mesure basée sur la courbe d'étalonnage.**

### **a- La sensibilité**

La sensibilité est l'aptitude de la méthode à détecter de petites variations de concentration. Elle est représentée par la pente de la courbe d'étalonnage.

### **b- La linéarité**

La linéarité d'une méthode de mesure ou d'une procédure d'analyse est, selon le Comité d'Etude Européenne (CEE) III/844/87, sa capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle, d'obtenir des résultats de mesure directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance de l'échantillon analysé.

### **c- Limite de détection, Limite de quantification**

#### **➤ La limite de détection (LD)**

C'est la plus faible concentration de l'analyte détectée, mais pas nécessairement à doser, à l'aide d'une méthode spécifique dans des conditions expérimentales imposées.

#### **➤ La limite de quantification (LQ)**

C'est la concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie.

### **d- La fidélité**

Selon l'ISO 3534-1, l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'essai obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises dans des conditions déterminées. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de répétabilité ou de reproductibilité pour une méthode.

### e- La répétabilité

La répétabilité est l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'analyse indépendants entre eux obtenus avec la méthode considérée sur un même échantillon, dans le même laboratoire, avec le même opérateur utilisant le même matériel, dans un court intervalle de temps.

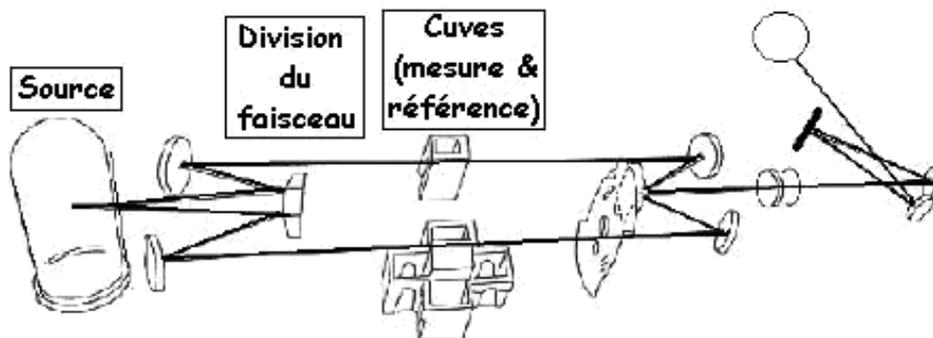
## III-Principe de la spectrophotométrie

Un certain nombre de méthodes quantitatives décrites font appel à la spectrophotométrie dans l'Ultra-Violet (UV : 200-400 nm) ou le Visible (400-800 nm).

Le spectrophotomètre peut être à simple faisceau ou à double faisceau.

Dans un instrument à simple faisceau, le rayonnement provenant de la source lumineuse passe dans un monochromateur puis traverse la cuve contenant l'échantillon avant d'atteindre le détecteur.

Dans un instrument à double faisceau (figure 3), le rayonnement lumineux sortant du monochromateur passe par un dispositif qui le divise en deux faisceaux, dont l'un traverse la cuve contenant l'échantillon et l'autre traverse la deuxième cuve contenant la substance de référence, avant d'atteindre le détecteur. [9]



**Figure 3 : Schéma d'un spectrophotomètre à double faisceau. [10]**

Le faisceau issu de la source est envoyé vers un monochromateur puis vers un rupteur qui envoie alternativement le faisceau vers la cuve de référence puis vers la cuve

contenant l'échantillon.

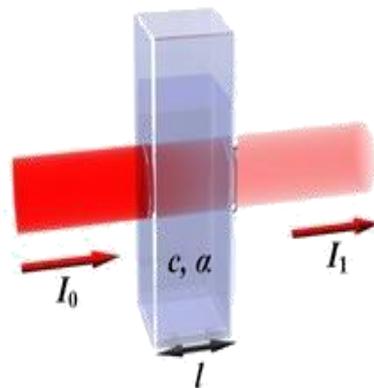
Un système de miroir permet d'envoyer ces deux faisceaux vers le même capteur qui reçoit donc alternativement le faisceau de puissance de référence et le faisceau de puissance transmis par l'échantillon.

Le signal du capteur est alors traité par un microprocesseur qui permet d'afficher la transmittance ou l'absorbance.

## 1-Loi de Beer-Lambert [9]

En spectrophotométrie (figure 4), la relation entre l'intensité lumineuse à l'entrée et à la sortie de la cuve est régie par la loi de Beer-Lambert qui s'énonce ainsi : la fraction de l'énergie lumineuse absorbée par une solution constituée d'un soluté absorbant dissous dans un solvant transparent est proportionnelle au nombre de molécules de soluté traversées par le rayon lumineux, ce qui se traduit par la formule :

$$\text{Log} (I_0 / I) = \alpha .c. l$$



**Figure 4 : Schéma de la relation entre l'intensité lumineuse à l'entrée et à la sortie de la cuve.**

Où :

$I_0$  : est l'intensité lumineuse incidente,



I : est l'intensité lumineuse transmise,  
c : est la concentration du soluté (g/l),  
l : est la longueur du trajet optique (cm),  
 $\alpha$  : est l'absorptivité du système.

Le constant  $\alpha$  est une propriété fondamentale du soluté, mais elle dépend aussi de la température, de la longueur d'onde et du solvant. Le terme  $\text{Log} \frac{I_0}{I}$  est appelé absorbance (A); à condition que la solution soit suffisamment diluée, l'absorbance est directement proportionnelle à la fois à la concentration du soluté et à la longueur du trajet optique. Elle était autrefois appelée densité optique (DO) ou coefficient d'extinction (E).

## 2- Les spectres dans l'UV / visible

Les spectres dans l'UV-Visible donnent la transmittance ou l'absorbance de l'échantillon analysé en fonction de la longueur d'onde du rayonnement ou parfois du nombre d'onde, son inverse la transmittance notée T est donnée par :

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Où  $I_0$  est l'intensité incidente et I l'intensité transmise. L'absorbance est définie par :

$$A = -\log T$$

Cette dernière grandeur est très utile en analyse quantitative par application de la loi de Beer-Lambert. Plus un composé est absorbant plus la transmittance est faible et plus l'absorbance est élevée. [11]



# Matériel

# et

# méthodes

## 1- Appareillage

Durant mon stage, nous avons utilisé les appareils suivants :

-Spectrophotomètre UV –Visible (Jasco-V-530), (Figure 5).



**Figure 5 : Photo du spectrophotomètre (Jasco-V530)**

-Vortex.

-Agitateur.

## 2- Matrice

urines et liquide gastrique

## 3- Principe

après extraction en milieu alcalin, la phase aqueuse acide colorée et soumise à l'analyse spectrophotométrique à 527 nm.

## 4- Réactifs

-Etalon le Largactil 5mg/ml.

-Dichlorométhane.

-Solution de quinhydrone  $10^{-3}$  M dans le Dichlorométhane.

-Solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 40% (40 g pour 100 ml).

-Acide orthophosphorique (d=1.71).



## 5- Matériel

- Tube à essai de 20 ml.
- Pipette de 5 ml.
- L'ampoule à décantation.
- Centrifugeuse.

## 6-Méthode

L'extraction a été faite dans des ampoules à décanter. Le protocole expérimental est décrit dans le tableau 1 et la figure 6.

**Tableau 1 : Protocole expérimental de la préparation de la gamme d'étalonnage**

	Urine	Dichlorométhane	NAOH	Largartil
Blanc	25ml	25ml	1ml	0ml
T <sub>1</sub>	25ml	25ml	1ml	15ml
T <sub>2</sub>	25ml	25ml	1ml	30ml
T <sub>3</sub>	25ml	25ml	1ml	45ml
T <sub>4</sub>	25ml	25ml	1ml	60ml
T <sub>5</sub>	25ml	25ml	1ml	90ml

La courbe d'étalonnage sera faite par les paramètres des tubes Blanc, 1, 2, 3,4 et 5.

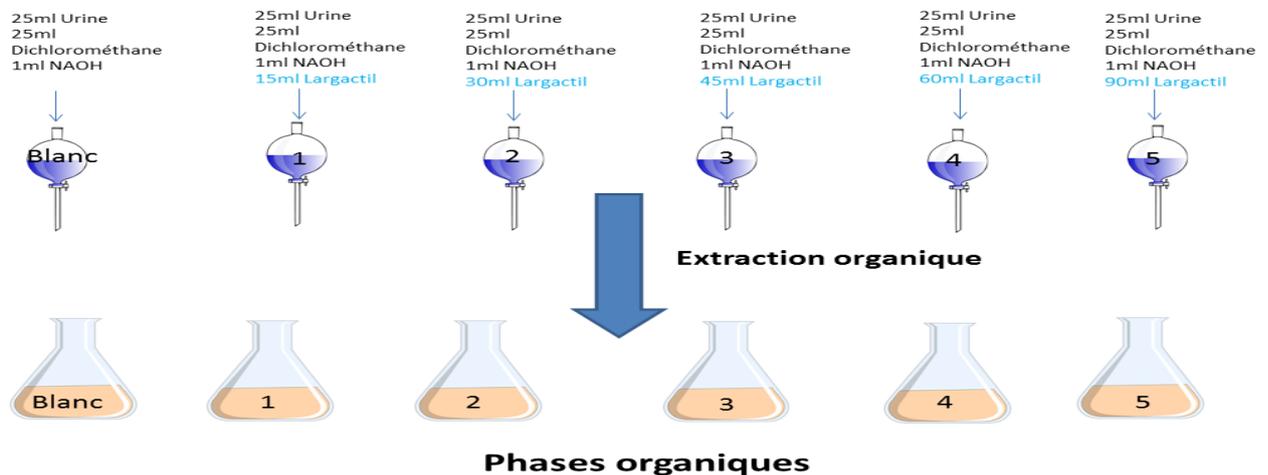
- Agiter pendant 10 min.
- Après décantation, centrifuger à grande vitesse la phase organique.
- Eliminer par aspiration la totalité de la couche aqueuse surnageante.
- Traiter la solution inconnue (échantillon) de la même manière que la solution standard.

### **Réaction à mettre dans l'ampoule à décantation :**

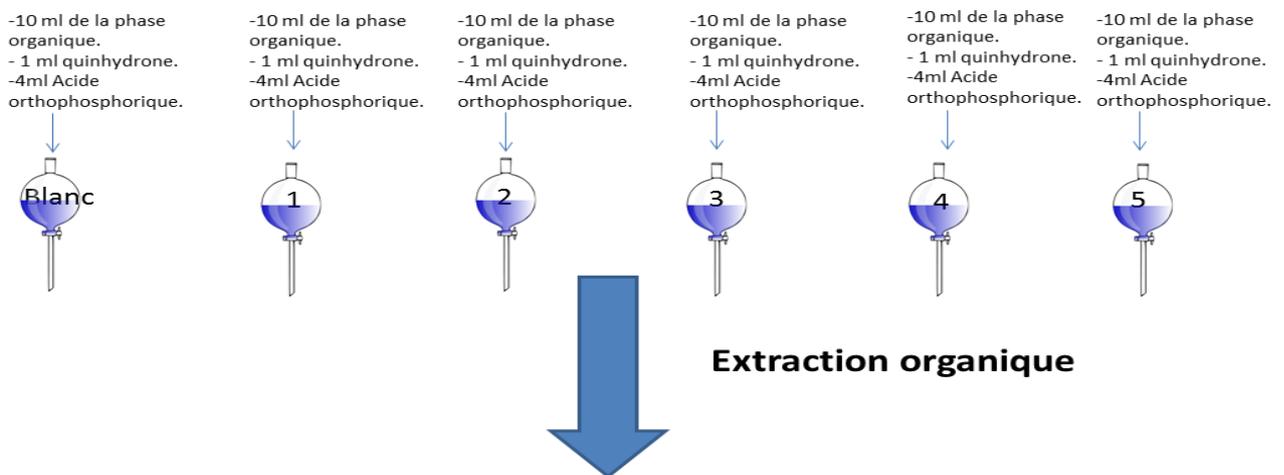
- Extractum organique 10 ml.
- Solution 10<sup>-3</sup> M de quinhydrone 1 ml.

- Acide orthophosphorique (d=1.71) 4 ml.
- Agiter pendant une minute.
- Après décantation, la plus grande partie de la phase organique supérieure est éliminée et le liquide restant est centrifugé.
- Après élimination du solvant surnageant, la phase aqueuse acide colorée est soumise à l'analyse spectrophotométrique.
- Mesurer l'absorbance à 527 nm de tous les tubes.
- Tracer la courbe d'étalonnage et en déduire la concentration des phénothiazines dans l'échantillon.

### Préparation des phases organiques



### Préparation des solutions étalons en phase aqueuse



**5 Solutions étalons de concentration croissante .**

**FIGURE 6 :Mode opératoire.**



# Résultats



## 1- Recherche de la longueur d'onde d'absorption

Pour rechercher l'absorption de la chlorpromazine, on est obligé de se placer à une absorbance maximale afin d'obtenir la plus grande précision du dosage. Pour cette molécule, le maximum d'absorption a été trouvé à 527nm.

## 2- Droite d'étalonnage

On prépare une gamme d'étalon, série de solutions contenant le soluté à étudier à des concentrations décroissantes.

En se plaçant ensuite à  $\lambda_{\max}$  on fait le zéro et on relève l'absorbance mesurée pour chaque solution.

## 3-Vérification de la linéarité

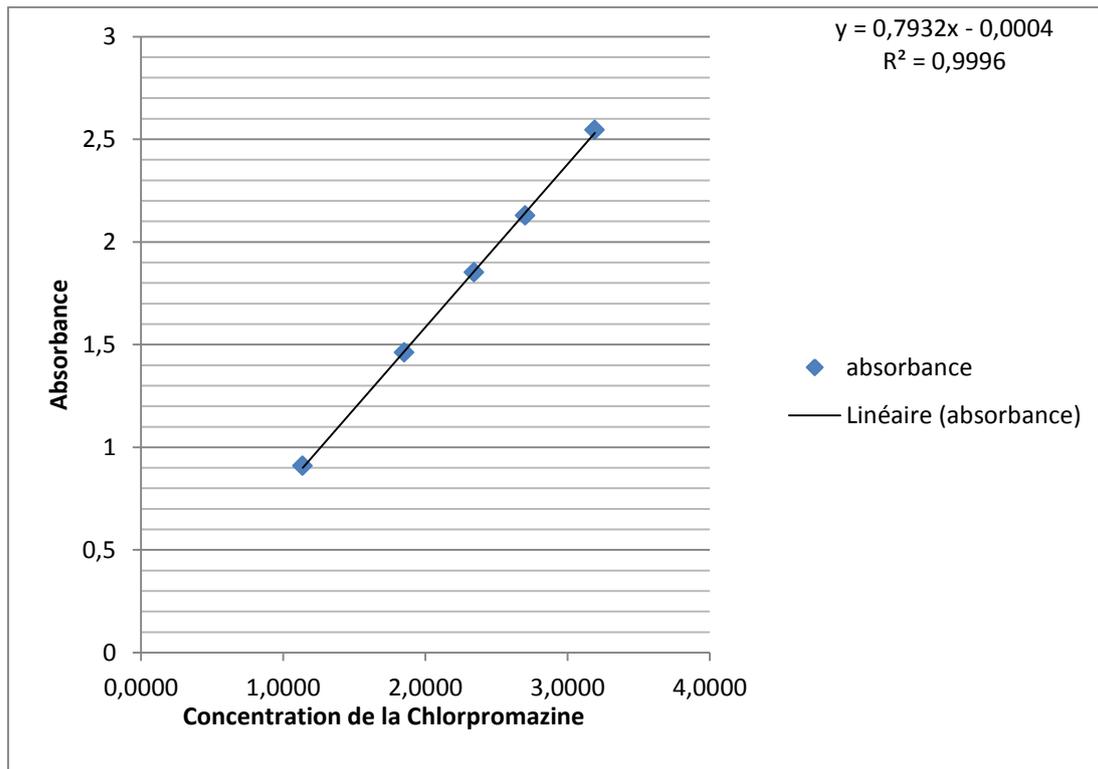
Pour vérifier la linéarité de la courbe d'étalonnage, il est recommandé de préparer au minimum 5 niveaux de concentration.

À l'aide du spectromètre (JASCO 530), nous avons mesuré les absorbances des solutions préparées. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 2 :

**Tableau 2 : Préparations des étalons.**

Tube	Concentration en (mg/ml)	absorbance
T1	1,1363	0,9102
T2	1,8520	1,462
T3	2,3428	1,8532
T4	2,7027	2,1301
T5	3,1914	2,546

Nous avons tracé ensuite la courbe d'étalonnage (Figure7).



**FIGURE 7 : Courbe d'étalonnage de la chlorpromazine.**

#### ✓ Interprétation

D'après la (figure 6), on constate clairement que le coefficient de détermination est supérieur à 0,995. Cela explique que la droite d'étalonnage est linéaire.

#### **4-Vérification de la fidélité**

Pour vérifier la fidélité, on doit appliquer plusieurs tests statistiques, dans notre cas, on a effectué 6 mesures pendant 4 jours en série et le tableau 3 représente les résultats obtenus:



**Tableau 3 : Mesures d absorbances**

	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4
Abs 1	0,9098	0,9291	0,9196	0,9087
Abs 2	0,9198	0,9121	0,9051	0,9063
Abs 3	0,9177	0,9256	0,9074	0,9032
Abs 4	0,9089	0,9203	0,9047	0,9021
Abs 5	0,9041	0,9291	0,9156	0,9168
Abs 6	0,9032	0,9162	0,9154	0,9011
Moyenne	0,9106	0,9221	0,9113	0,9064
Moyenne générale	0,9126			
Variance	0,00005	0,00005	0,00004	0,00003
Ecart type	0,0069	0,0070	0,0063	0,0058
Ecart type général	0,0065			

**Tableau 4 : Test de vérification de la normalité :**

Différences	Statistique calculée
$d_1 = x_n - x_1$ $d_2 = x_{n-1} - x_2$ $d_3 = x_{n-2} - x_3$ $d_i = x_{n-1+i} - x_i$	$W_{obs} = \frac{\sum_{j=1}^{j=p} a_j d_j^2}{\sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2}$
$\bar{x}$ : Moyenne des mesures $a_j$ : coefficient lus sur la table des coefficients pour n données. On choisit un risque ( $\alpha=5\%$ ) et on lu dans la table de Shapiro et Wilk la valeur de $W(\alpha, n)$ .	

**Règle de décision**

Si  $W_{obs} > W(\alpha, n)$ : on accepte l'hypothèse  $H_0$ .  
 Si  $W_{obs} < W(\alpha, n)$ : on rejette l'hypothèse de  $H_0$

**Tableau 5 : Test sur la normalité des Résultats**

Différences $d_j$	Coefficient $a_j$	Statistique calculée
$d_1=0,6872$	$a_1=0,0157$	$W_{obs}=0,886638369$
$d_2=0,1677$	$a_2=0,0007$	

Pour un risque  $\alpha=5\%$  et  $n=4$  ;  $W_{crit}=0.748$



Wobs>Wcrit : Donc on accepte l'hypothèse H0

✓ Vérification des valeurs aberrantes :

On a vérifié l'existence des valeurs aberrantes avec le test de Grubbs

### a- Test de Crubs

Test utilisé pour vérifier si la petite valeur ou la grande valeur est aberrante, on calcule les deux rapports suivants :

$$G_a = \frac{X_n - \bar{X}}{s}$$

$$G_b = \frac{\bar{X} - X_1}{s}$$

#### Règle de décision

Si l'un des rapports est supérieur à la valeur lue dans la table au risque  $\alpha$ , la valeur correspondante est considérée comme aberrante.

Dans le (tableau 6) on détermine les valeurs max et min des moyennes et de la totalité des mesures après on calcule les 2 statistiques Ga et Gb et on compare ces derniers avec les valeurs trié de la table de Grubbs

**Tableau 6 : Test des valeurs aberrantes**

Test des moyennes		Gobs		Gcrit (5%, 4)
Max	0,9221	Ga	Gb	1.46
Min	0,9064	1,4544	0,9523	
Test des valeurs suspectes		Gobs		Gcrit (5%, 4)
Max	0,9291	Ga	Gb	2.64
Min	0,9011	2,5326	1,7597	

⇒ On constate que les 2 rapports calculés sont inférieurs à Gcrit lue dans le tableau de Grubbs avec un risque  $\alpha$  de 5% donc la moyenne MAX et MIN et la valeur suspectes maximale et minimale ne sont pas aberrantes.

### b- Test de Cochran

Ce test est appelé Test d'homogénéité de variance, dans ce test on va calculer la somme des variances, on détermine le max des variances et on calcule leur rapport.



**- Test de Cochran**

Test de comparaison des variances : permet de détecter la variance aberrante ou suspecte.  
 La statistique calculée est

$$C_{obs} = \frac{S_{max}^2}{\sum_{j=1}^p S_j^2}$$

$H_0$  : les écarts types sont du même ordre de grandeur

$H_1$  : le maximum des écarts types est significativement plus grand que les autres.

On compare la valeur de  $C_{obs}$  et  $C_{crit}$  lue dans la table de Cochran pour un risque  $\alpha$  pour un nombre de répétitions (n) et pour (p) opérateur.

**Règle de décision**

Si  $C_{obs} < C_{crit}$  : les variances sont de même ordre de grandeur.

Si  $C_{obs} > C_{crit}$  : la variance maximum est significativement plus grande que les autres.

$C_{obs} = 0,290213175$

Pour un risque  $\alpha=5\%$ ,  $n=6$  et  $p=4$ ,  $C_{crit}=0.59$

Interprétation :

Du fait que  $C_{obs} < C_{crit}$  : On accepte l'hypothèse  $H_0$ .

$H_0$  : les variances sont homogènes, les écarts types observé de même ordre de grandeur

**5- Répétabilité et reproductibilité de la méthode**

**a- Test d'ANOVA-1**

Pour la vérification de la répétabilité et la reproductibilité de la méthode de référence on utilise le test de l'ANOVA-1: Son objectif principal est de tester l'hypothèse selon laquelle les moyennes de plusieurs ( $k$ ) groupes indépendants de distributions normales sont égales. Pour chaque source de variation On détermine le degré de liberté (ddl) après on calcule la somme des carrés des écarts (SCE) et le carré moyen (CM) puis on calcule le coefficient de Fisher (F) et la P-value comme c'est indiqué dans le (tableau 7) :

**Tableau 7 : Méthode d'ANOVA**

Source	ddl	SCE	Variance (CM)	F	P-value
Inter	3	0,00053691	0,00017897	4,184E+00	3,10
Intra	20	0,00085555	4,2778E-05		
Total	23				

- Le coefficient de Fisher est égal au Carré moyen (CM) intergroupe sur le carré moyen intragroupe.

- Pour un risque  $\alpha=5\%$ , P-value = loi.F (F,  $v_1=p-1=3$ ,  $v_2=n-p=20$ ) sur Excel



➤ **Interprétation :**

Puisque ( $P\text{-value}=3,10 > \alpha=5\%$ ), l'hypothèse d'égalité des moyennes sera acceptée. On conclura que les données sont compatibles (à ce niveau de risque) avec l'hypothèse d'égalité des moyennes.

**b- Limite de répétabilité**

Après qu'on a vérifié l'égalité des moyennes via l'ANOVA, on va calculer dans le (tableau 8) la limite de répétabilité à partir du Carré Moyen intra-laboratoire :

**Tableau 8 : Variance, Ecart type et la limite de Répétabilité**

Variance ( $S^2r$ )	Ecart type ( $Sr$ )	k ( $\alpha=95\%$ )	Limite de répétabilité
4,2778E-05	0,0234	2	$r=2 \times \sqrt{2} \times Sr = 0,01850$

Interprétation :

On constat que la différence absolue entre deux valeurs successives obtenu par même laboratoire, même méthode, même opérateur est inférieur à ( $r=0,05225$ ). On conclue que la méthode et répétable.

**c- Fidélité intermédiaire**

La fidélité intermédiaire est calculée dans le (tableau 9) à partir des carrés moyens intra et inter-laboratoire via la relation suivantes:

**Tableau 9 : Fidélité intermédiaire**

Relation	Variance ( $S^2L$ )	Ecart type (SL)
$S^2F = CM_F - CM_r/n_i$	$S^2F = 0,00017$	0,01297

**d- Limite de reproductibilité**

Après la détermination de l'écart type de répétabilité et l'écart type de la fidélité intermédiaire on calcule dans le (tableau 10) la limite de reproductibilité de la façon suivante :

**Tableau 10 : Limite de reproductibilité**

Variance ( $S^2R$ )	Ecart-type ( $S_R$ )	k ( $\alpha=95\%$ )	Limite de Reproductibilité
0,00021	$S^2R = SL^2 + S^2r$ $= 0,014527671$	2	$R = 2 \times \sqrt{2} \times SR = 0,041090458$



Interprétation :

Cela signifie que, si on réalise deux mesures par 2 opérateurs différents, on peut s'attendre à avoir des résultats qui diffèrent au plus de 0,0133

On constate que les limites de reproductibilité et de répétabilité calculé est inférieur à celui indiqué par la norme donc la répétabilité et reproductibilité de la méthode sont vérifiées.

## 6-Vérification de la justesse

Après avoir prouvé la fidélité de la méthode on va s'intéresse au test de justesse qui précise que : On effectue 10 mesures des échantillons inter laboratoire de concentration connu puis on calcule la moyenne et l'écart type. Les résultats obtenus sont représentés dans le (tableau 11):

**Tableau 11 : Vérification de la justesse**

	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	Moyenne	Ecart type
<b>Abs</b>	0,0958	0,098	0,095	0,096	0,0973	0,0975	0,0982	0,0954	0,0976	0,0959	0,09686	0,31122

**Tableau 12 : Application du test de Vérification de la justesse**

Valeur vrai	Tobs	Tcrit (t(0.975,9))	Conclusion
0.0975	$Tobs = \frac{ 0.0975 - 0.0968 }{(0.3112/\text{racine}(10))} = 0.0071$	2.262	La méthode est juste

- Pour un risque  $\alpha=5\%$  et ddl = n-1= 9, tcrit = 2,262 ;

Interprétation :

Puisque  $Tobs < Tcrit$  : la différence entre la moyenne des mesures et la valeur Vrai n'est pas significative donc la méthode est juste.

➤ Interprétation :

D'après la validation de la technique, on a constaté que la méthode est fidèle et juste. Ce qui prouve que cette méthode correspond à l'usage pour lequel elle est prévue.



## **Conclusion**

Avec la mise en place des systèmes d'assurance qualité dans les laboratoires, la validation des méthodes d'analyse est aujourd'hui un objectif important.

C'est pour cette raison, que nous nous sommes intéressés dans ce projet de fin d'étude à *la validation des phénothiazines par spectrophotométrie UV-Visible*, ceci dans le but de raccourcir la durée et d'améliorer l'efficacité des traitements de certaines maladies et de réduire leurs coûts.

Ce dosage a pour but également de rendre le traitement plus efficace en diminuant la gravité des effets indésirables de ces médicaments et aussi pour une meilleure adaptation posologique.



---

## Références bibliographiques

- [1] Franck N, Thibaut F, 2005, Pharmacologie et mode d'action des neuroleptiques. EMC (Elsevier SAS, Paris), Psychiatrie, 37-860-B-10.
- [4] Feinberg M, 24 juil. 2009. Labostat – Guide de validation des méthodes d'analyse.
- [5] Feinberg M, 2010, Principes et vocabulaire pour la validation des méthodes.
- [6] Guillaume.J, (22 Mars 2012). Coefficient de corrélation et régression linéaires.
- [7] Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, (9 Juin 2009). Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie.
- [8] Martel R, Latouche F, 1990. Le contrôle statistique de la qualité en milieu hospitalier: un modèle opérationnel.
- [9] Chimie Analytique Instrumentale, Notions De Spectrophotométrie UV-Visible. Laboratoire Chimie Provence, UMR 6264. Universités d'Aix-Marseille I, II et III – CNRS.
- [10] Génie des Procédés", centre SPIN. Méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation. Ecole des Mines de Saint-Etienne.
- [11] Galez P, (2011), Mesures Physiques Annecy – MPh2 SE3 ME3, Techniques spectroscopiques d'analyse / Spectrophotométrie UV/visible.

## Webographie

- [2] <http://fr.wikipedia.org/wiki/Ph%C3%A9nothiazines#/media/File:Phenothiazine.png>
- [3] <http://fr.wikipedia.org/wiki/Chlorpromazine>



**Université Sidi Mohammed Ben Abdellah**  
**Faculté des Sciences et Techniques - FES**  
**Département des sciences de la vie**

---

