الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

----------oOo----------

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

-------oOo----------

ⵜⴰⵙⴷⴰⵡⵉⵜ ⵏ ⵎⵓⵍⵓⴷ ⴰⵜ ⵎⵄⵎⵎⴰⵔ

Université Mouloud MAMMERI
Faculté de Médecine
Département de Pharmacie
TIZI-OUZOU

جامعة مولود معمري
كلية الطب
قسم الصيدلة
تيزي وزو

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES EN VUE DE L'OBTENTION D'UN

DIPLÔME DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présenté et Soutenu publiquement le : **14 juillet 2022**

Thème

Mise au point et validation d'une nouvelle méthode de dosage de la Vancomycine dans le plasma par HPLC

Réalisé par :

M^{elle} Mounine Dehbia
M^{r} Nadji Abdellah
M^{elle} Taleb Chourouk
M^{elle} Bouaziz Tinhinene

Encadrés par :

Dr. BEN SI SAID Hassan

Co-encadrés par :

Dr. CHEKROUN Tassadit

Devant le jury :

Pr. MAMOU Marzouk	**MCAHU-Faculté de médecine UMMTO**	**Président de jury**
Pr. MEKACHER Lamine R	**MCAHU-Faculté de médecine UMMTO**	**Examinateur**
Dr. BEN SI SAID Hassan	**MAHU-Faculté de médecine UMMTO**	**Promoteur**
Dr. BENAMARA Omar	**Assistant en Pharmacologie-CHU Tizi-Ouzou**	**Examinateur**
Dr. CHEKROUN Tassadit	**Résidente-Faculté de médecine UMMTO**	**Co-promotrice**

Année universitaire : 2021/2022

Dédicaces

C'est avec un énorme plaisir et une immense joie que je dédie ce mémoire de fin d'études ;

À mes très chers ***Parents****, tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance et l'admiration que je vous éprouve, vous êtes ma raison de vivre, les piliers de mon existence, ma source de bonheur et mon modèle de vie.*
Ma tendre ***Maman Fatima*** *; mon adorable* ***Papa Belkacem*** *; ce succès est le votre, je vous remercie pour votre amour inconditionnel, votre soutien, vos précieux conseils et pour tous les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction, ma réussite et mon bien-être. Que ce modeste travail soit le fruit de votre éducation, en espérant que vous soyez toujours fiers de moi.*
Puisse Dieu, vous préserver et vous accorder santé, bonheur et longue vie. Je vous aime tellement.

À la mémoire de mes ***Grands Parents*** *maternels et paternels. Puisse DIEU les accueillir dans son infinie miséricorde.*

À tous les membres de ma ***Famille*** *maternels et paternels petits comme grands pour leurs encouragements.*

À toutes mes ***Amies****, particulièrement* ***Massiva et Célyne*** *pour leur gentillesse et leur bienveillance.*

À notre Promoteur, au prodigieux et honorable expert en Chimie Analytique le ***Dr. BEN SI SAID Hassan*** *pour son encadrement exemplaire.*
À tous les membres du laboratoire de Chimie Analytique, notamment au ***Pr MAMOU****, au* ***Dr AKLI,*** *au* ***Dr CHEKROUN*** *ainsi qu'à toute personne ayant participé à la concrétisation de ce travail.*

À tous les ***Enseignants*** *qui m'ont formé tout au long de mon cursus scolaire et universitaire.*

À mes quadrinômes, ***Abdellah, Chourouk*** *et* ***Tinhinéne****, avec qui j'ai partagé cette inoubliable expérience, merci d'avoir donné le meilleur de vous-mêmes, chacun a apporté sa touche personnelle ce qui a fait de se travaille un chef-d'œuvre. Je vous souhaite un avenir prometteur remplit d'exploits.*

À tous ceux qui me sont chers.

Dehbia, Dayéne

Dédicaces

Louange à Dieu tout puissant, qui m'a permis de voir ce jour tant attendu.
C'est avec une immense joie et cœur ému que je dédie ce modeste travail ;

À mon très cher père ***Mohammed****, qui n'a jamais cessé de formuler des pierres à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.*
Grace à toi papa, j'ai appris le sens du travail et de persévérance. Je tiens à honorer l'homme que tu es.
Je voudrais te remercier pour ton amour, ta compréhension et tes sacrifices que tu as déployé pour mon instruction. Ta présence fut une lumière dans tout mon parcours.
Aucune dédicace ne serait exprimée le respect et l'estime que j'ai pour toi.
Je t'aime et j'implore le tout puissant qu'il t'accorde une bonne santé et une longue vie.

À ma chère mère ***Samia****, source de bonté, de motivation et de réconfort.*
Tu as toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour inconditionnelle. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide.
Merci pour tes sincères prières qui m'ont accompagnées.
Rien n'est plus précieux que ton sourire maman.

À ***mes chères sœurs****, Meroua et Dania, vous êtes toutes si brillantes, que Dieux vous protège.*

À ***mon très cher frère Imad****, sa femme Feriel et son petit ange Nael. Je vous souhaite tout le bonheur du monde.*

À la mémoire de ***mon grand-père Rabah****, que Dieu l'accueille dans son vaste paradis.*

À tout ***ma famille paternelle et maternelle****, mes oncles, mes tantes surtout Wassila, mes cousins et mes cousines N, W, Y, B, L.*

À mes collèges de mémoire, ***Dayéne, Tinhinéne*** *et* ***Abdellah****. Merci pour votre entente et votre sympathie. C'était un grand plaisir d'avoir travaillé avec vous. Je vous souhaite plus de succée dans vos vies professionnelles.*

Sans oublier ***mon ami Zakarya****, que je remercie pour son aide et ses conseils.*

À ***mes amies****, Madiha, Wardia, Ikhlas, Hanna et Yasmine.*

Au Dr. BEN SI SAID H et Pr. MAMOU M. J'ai l'honneur de travailler dans votre équipe.

À tous ceux ou celles qui me sont chères et que j'ai oublié de citer.

CHOUROUK

Dédicaces

C'est avec tout l'amour et la tendresse du monde que je dédie ce modeste travail à mes très chers parents, ***Said*** *et* ***Fazia*** *sans qui je ne serai rien et qui ont toujours été là pour moi. Merci de m'avoir tout appris. Merci d'être les personnes que vous êtes, si braves et honnêtes, si bien qu'aujourd'hui je peux dire fièrement que toutes mes valeurs je les tiens de vous, et que tout ce que je suis, je le suis grâce à vous. Merci de m'aimer inconditionnellement. Tous les mots du monde ne suffiraient pas pour vous exprimer mon amour.*

À mes adorables sœurs, ***Sara, Melissa et Lydia,*** *vous êtes mes piliers, toutes si belles et intelligentes, et malgré nos petits différents du quotidien, sachez que vous êtes ma plus grande fierté, que vous me comblez et que vous êtes les meilleures.*

À toute ma famille que j'aime tant, mes oncles, mes tantes, mes cousines et mes cousins, sachez que je n'oublierai jamais votre soutien et vos mots d'encouragements ainsi que les magnifiques moments en famille passés ensemble. Une petite dédicace spéciale aux petites dernières de la famille : Luna et Maelle

À ***Ikram et Dalel****, celles avec qui j'ai passé 6 magnifiques années. Nous avons affronté ce cursus ensemble, nous étions les trois lois de Newton, si différentes mais si complémentaires et surtout inséparables. Je n'aurais pas pu souhaiter mieux. C'est pour nous la fin d'un chapitre mais au début d'une ère. Je vous remercie pour tout.*

À ***Julia, Zineb, Rania et Feriel****, la pharmacie nous a unie, dans ses bons et mauvais moments. Vous avez fait de ce cursus un souvenir mémorable par votre joie de vivre. Je ne risque pas d'oublier nos aventures ; rires et fous rires. Mes chères pharmaciennes, je vous souhaite de briller et d'exceller dans tout ce que vous entreprendrez.*

À ***Oulfa et Naila****, je ne garde de vous que les plus beaux souvenirs. Les murs de la bibliothèque pourront témoigner de tous les bons moments qu'on a vécu ensemble, les tables des restaurants aussi.*

À ***Ines****, je sais aujourd'hui que si tu as toujours eu une vision utopique et atypique, ce n'est pas parce que tu vis loin de la réalité, mais plutôt parce que tu perçois avec ton cœur avant tout. J'aurais énormément appris grâce à toi.*

À ***Nouha*** *bien sûr, qui est avant tout une amie, merci d'avoir toujours pris de ton temps pour m'aider, tu iras loin Dr Loumici.*

À ***Amina, Madiha et Noor****, on dit que le temps change beaucoup de choses, mais une chose est certaine, notre amitié a traversé les années intact.*

À ***Anis*** *mon très cher ami, que je remercie du fond du cœur pour sa gentillesse et sa sagesse. Je te souhaite de trouver la voie qui saura te combler.*

À ***Walaa*** *pour ses encouragements et ses conseils.*

À ***Fatima*** *et* ***Yasmine****, dieu sait que vous avez égayé mon année d'internat, vous êtes toutes les deux de magnifiques personnes. Petit clin d'œil au "soon to be born baby" de Fatima qui aura une maman formidable.*

À Mouna, Ania et Mazilda, vous avez marqué mon court cursus à l'UMMTO à jamais, je vous en remercie.

Au ***Dr Ben Si Said, Pr Mamou, Dr Akli*** *et* ***Dr Chekroun*** *pour l'encadrement et l'aide qu'ils m'ont apporté. J'aspire à devenir comme vous tous un jour.*

À ***Dayéne, Chourouk*** *et* ***Abdellah****, mon groupe de mémoire, sans qui ce travail n'aurait jamais abouti, merci pour la rigueur, le perfectionnisme, et le sérieux dans vous avez fait preuve. Vous êtes une équipe de choc. Je vous souhaite à tous un avenir glorieux.*

Et pour finir, à mes ***petits chats*** *d'amour qui illuminent mes journées.*

Tinhinéne

Dédicaces

C'est avec une profonde affection et une énorme gratitude que je dédie cet humble travail ;

À mes adorables ***Parents****,* ***Khedoudja*** *et* ***Rachid,*** *aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez, vous êtes des parents exemplaires, merci pour vos conseils aimants, vos encouragements constants, votre soutien inconditionnel et pour toutes les valeurs que vous m'avez inculpé. Ma réussite est résultante de tous vos innombrables sacrifices.*
Que Dieu vous protège et vous accorde santé, joie et longue vie.

À ma ***Sœur Hanane*** *; à mes* ***Frères Mohamed*** *et* ***Redouane*** *; merci pour votre humour, votre soutien mental et votre foi en moi. En témoignage de mon affection fraternelle, je vous souhaite un avenir radieux, du bonheur et du succès dans tout ce que vous entreprenez. Que tous vos rêves se réalisent.*

À la mémoire de mes ***Grands Parents*** *paternels. Puisse DIEU les accueillir dans son vaste paradis.*
À mes ***Grands Parents*** *maternels, longue vie à vous.*

À tous les membres de ma ***Famille,*** *petits et grands, pour m'avoir épaulé.*

À tous mes ***Amis,*** *particulièrement* ***MANSOUR NABIL*** *tu es un frère pour moi, je te remercie chaleureusement pour ta présence quotidienne, ton appui continu et ton altruisme.*

Au spécialiste en Chimie Analytique, notre Promoteur l'admirable ***Dr. BEN SI SAID Hassan*** *pour son aide précieuse et ses qualités humaines et scientifiques. Au* ***Pr MAMOU****, au* ***Dr AKLI****, au* ***Dr CHEKROUN*** *ainsi qu'à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

À tous mes ***Enseignants*** *du primaire jusqu'à la fin de mon cursus universitaire.*

À l'ensemble des membres de notre équipe, ***Dayéne, Chourouk*** *et* ***Tinhinéne****, ce fut un plaisir d'avoir mené ce mémoire avec vous, je vous souhaite beaucoup de réussite.*

À tous ceux qui me sont chers.

Abdellah

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier le bon Dieu, tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

À notre promoteur ***Dr. BEN SI SAID Hassan****, maître-assistant en Chimie Analytique. Nous avons pour vous l'estime et l'admiration qu'imposent votre sérieux, votre compétence, votre dynamisme et votre gentillesse sans pareil. En reconnaissance des efforts, du soutien et du temps que vous avez consacré à l'encadrement de notre mémoire, veuillez accepter l'expression de nos sentiments les plus respectueux. Nous espérons avoir été dignes de vos attentes.*

Nous tenons également à remercier chaleureusement,
Pr. MAMOU Marzouk*, maître de conférences en Chimie Analytique, pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury d'évaluation de ce mémoire.*

Pr. MEKACHER LAMINE R*, maître de conférences en Toxicologie et* ***Dr. BENAMARA Omar****, assistant en Pharmacologie****,*** *pour l'intérêt que vous avez porté en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir en y apportant votre expertise et votre critique.*

À notre co-promotrice ***Dr. CHEKROUN Tassadit****, ainsi qu'à tous les membres du laboratoire de Chimie Analytique, qui nous ont été d'une aide précieuse, aussi bien par leur savoir que par leur bienveillance qui ont fait de notre travail une expérience d'apprentissage des plus plaisantes.*

À tout le corps pédagogique, qui nous a formé tout le long de ces 6 ans, et qui a fait que nous sommes aujourd'hui arrivés à la fin de ce cursus.

À tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet de fin d'études. À tous ceux connus ou inconnus qui vont un jour feuilleter ce travail et qui, nous l'espérons, en bénéficieront.

Veuillez trouver ici nos sincères remerciements.

Table des matières

Table des matières……..... …….....i
Liste des abréviations…….……....vi
Liste des tableaux……..……..…….....ix
Liste des figures……..……..…….....xi
Introduction.....……01
Objectif……..04

Partie bibliographique

CHAPITRE I : VANCOMYCINE

1 Généralités sur la Vancomycine.....6
1.1 Structure chimique.....6
1.2 Propriétés physico-chimiques.....7
1.2.1 Propriétés physiques.....7
1.2.2 Propriétés chimiques.....8
1.2.3 Incompatibilités physico-chimiques.....8
1.2.4 Compatibilité physico chimique en solution.....9
1.3 Stabilité et conservation.....9
1.4 Propriétés pharmacologiques.....9
1.4.1 Pharmacocinétique.....9
1.4.1.1 Absorption.....9
1.4.1.2 Distribution.....10
1.4.1.3 Métabolisme.....11
1.4.1.4 Elimination.....11
1.4.2 Pharmacodynamie.....12
1.4.2.1 Mécanisme d'action.....12
1.4.2.2 Mécanisme de résistance.....12
1.4.2.3 Spectre d'action.....13
1.5 Indications thérapeutiques.....13
1.5.1 Par voie intraveineuse.....13
1.5.2 Par voie intra-péritonéale.....14
1.5.3 Par voie orale.....14
1.6 Modes d'administration et posologie.....14
1.6.1 Mode d'administration.....14
1.6.1.1 Usage intraveineux.....14
1.6.1.2 Usage intra-péritonéal.....14
1.6.1.3 Usage oral.....14
1.6.2 Posologie.....15
1.6.2.1 Par voie parentérale.....15
1.6.2.1.1 Population normale.....15
1.6.2.1.2 Populations particulières.....15
1.6.2.2 Par voie orale.....16
1.6.2.3 Par voie intra-péritonéale.....16

1.7 Forme galénique 17
1.8 Effets indésirables 18
1.8.1 Réactions associées à la perfusion 18
1.8.2 Effets sur l'hématopoïèse 18
1.8.3 La néphrotoxicité et l'ototoxicité 18
1.8.4 Effets divers 18
1.9 Surdosage et toxicité 18
1.10 Contre-indications 19
1.11 Précautions d'emplois 19
2 Suivi thérapeutique pharmacologique 19
2.1 Définition 19
2.2 Justification du suivi thérapeutique pharmacologique 20
2.2.1 Justification du suivi thérapeutique pharmacologique de la Vancomycine 20
2.3 Processus du suivi thérapeutique pharmacologique de la Vancomycine 21
2.3.1 Phase pré analytique 21
2.3.2 Phase analytique 21
2.3.2.1 Méthode de dosage 21
2.3.2.2 Paramètres mesurés 22
2.3.3 Étape post-analytique 22
2.3.3.1 Interprétation du résultat 22

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

1 Rôle de la validation dans l'assurance qualité 24
2 Définition de la validation 25
3 But de la validation 25
4 Procédures à valider 26
5 Revalidation 26
6 Aspect réglementaire et normatif 27
6.1 Documents ISO 27
6.2 Documents ICH 27
6.3 Documents de la FDA (guidance for industry) 27
6.4 Documents des commissions SFSTP 27
6.5 Documents AFNOR (normes AFNOR NF V 03-110) 28
7 Méthodes d'analyse 28
7.1 Définition d'une méthode analytique 28
7.2 Méthodes bio-analytiques et interférences 28
7.3 Objectifs d'une méthode analytique 29
7.4 Cycle de vie d'une méthode quantitative 29
8 Critères de validation 30

9 Choix des critères de la validation 35
10 Validation d'une procédure analytique quantitative par le profil d'exactitude 36
11 Étapes de validation d'une méthode analytique en utilisant le profil d'exactitude 38
12 Protocole en phase de validation 39
13 Etude statistique de la validation analytique 42
13.1 La spécificité 42
13.2 Fonction de réponse 43
13.3 Alignement des observations 44
13.4 Prédictions inverses 45
13.5 Calculs de Justesse et fidélité 46
13.5.1 Modèle 46
13.5.2 Justesse 47
13.5.3 Fidélité 47
13.6 Exactitude 49
13.7 Erreur totale et profil d'erreur totale 50
13.8 Calcul de l'intervalle de tolérance 51
13.9 Profil d'exactitude 52
13.10 Linéarité 53
13.11 Limite de quantification 53

Partie pratique

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

1 MATÉRIEL 55
1.1 Matières premières 55
1.2 Réactifs 56
1.3 Appareillages et équipement 57
1.4 Verreries et autres 61
2 MÉTHODES 62
2.1 Principe de la méthode de dosage 62
2.2 Optimisation de la méthode 62
2.3 Choix du protocole de validation 64
2.4 Choix des paramètres de validation 65
2.4.1 Niveaux de concentration 65
2.4.2 Limites d'acceptabilité (λ) 65
2.4.3 Probabilité de confiance (β) 66
2.4.4 Conditions expérimentales 66
2.4.4.1 Choix de la dilution 66
2.4.4.2 Choix du diluant 66

2.4.4.3 Préparation des réactifs 66
2.4.4.4 Mode opératoire 67
2.4.4.5 Préparation des solutions 67
2.4.4.5.1 Préparation de la solution d'étalon interne 67
2.4.4.5.2 Préparation des solutions mères de Vancomycine 68
2.4.4.5.3 Préparation des standards d'étalonnage 68
2.4.4.5.4 Préparation des standards de validation 69
2.4.4.5.5 Préparation des blancs 69
2.4.4.6 Conditions chromatographiques 70
2.4.4.7 Préparation de la feuille de calcul 71

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

1 RÉSULTATS 72
1.1 Chromatogrammes obtenus du dosage de la Vancomycine et du Céfotaxime (étalon interne). 72
1.2 Temps de rétention obtenus 73
1.3 Calcul de la résolution 73
1.4 Informations concernant les données brutes 74
1.5 Spécificité et effet matrice 74
1.5.1 Comparaison des chromatogrammes 74
1.5.2 Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation 76
1.6 Fonction de réponse 78
1.7 Profils d'exactitude obtenus 86
1.8 Choix de la fonction de réponse 88
1.9 Alignement des observations 89
1.10 Prédictions inverses 90
1.11 Justesse 90
1.12 Fidélité 91
1.13 Exactitude 91
1.14 Erreur totale et profil d'erreur totale 93
1.15 Intervalle de tolérance 94
1.16 Profil d'exactitude 94
1.17 Linéarité 95
1.18 Limites de quantification 96
2 DISCUSSION 97
2.1 Résolution 97
2.2 Spécificité et effet matrice 97
2.2.1 Comparaison des chromatogrammes 97
2.2.2 Etude statistique de la spécificité et de l'effet matrice par comparaison des deux

pentes a1 et a2, et des deux ordonnées à l'origine b1 et b2 des deux droites de régression 97
2.3 Choix de la fonction de réponse 98
2.4 Justesse 98
2.5 Fidélité 99
2.6 Erreur totale 99
2.7 Profil d'exactitude 100
2.8 Limites de quantification et intervalle de dosage 100
2.9 Linéarité 100
2.10 Comparaison avec d'autres études 101
2.11 L'intérêt du profil d'exactitude 102

Conclusion 104
Recommandations 106
Références bibliographiques 108
ANNEXES 116
RÉSUMÉ 164
ABSTRACT 165

Liste des abréviations

5 t ½ : Temps d'équilibre.

ADME : Absorption Distribution Métabolisme Elimination.

AFNOR : Association française de normalisation.

APM : Âge post-menstruel.

ARN : Acide ribonucléique.

ASC : Aire sous courbe.

BMV : Directives de validation des méthodes bio-analytiques.

BPL : Bonnes Pratiques de Laboratoire.

CDP1-M : Crystalisation Degradation Product 1- Majoritaire.

Cfx : Céfotaxime.

CHU : Centre Hospitalier universitaire.

Cmax : Concentration plasmatique maximale.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

Cmin : Concentration plasmatique minimale (résiduelle).

CPM : Concentration de prévention des mutants résistants.

CV : Coefficient de Variation.

Ddl : Degré de liberté.

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique.

EI : Etalon interne.

EMIT : Enzyme multiplied immunoassay technique.

EN : Norme Européenne.

Etc. : Etcetera.

Exp : Exemple.

FDA : Food and Drug Administration.

FPIA : Immuno polarisation de fluorescence.

GISA : *Staphylococcus aureus* de sensibilité intermédiaire aux glycopeptides.

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance.

ICH : Conseil International d'Harmonisation des Exigences Techniques pour l'Enregistrement des Médicaments à Usage Humain.

ICPTM : Infections compliquées de la peau et des tissus mous.

IEC : Commission Électrotechnique Internationale.

IM : Intramusculaire.

ISO : Organisation International de Normalisation.

IT : Intervalle de Tolérance.

IV : Intraveineuse.

LCR : Liquide céphalorachidien.

LOD : Limite de détection.

LOQ : Limite de quantification.

LQI : Limite de Quantification Inférieure.

LQS : Limite de Quantification Supérieure.

min : Minutes.

Nbre : Nombre.

NF : Norme Française.

PA : Principe actif.

PAVM : Pneumonies acquises sous ventilation mécanique.

PC : Pneumonies communautaires.

PE : Prise d'Essai.

PFC : Plasma Frais Congelé.

pH : potentiel Hydrogène.

PN : Pneumonies nosocomiales.

R^2 : Coefficient de détermination linéaire.

RP : Reverse Phase.

Rs : Résolution.

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

SCE : Somme des Carrés des Ecarts.

SE : Standard d'Etalonnage.

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques.

SLFIA : Substrate-labeled fluorescent immunoassay.

SNC : Système Nerveux Central.

STP : Suivi Thérapeutique Pharmacologique.

SV : Standard de Validation.

t ½ : Temps de demie vie.

TCA : Acide Trichloro-Acétique.

TDM : Thérapeutic Drug Monitoring.

tr : Temps de rétention.

tr/min : Tours par minute.

UV : Ultra-Violet.

Vd : Volume de distribution.

VIM : Vocabulaire International de Métrologie.

λ : Limite d'acceptation (±15%).

λ : Longueur d'onde (220nm).

β: Proportion des futures mesures (85%).

α : Risque (5%).

Liste des tableaux

Tableau I : Les propriétés physiques de la Vancomycine 7
Tableau II : Modalités d'administration intra-péritonéale de la Vancomycine selon la population.....16
Tableau III : Forme galéniques et voies d'administration de la Vancomycine 17
Tableau IV : Comparatif des définitions entre deux principaux référentiels ICH et SFSTP.....31
Tableau V : Caractéristiques de performances à déterminer pour les méthodes qualitatives et quantitatives 35
Tableau VI : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi 40
Tableau VII : Exemple de fonctions de réponses.....42
Tableau VIII : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses 44
Tableau IX : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses.....45
Tableau X : Matières premières utilisées dans ce présent travail.....54
Tableau XI : Les réactifs utilisés dans ce présent travail.....55
Tableau XII : Système HPLC employé pour ce dosage 56
Tableau XIII : Appareillage utilisé dans ce présent travail 57
Tableau XIV : Verrerie et matériels utilisés dans ce présent travail 60
Tableau XV : Protocoles testés selon le type de la phase mobile et son mode d'élution et la longueur d'onde d'absorption 62
Tableau XVI : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage.....69
Tableau XVII : Temps de rétention et largeur du pic à la base des deux PA 73
Tableau XVIII : Résultats de la superposition des chromatogrammes 75
Tableau XIX : Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards d'étalonnage de la Vancomycine 76
Tableau XX : Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards de validation (avec matrice) de la Vancomycine 77
Tableau XXI : Comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine de la Vancomycine seule et de la Vancomycine dans le plasma…….....77
Tableau XXII : Paramètres d'étalonnage de la Vancomycine obtenus avec la fonction y = ax + b (sans matrice)…….....78
Tableau XXIII : Paramètres d'étalonnage de la Vancomycine obtenus avec la fonction y = ax (sans matrice)…….....80
Tableau XXIV : Paramètres d'étalonnage de la Vancomycine obtenus avec la fonction lny = f(lnx) (sans matrice)…….....82
Tableau XXV : Paramètres d'étalonnage de la Vancomycine obtenus avec la fonction √y = f(√x) (sans matrice)…….....84
Tableau XXVI : Profils d'exactitude obtenus de la Vancomycine …….....86
Tableau XXVII : Tableau d'alignement des réponses observées avec les trois séries de validation de la Vancomycine…….....89
Tableau XXVIII : Concentrations calculées par prédiction inverse de la Vancomycine.....90
Tableau XXIX : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration de la

Vancomycine. ……90
Tableau XXX : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration de la Vancomycine..... 91
Tableau XXXI : Résultats du calcul de l'exactitude relative de la Vancomycine…...…….92
Tableau XXXII : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration de la Vancomycine……..93
Tableau XXXIII : Limites de tolérance de la Vancomycine……94
Tableau XXXIV : Évaluation statistique de la linéarité de la Vancomycine……95
Tableau XXXV : les limites de quantification de la Vancomycine……...96
Tableau XXXVI : Signification des résultats de comparaison entre deux pentes et deux ordonnées à l'origine des deux droites de régression de la Vancomycine dans l'eau et dans le plasma …….....98

Liste des figures

Figure 1 : Structure développée de la Vancomycine……7
Figure 2 : Les formes chimiques de la Vancomycine.....7
Figure 3 : La conservation de la Vancomycine 9
Figure 4 : Schéma représentatif du système ADME de la Vancomycine 11
Figure 5 : Mécanismes d'action et de résistance de la Vancomycine 12
Figure 6 : Paramètres pharmacocinétiques du suivi thérapeutique pharmacologique 22
Figure 7 : Cycle de vie d'une méthode analytique.....29
Figure 8 : Graphique du profil d'exactitude 36
Figure 9 : Profil d'exactitude comme outil de décision pour quatre méthodes 37
Figure 10 : Logigramme de sélection d'un protocole de validation.....39
Figure 11 : Représentation graphique des équations 48
Figure 12 : Représentation des concepts d'exactitude, de fidélité et de justesse. 49
Figure 13 : La courbe de linéarité.....52
Figure 14 : Les réactifs employés dans ce présent travail.....56
Figure 15 : Chaine HPLC utilisée dans la présente partie pratique 57
Figure 16 : Equipement utilisé dans ce présent travail 59
Figure 17 : Les instruments et ustensiles employés dans cette pratique.....60
Figure 18 : Schéma représentatif du protocole de validation 64
Figure 19 : Schéma du mode opératoire de la validation.....66
Figure 20 : Les dilutions de la solution mère de Vancomycine.....67
Figure 21 : Chromatogramme du standard d'étalonnage (sans matrice) de la Vancomycine et du Céfotaxime (EI).....71
Figure 22 : Chromatogramme du standard de validation (avec matrice) de la Vancomycine et du Céfotaxime (EI).....71
Figure 23 : Détermination des largeurs des pics à la base et des temps de rétention à partir du chromatogramme du standard d'étalonnage.....72
Figure 24 : Chromatogramme du diluant non chargé 73
Figure 25 : Chromatogramme de Plasma non chargé.....74
Figure 26 : Chromatogramme sans matrice de la Vancomycine et du Céfotaxime dans le diluant 74
Figure 27 : Chromatogramme de la Vancomycine et du Céfotaxime dans le Plasma (avec matrice).....75
Figure 28 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction y= ax + b (série 1).....78
Figure 29 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction y= ax+b (série 2).....79
Figure 30 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction y= ax+b (série 3).....79
Figure 31 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction Y = ax (série 1) 80
Figure 32 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction Y = ax (série 2) 81

Figure 33 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction Y = ax (série 3) 81
Figure 34 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction lny = f (ln x) (série 1) 82
Figure 35 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction lny = f(lnx) (série 2) 83
Figure 36 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction ln y = f(lnx) (série 3) 83
Figure 37 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction √y = f(√x) (série 1) 84
Figure 38 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction √y = f(√x) (série 2) 85
Figure 39 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction √y = f(√x) (série 3) 85
Figure 40 : Profil d'erreur totale de la Vancomycine 93
Figure 41 : Profil d'exactitude de la Vancomycine (β = 85% et λ = 15%)..... 94
Figure 42 : Droite de linéarité des rapports des concentrations prédites en fonction des rapports des concentrations introduites de la Vancomycine.....95

Introduction

Introduction

Les antibiotiques sont définis comme toute substance élaborée par des micro-organismes ou pouvant être reproduite par synthèse ou semi-synthèse, capables d'inhiber spécifiquement la croissance des bactéries (effet bactériostatique) ou de les détruire (effet bactéricide).

La Vancomycine, sujet de cette étude est un antibiotique appartenant à la famille des glycopeptides à usage strictement hospitalier. Elle représente le traitement de référence pour les infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM).
En raison de ses effets toxiques à savoir la néphrotoxicité et l'ototoxicité et de son index thérapeutique étroit, son suivi thérapeutique pharmacologique (STP) est indispensable chez certains patients.
La surveillance biologique de la Vancomycine se fait habituellement par des techniques immunologiques complexes qui manquent toutefois de spécificité, présentant donc des problèmes d'interférences.

C'est dans ce cadre que nous nous sommes intéressés au développement d'une nouvelle méthode de dosage de la Vancomycine dans le plasma par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) pour tirer profit de sa simplicité, sa spécifiée, sa rapidité, et la meilleure sélectivité qu'elle offre.
Néanmoins, toute nouvelle méthode mise au point ou encore optimisée doit faire l'objet d'une validation complète conformément aux normes, aux guides et aux textes réglementaires en vigueur avant sa mise en routine.

En effet, la validation est aujourd'hui un objectif important et omniprésent car elle constitue un élément fondamental dans le système d'assurance qualité en donnant des garanties que les mesures qui seront effectuées en routine, avec cette méthode, ne s'écartent que très peu des résultats attendus.
Le concept de la validation a été défini dans plusieurs documents de référence (FDA, ICH,ISO et les BPL) comme une étape clé basée sur un ensemble de mesures expérimentales et l'analyse statistique d'un certain nombre de critères permettant de conclure à l'aptitude ou non d'une procédure analytique à donner des résultats fiables.

Selon la démarche classique, la performance d'une méthode analytique est démontrée en

examinant séparément deux critères statistiques à savoir le biais (justesse) et la précision (fidélité). Cependant en raison de la complexité des tests statistiques appliqués et de la carence en données relatives au plan expérimental à suivre, des problèmes d'interprétation ont été souvent rencontrés dans cette approche.

C'est pour cela et afin de faire développer la validation des méthodes analytiques, que de nouvelles tendances et de nouveaux concepts scientifiques sont nés, avec particulièrement l'harmonisation des démarches publiée par la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006, qui repose sur l'utilisation du profil d'exactitude comme outil décisionnel, selon un concept basé sur l'erreur totale (erreur systématique + erreur aléatoire).

Notre manuscrit est scindé en deux parties. La première se centre sur une revue de la littérature et se compose de deux chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à la présentation de notre molécule d'étude, ses propriétés physico-chimiques, pharmacologiques ainsi que son suivi thérapeutique.
- Le deuxième chapitre aborde la validation en bio-analyse dans ses volets définition, réglementation et étude statistique.

La seconde partie est dédiée à l'aspect pratique de notre travail à savoir le matériel et les méthodes utilisés ainsi que la description du protocole expérimental suivi. Enfin, les résultats obtenus sont exposés et discutés puis synthétisés par une conclusion.

Le présent travail a été réalisé au niveau des laboratoires de Chimie Analytique et de Biochimie du département de pharmacie de la faculté de médecine, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou et s'est étalé sur une période de 6 mois.

Objectifs

Objectifs

L'objectif principal de ce présent travail est l'optimisation et la validation d'une nouvelle méthode de dosage de la Vancomycine dans le plasma humain par Chromatographie Liquide à Haute Performance dotée d'une détection par UV (HPLC-UV).

Afin de garantir la fiabilité des résultats de notre méthode nous avons utilisé le profil d'exactitude comme outil de décision, et ce, pour d'éventuelles applications en routine dans le suivi thérapeutique pharmacologique de la Vancomycine.

Outre cet objectif principal, des objectifs secondaires sont définis comme suit :

- Savoir manipuler les différentes verreries de laboratoire ;
- Établir un protocole de validation basé sur le profil d'exactitude, et ce en fonction des caractéristiques du principe actif utilisé ;
- Utilisation des équipements analytiques notamment une chaîne HPLC en vue du dosage biologique du médicament et l'exploitation des résultats ;
- Maîtrise des différents outils statistiques utilisés en validation des méthodes analytiques.

Partie bibliographique

CHAPITRE I : VANCOMYCINE

L'utilisation de microbes producteurs d'antibiotiques pour lutter contre les maladies remonte à des millénaires, on peut citer l'usage de pain moisi pour traiter les plaies ouvertes en Serbie, en Chine, en Grèce et en Egypte.

C'est en 1928 qu'Alexander Fleming a découvert, fortuitement, la pénicilline qui sera par la suite purifiée par Norman Heatley, Howard Florey, Ernst Chain et leurs collègues à Oxford, développant ainsi la pénicilline comme médicament. [1]

Depuis, de nouveaux antibiotiques ont été découverts et une classification de ceux-ci a été établie en fonction de leurs propriétés et spectres d'action, on citera notamment la Vancomycine.

15 ans après le déploiement de la pénicilline et la découverte subséquente des macrolides et des tétracyclines, le milieu hospitalier a fait face à un sérieux problème thérapeutique, à savoir la résistance des staphylocoques aux antibiotiques existants. [2]

C'est donc dans l'optique de résoudre ce problème que Dr. E. C. Kornfeld, a isolé la Vancomycine en 1956, à partir d'un échantillon de sol prélevé au fin fond de la jungle intérieure de Bornéo, qui contenait un composé qui fut nommé *Streptomyces orientalis*, ayant prouvé son efficacité contre les staphylocoques. Ce composé a par la suite été approuvé par la FDA est pris le nom de "Vancomycine" dérivant du terme "vanquish" qui signifie vaincre. [3]

1 Généralités sur la Vancomycine

1.1 Structure chimique

La Vancomycine est un antibiotique naturel de la famille des glycopeptides de type tricyclique dichloré possédant une chaîne hepta peptidique à cinq cycles aromatiques, sur cette partie active de la molécule, se trouve fixé un disaccharide composé de glucose et de vancosamine. La complexité et la taille de la molécule sont représentées dans la figure (1) où on décrit un glycopeptide tricyclique auquel sont rattachés deux tyrosines chlorées, trois phénylglycines substituées, du glucose, un sucre aminé (la vancosamine), de la N-méthyl-leucine et de l'acide amide aspartique.

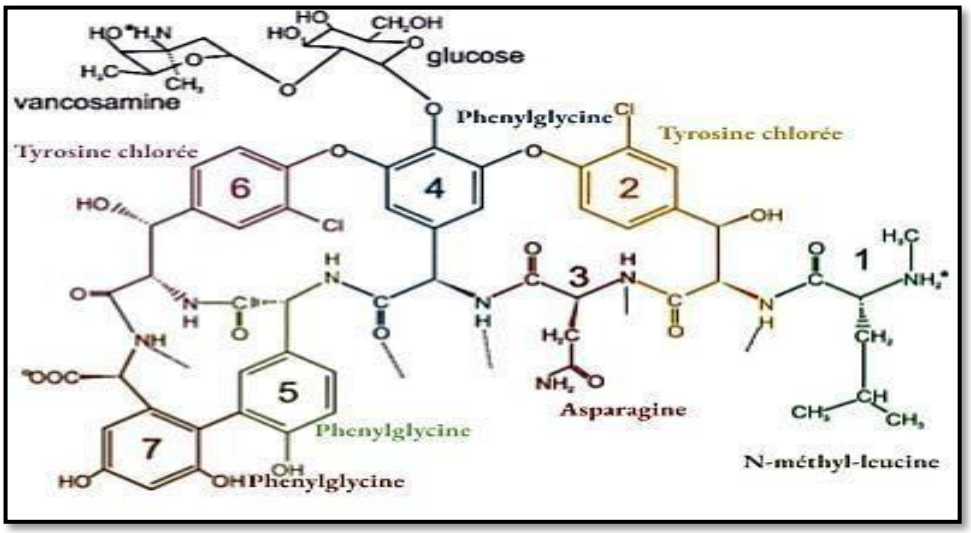


Figure 1 : Structure développée de la Vancomycine. [4]

1.2 Propriétés physico-chimiques

On observe deux formes chimiques de Vancomycine illustrées dans la figure (2) :

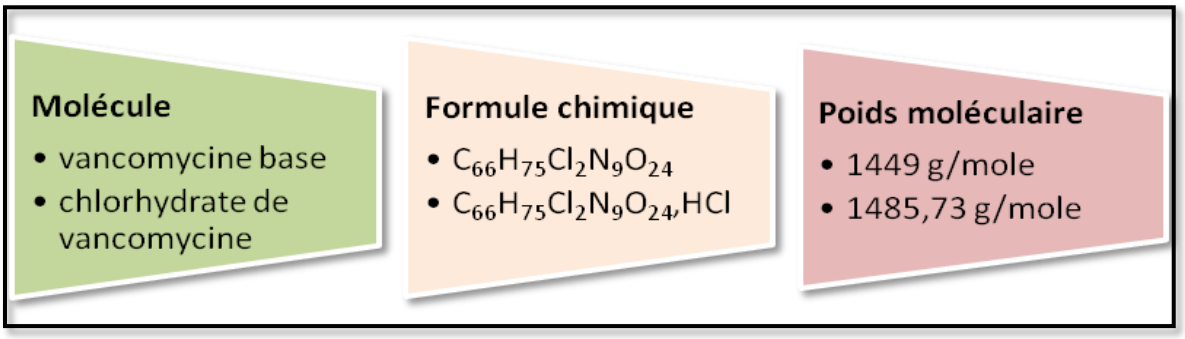


Figure 2 : Les formes chimiques de la Vancomycine. [5]

1.2.1 Propriétés physiques

La Vancomycine sous forme de sel est la forme la plus couramment étudiée, ses propriétés physiques sont présentées dans le tableau (I).

Tableau I : Les propriétés physiques de la Vancomycine.

Apparence	Poudre blanche, hygroscopique. [6]
Etat physique	Solide. (ANNEXE I)
Point de fusion	105° C. [5]
Indice de Réfraction	n_D^{20} 1.74. [7]
Solubilité	- Aisément soluble dans l'eau : la Vancomycine est très soluble au pH de reconstitution (pH = 4), alors qu'au pH qui tend vers la neutralité sa solubilité diminue. Elle est soluble au pH alcalin mais instable. [6] - Modérément soluble dans le méthanol. [5] - Peu soluble dans l'éthanol à 96%. - Très peu soluble dans l'acétonitrile. - Insoluble dans les alcools supérieurs, l'acétone, l'éther et le chloroforme. [5]
Absorption dans l'ultraviolet (l'UV)	Un maximum d'absorption à 282 nm. (ANNEXE I)
Précipitation	La précipitation au pH 7 se produit à une concentration minimale d'environ 12 mg/mL qui est 1000 fois supérieure aux concentrations observables dans les tissus de patients traités. [5]

1.2.2 Propriétés chimiques

La Vancomycine possède plusieurs fonctions et groupes ionisables, à l'origine de deux propriétés chimiques importantes, à savoir la possibilité de liaison avec les ions métalliques et au niveau de la paroi bactérienne, la formation de complexes avec les peptides terminés par certaines séquences d'aminoacides. [6] [8]

1.2.3 Incompatibilités physico-chimiques

L'acidité de la Vancomycine peut entraîner une instabilité chimique ou physique en cas de mélange avec d'autres substances, elle augmente notamment le risque de précipitation. Il est donc préférable de la perfuser seule, car son administration est incompatible avec de nombreux médicaments, tels que le chloramphénicol, la méticilline, les corticostéroïdes, l'héparine et les barbituriques. [8-9]

1.2.4 Compatibilité physico chimique en solution

La Vancomycine est compatible avec l'amikacine, d'où la réalisation de collyres par association. [10]

1.3 Stabilité et conservation

Le chlorhydrate de Vancomycine est un principe actif (PA) stable et hydrosoluble à pH = 3,5. Il est peu stable en particulier au pH alcalin, à température élevée et à la lumière, il se transforme alors en produit de dégradation appelé CDP1-M (Crystalisation Degradation Product 1-Majoritaire) sans action pharmacologique. [11]

La conservation de la Vancomycine est résumée dans la figure (3) :

Figure 3 : La conservation de la Vancomycine. [5-9]

1.4 Propriétés pharmacologiques

1.4.1 Pharmacocinétique

1.4.1.1 Absorption

La Vancomycine est faiblement absorbée par le tractus gastro-intestinal suite à une prise orale (biodisponibilité < 5%) lorsque la muqueuse digestive est saine.

Toutefois une absorption digestive non négligeable est observée chez les patients souffrants d'insuffisance rénale et/ou de colite pseudomembraneuse à *Clostridium difficile* ou à Staphylocoque. Elle constitue alors un agent chimio thérapeutique adapté au traitement local de ces infections. [12-13]

À cause de l'éventuelle nécrose tissulaire au point d'injection et de la douleur qu'elle provoque, la voie IM est proscrite. La perfusion IV reste donc préférentielle pour le traitement des

infections systémiques. [6-14]

La voie intra péritonéale permet le traitement de péritonite, elle peut être utilisée pendant une dialyse péritonéale dans la mesure où 60% de la dose injectée passent dans le sang en 6h (Pancorbo, Comty, 1982, Bunke, Aronoff, Brier et al., 1983).

Les voies intrathécales et intra ventriculaires sont utilisées pour le traitement des infections du système nerveux central (SNC) en cas d'engagement du pronostic vital. La voie intra vitréenne est utilisée pour le traitement des endophtalmies bactériennes post-opératoires. Cependant l'absorption systémique via ces trois voies n'a pas été étudiée, de plus, en raison des faibles quantités administrées, il semblerait improbable que des concentrations sériques soient atteintes. [6]

1.4.1.2 Distribution

La Vancomycine obéit à un modèle pharmacocinétique d'un à trois compartiments. Après administration IV, se distinguent une phase de distribution rapide suit la fin de la perfusion, puis une phase intermédiaire précède la phase d'élimination terminale qui est dépendante de la fonction rénale. [6]

Le volume de distribution varie selon l'âge, le sexe et le poids. Chez des patients non obèses ayant une fonction rénale normale, il va de 0,4 à 1 L/kg avec une moyenne habituelle de 0,7 L/kg. [6]

La Vancomycine se répartit majoritairement dans le compartiment extracellulaire, sa liaison aux protéines plasmatiques est d'environ 50 % essentiellement à l'albumine. [15]

La Vancomycine pénètre dans la plupart des espaces corporels à des concentrations variables dépendantes un peu du degré d'inflammation présent. Elle se distribue rapidement dans les tissus mous, les liquides inflammatoires, ainsi que dans les urines.

Elle traverse facilement le placenta, diffuse dans le sang du cordon, et dans le lait maternel. En revanche, une distribution limitée est constatée dans les tissus osseux et adipeux, l'humeur aqueuse, et dans le LCR lorsque les méninges sont saines, mais sa pénétration dans celui-ci est renforcée lorsque les méninges sont enflammées selon un mécanisme saturable autrement dit dépendant de la dose. [16-17-18]

1.4.1.3 Métabolisme

La Vancomycine est faiblement métabolisée. Environ 80 à 90 % de la dose administrée sont excrétés sous forme inchangée par voie rénale dans les 24 heures. [19]

1.4.1.4 Elimination

Administrée par voie IV, la Vancomycine est principalement excrétée par les reins par filtration glomérulaire sous forme de substance microbiologiquement active. [9]

La demi-vie d'élimination de la Vancomycine varie selon l'âge, le poids et la fonction rénale, elle est de 4 à 6 heures chez l'adulte à fonction rénale normale [19], et va de 2,2 à 3 heures chez l'enfant. [9]

Le dysfonctionnement rénal retarde son élimination qui peut dépasser les 19 heures. [19]

La clairance totale de la Vancomycine est très variable selon les individus, elle est estimée entre 80–140 mL/min [16]. Une forte corrélation linéaire existe entre celle-ci et la clairance totale de la créatinine. [20]

Une dose orale est excrétée presque exclusivement dans les fèces.

Une élimination biliaire est possible mais en faible proportion moins de 5% d'une dose. [9]

La Vancomycine est très faiblement éliminée du sang par hémodialyse ou par dialyse péritonéale. [9]

La pharmacocinétique de la Vancomycine est illustrée dans la figure (4) :

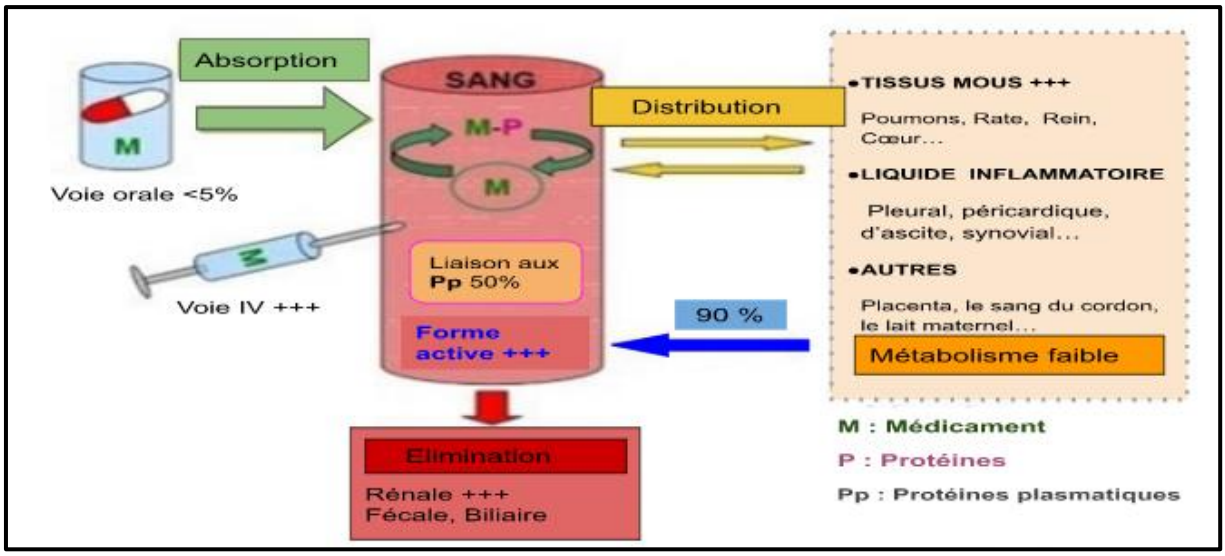


Figure 4 : Schéma représentatif du système ADME de la Vancomycine [6-9-19].

1.4.2 Pharmacodynamie

1.4.2.1 Mécanisme d'action

La Vancomycine est un antibiotique à activité bactéricide sur les bactéries à gram positif en phase exponentielle de croissance excepté le *Staphylococcus haemolyticus* et les Entérocoques où l'activité est bactériostatique. La bactéricidie est lente, temps dépendante, et sensible à l'effet inoculum, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) basses, situées entre 0,5 et 4 mg/L. [18-21]

Elle agit par un mécanisme à cibles multiples, contribuant ainsi au faible nombre de résistance :

- Le mécanisme d'action principale est l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane. En effet, elle diffuse dans la paroi bactérienne et établit des liaisons de forte affinité à la terminaison D-alanyl-D-alanine des 75 précurseurs du peptidoglycane. Ces disaccharides penta-peptidiques étant substrats des transglycosylases et des transpeptidases, donc une fois séquestrés, le glycopeptide empêchera l'action des deux enzymes. Cette double action entraîne l'inhibition de la croissance puis la lyse bactérienne [18] ;
- Elle altère la perméabilité de la membrane cytoplasmique [22] ;
- Elle inhibe la synthèse de l'ARN [22].

1.4.2.2 Mécanisme de résistance

La résistance acquise à la Vancomycine est basée sur l'acquisition de plusieurs complexes de gènes van qui modifient la cible D-alanyl-D-alanine en D-alanyl-D-lactate ou D-alanyl-D-sérine de faible affinité pour la Vancomycine. [9] Elle est plus fréquente chez les Entérocoques *Enterococcus faecium* essentiellement puis *Enterococcus faecalis*, et exceptionnellement chez *Staphylococcus aureus*. [21]

Les mécanismes d'action et de résistance sont représentés dans la figure (5) :

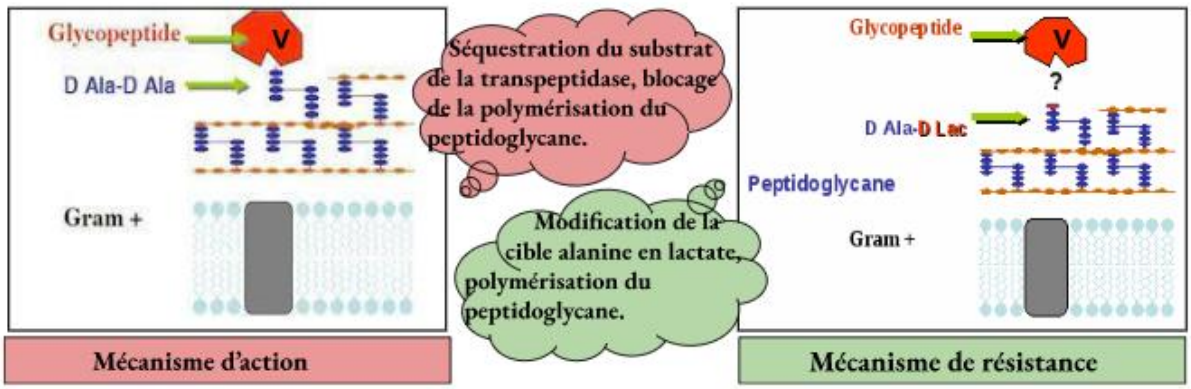


Figure 5 : Mécanismes d'action et de résistance de la Vancomycine. [21]

1.4.2.3 Spectre d'action

Le spectre antimicrobien est étroit limité aux cocci et bacilles à Gram positif aérobies et anaérobies y compris le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM). En effet, le peptidoglycane est accessible à la Vancomycine chez les bactéries à Gram positif, chez qui la membrane externe ne constitue pas un frein à la diffusion moléculaire expliquant la résistance naturelle des Gram négatif aux glycopeptides. Toutefois parmi les bactéries à gram positif certaines sont naturellement résistantes à l'antibiotique (*Nocardia spp…)* et d'autres acquièrent fréquemment une résistance. Elle permet la prise en charge d'infections dues à des germes multirésistants pour lesquels elle représente le dernier rempart thérapeutique. [23]

1.5 Indications thérapeutiques

Utilisée exclusivement en milieu hospitalier, la Vancomycine est le traitement de prédilection des infections sévères aux germes à Gram positif multi-résistants comme les Staphylocoques en particulier *Staphylococcus aureus* méticillino-résistant, Staphylocoques à coagulase négative, les Entérocoques et Streptocoques résistants aux bêtalactamines, et les Corynébactéries. Elle assure également le traitement des infections à germes sensibles chez les patients allergiques aux bêtalactamines.

L'utilisation en antibioprophylaxie est possible comme recours en cas d'allergie aux bêtalactamines lorsqu'une action sur les staphylocoques est nécessaire. [21]

1.5.1 Par voie intraveineuse

La Vancomycine est indiquée pour tous les groupes d'âges pour le traitement des infections suivantes :

- Infections compliquées de la peau et des tissus mous (ICPTM) ;
- Infections des os et des articulations ;
- Pneumonies communautaires (PC) ;
- Pneumonies nosocomiales (PN), y compris pneumonies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) ;
- Endocardites infectieuses ;
- Méningites bactériennes aiguës ;
- Bactériémies associées ou suspectées d'être associées à l'une des infections listées ci-dessus ;
- Prophylaxie péri-opératoire chez les patients à risque de développer une endocardite bactérienne lors d'interventions chirurgicale. [9]

1.5.2 Par voie intra-péritonéale

Indiquée pour le traitement par voie intra-péritonéale de péritonite associée à une dialyse. [9]

1.5.3 Par voie orale

Indiquée dans certains cas réfractaires exceptionnels dans le traitement des infections à *Clostridium difficile*. [21]

1.6 Modes d'administration et posologie

1.6.1 Mode d'administration

1.6.1.1 Usage intraveineux

L'administration intraveineuse de la Vancomycine peut être soit discontinue ou continue sur 24h. L'administration intraveineuse intermittente se fait en perfusion lente après dilution dans une solution glucosée ou saline isotonique, à une durée d'au moins une heure ou à une vitesse maximale de 10 mg/min, cette administration permet d'éviter une réaction anaphylactique contrairement à une injection en bolus.

Étant temps-dépendante, la perfusion continue à l'aide d'une seringue électrique, améliore l'action bactéricide de la Vancomycine en augmentant le temps de contact avec les germes sur le site infecté. [24]

1.6.1.2 Usage intra-péritonéal

La Vancomycine sera ajoutée au dialysat au moyen d'une méthode stérile. [9]

1.6.1.3 Usage oral

Le contenu d'une fiole pour administration intraveineuse sera reconstitué dans de l'eau, puis dilué avant d'être bu ou administré par sonde nasogastrique. [9]

1.6.2 Posologie

La durée du traitement varie de 1 à 6 semaines selon le type et la sévérité de l'infection et la réponse clinique du patient. La dose journalière et le rythme d'administration doivent être adaptés aux caractéristiques cinétiques individuelles et respecter les facteurs suivants :

- L'âge ;
- Le poids ;
- L'infection concernée ;
- L'état de fonctionnement des reins ;
- La capacité à entendre ;
- Toute autre prise médicamenteuse. [9]

1.6.2.1 Par voie parentérale

1.6.2.1.1 Population normale

- Adultes âgés de 12 ans et plus

La dose recommandée est de 15 à 20 mg/kg de poids au rythme d'1g toutes les 8 à 12 heures, la dose peut atteindre les 30 mg/kg selon l'avis du praticien. La dose ne devrait jamais dépasser les 2g/jr. [9]

- Nourrissons et enfants âgés entre un mois et 12 ans

La dose recommandée est de 10 à 15 mg/kg de poids corporel toutes les 6 heures. [9]

- Les nouveau-nés, prématurés et nouveau-nés à terme (de 0 à 27 jours)

La dose de départ va de 10 à 15 mg/kg à un intervalle variable allant de 8 à 24 heures selon l'âge gestationnel corrigé APM âge post-menstruel (âge gestationnel plus l'âge post-natal). [9]

1.6.2.1.2 Populations particulières

- Personnes âgées

Une réduction des doses d'entretien pourrait être requise en raison de la diminution naturelle du taux de filtration glomérulaire survenant avec l'âge. [9]

- Insuffisants rénaux

- Atteinte légère ou modérée : la dose de départ ne doit pas être inférieure à 15 mg/kg.
- Atteinte sévère : il vaut mieux administrer des doses d'entretien comprises entre 250 mg et 1000 mg à des intervalles de plusieurs jours plutôt que recourir à de plus faibles doses quotidiennes.
- Anurie : dose initiale est de 15 mg/kg de poids corporel jusqu'à ce qu'ils atteignent la concentration sérique thérapeutique. Une dose d'entretien comprise entre 250 à 1000 mg à des intervalles de plusieurs jours est préférable aux faibles doses quotidiennes. [15]

- Femmes enceintes

Des doses plus élevées peuvent être requises pour atteindre les taux sériques cibles. [9]

- Patients obèses

Chez les patients obèses, la dose initiale devrait être adaptée individuellement selon le poids corporel total, comme chez les patients non-obèses [9]. Les intervalles thérapeutiques doivent être plus courts. [6]

- Brûlés

Une augmentation de la clairance totale de la Vancomycine est constatée chez les brûlés. Ils pourraient donc avoir besoin des doses de Vancomycine plus élevées et plus rapprochées. [5]

L'administration se fait en perfusion continue de 30 mg/kg par injection. La dose de charge est de 5 mg/kg et un premier dosage est effectué après 12 heures d'administration, quant au dosage à l'équilibre il se fait au cours de l'administration sans horaire précise.

Le taux plasmatique cible se situe entre 20 et 30 mg/L. [25]

- Immunodéprimés

Les patients neutropéniques fébriles présentent un Vd élevé, et une baisse importante de la demi-vie de la Vancomycine nécessitant par conséquent d'augmenter les doses d'antibiotiques. [6]

1.6.2.2 Par voie orale

- Adultes âgés de 12 ans et plus

La dose recommandée est de 125 mg toutes les 6 heures, peut être augmentée jusqu'à 500 mg toutes les 6 heures si le médecin le juge nécessaire.

- Nouveau-nés, nourrissons et enfants âgés de moins de 12 ans

La dose recommandée est de 10 mg/kg pour un enfant. La posologie journalière maximale ne doit pas dépasser 2g. [9]

1.6.2.3 Par voie intra-péritonéale

Les posologies administrées par voie intra-péritonéale sont décrites dans le tableau (II)

Tableau II : Modalités d'administration intra-péritonéale de la Vancomycine selon la population. [9]

Perfusion	Adulte	Population pédiatrique
Intermittente	La dose recommandée est de 15-30 mg/kg dans l'échange long, tous les 5-7 jours.	Dose initiale de 30 mg/kg dans l'échange long, suivie de 5 mg/kg tous les 3-5 jours.
Continue	La dose de charge est de 30 mg/kg suivie d'une dose d'entretien de 1,5 mg/kg/poche dans tous les échanges.	Dose de charge de 1000 mg/L par litre de dialysat, suivie de 25 mg/L (après 3 à 6h de la dose de charge) dans tous les échanges.

1.7 Forme galénique

Les principales formes pharmaceutiques de la Vancomycine sont classées en fonction de la voie d'administration et de la dose dans le tableau (III).

Tableau III : Forme galéniques et voies d'administration de la Vancomycine.

Forme galénique	Type d'administration	Dose en mg ou g ou mg/L
Gélules	Orale	125 mg, 250 mg. [26]
Poudre pour solution à diluer pour administration orale	Orale	500 mg. [9]
Poudre pour solution à diluer pour perfusion IV et poudre pour solution pour perfusion	Parentérale	125 mg, 250 mg, 500 mg, 1 g, 5 g, 10 g. [27]
Les solutions intra vitréennes	Intravitréenne	10 mg/mL. [28]
Collyres renforcée	Oculaire	25 mg/mL, 31 mg/mL, 50 g/mL. [29-30-31]

1.8 Effets indésirables

1.8.1 Réactions associées à la perfusion

- Un certain nombre de réactions locales ont été décrites notamment une douleur au point d'injection, nécrose, veinite, thrombophlébite ;
- Une éosinophilie, des réactions de type anaphylactique « syndrome de l'homme rouge » ont été signalées, ainsi que des réactions générales (urticaire, fièvres, frisson, éruption cutanée, nausées, dyspnée, hypotension,). Ces manifestations sont devenues plus rares depuis l'utilisation de produits purifiés. Elles sont constatées lors d'injections rapides, une administration plus lente permet de les éviter ou de les réduire. [5-9-21]

1.8.2 Effets sur l'hématopoïèse

- Une neutropénie réversible à l'arrêt du traitement.
- De rares cas d'agranulocytose réversible et de thrombocytopénie ont été signalés. [5]

1.8.3 La néphrotoxicité et l'ototoxicité

Elles sont rares grâce aux formulations purifiées et généralement réversibles. Cependant elles peuvent survenir consécutivement à l'administration de fortes doses de Vancomycine, à des taux sériques élevés et à une durée d'administration prolongée par voie parentérale. Ce risque est aussi favorisé par des facteurs surajoutés à savoir l'âge avancé, co-prescription de médicaments néphrotoxiques ou ototoxiques notamment les aminosides, surdité préexistante, insuffisance rénale antérieure, déshydratation. [5-21-32]

1.8.4 Effets divers

Dermatite exfoliative, le syndrome de Stevens-Johnson, le syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse, l'érythrodermie bulleuse avec épidermolyse et de rares cas de vasculite. [5]

1.9 Surdosage et toxicité

La toxicité de la Vancomycine par voie générale est très documentée, ses 2 principaux effets toxiques sont la néphrotoxicité et l'ototoxicité qui sont aggravés suite à son accumulation en cas d'insuffisance rénale.

Ces risques sont évaluables et maîtrisables grâce aux taux sériques de Vancomycine. La néphrotoxicité est avérée au-delà de 40 mg/L. La toxicité auditive secondaire à l'altération

rénale est concentration dépendante, rare pour des taux plasmatiques < à 30 mg/L, fréquente pour des taux > à 80 mg/L. [33-34-18]

L'injection de 500 mg IV à un enfant de 2 ans a provoqué une intoxication létale.

La dialyse n'élimine pas des quantités importantes de Vancomycine, l'hémofiltration et l'hémo perfusion à l'aide de résines de poly sulfone sont utilisées pour augmenter sa clairance. Comme il n'existe aucun antidote spécifique connu, un traitement de soutien général est indiqué. [9]

1.10 Contre-indications

- Contre-indication absolue chez les sujets allergiques au principe actif, ou l'un des excipients [9]
- La voie intramusculaire est à proscrire au vu des risques de nécrose ;
- La Vancomycine pouvant passer dans le lait maternel, est à éviter pendant l'allaitement pour ne pas perturber la flore gastro-intestinale du nourrisson. Ceci dit, son absorption digestive étant quasiment nulle, il n'y a pas de risque de toxicité systémique ;
- L'intérêt thérapeutique de la Vancomycine justifie que son utilisation puisse être envisagée si besoin au cours de la grossesse, quel qu'en soit le terme. Dans ce cas, en raison de l'ototoxicité au cours des deux derniers trimestres, une évaluation de la fonction auditive du nouveau-né peut être réalisée. [35-9]

1.11 Précautions d'emplois

- La surveillance des fonctions rénale et auditive est indispensable surtout en cas d'association aux aminosides ;
- En cas de traitement prolongé, une surveillance hématologique est nécessaire ;
- En cas de réactions d'hypersensibilité, le traitement par Vancomycine doit être interrompu immédiatement ;
- L'adaptation posologique et le suivi thérapeutique pharmacologique doivent être effectues dans la nécessité. [5]

2 Suivi thérapeutique pharmacologique

2.1 Définition

Le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) est défini comme l'individualisation d'un traitement médicamenteux basée sur des informations pharmacogénétiques, démographiques,et cliniques à priori et/ou sur la mesure à postériori des concentrations sanguines du médicament (suivi pharmacocinétique), de composés endogènes de substitution ou de paramètres biologiques d'effet (suivi pharmacodynamique) déterminant ainsi la nécessité d'une adaptation

posologique. [36]

Le monitoring a pour objectif d'optimiser la prise en charge du patient en améliorant la réponse thérapeutique, en réduisant les effets secondaires et en évitant la toxicité. [37]

Un pré requis de la réalisation du suivi thérapeutique d'une molécule est la connaissance de son temps d'équilibre (5 $t_{1/2}$) qui permet d'avoir des résultats sanguins en corrélation avec les taux tissulaires pour pouvoir faire une interprétation adéquate. Il faut aussi connaître la zone thérapeutique de la substance à doser tout en gardant à l'esprit qu'il s'agit d'un concept purement relatif. [6]

2.2 Justification du suivi thérapeutique pharmacologique

Pour faire le suivi thérapeutique, certains de ces critères doivent être réunis :

- Une relation concentration - effet pharmacologique (thérapeutique ou toxique) meilleure que la relation dose - effet ;
- Une marge thérapeutique étroite ;
- Une variabilité pharmacocinétique interindividuelle importante ;
- Absence d'autres critères d'évaluation de l'effet ;
- Le patient présente des signes ou un risque de surdosage ou de sous-dosage ;
- Suspicion d'une interaction médicamenteuse ;
- La variabilité intra-individuelle au cours du traitement doit être faible ;
- Existence d'une méthode d'analyse rapide et fiable. [32-38]

2.2.1 Justification du suivi thérapeutique pharmacologique de la Vancomycine

La Vancomycine est un antibiotique temps-dépendant, efficace lorsque sa concentration au site d'action dépasse la CMI durant l'intervalle de dosage [38]. Le taux résiduel devrait se situer entre 10 et 15 mg/L pour les infections légères et entre 15 et 20 mg/L pour les infections sévères [39]. Cependant, un risque accru de néphrotoxicité est associé au-delà de 15 mg/L (voire, 25 mg/L lors de perfusion IV continue), par conséquent le suivi thérapeutique des concentrations résiduelles est nécessaire. [38]

Pourvue d'une marge thérapeutique étroite, et d'une forte variabilité pharmacocinétique interindividuelle [33], le TDM de la Vancomycine, peu utile chez les patients sans complications, reste recommandé chez certains patients :

- Insuffisants rénaux, les sujets âgés, les nouveaux nés (allongement de la demie vie d'élimination) ;
- Infections sévères et/ou multirésistantes notamment les endocardites , infections à MRSA ;
- Neutropénie prolongée ; soin intensif ; oncologie ; patients dialysés ;
- Les patients recevant une association d'antibiotiques (ou autres médicaments) néphrotoxiques et/ou ototoxiques ;
- Les patients dont le volume de distribution est modifié (grands brûlés, femmes enceintes,

obèses) ;
- Les patients qui reçoivent des doses supérieures à la normale ;
- L'emploi simultané de Vancomycine par les voies parentérale et orale peut se traduire par un effet additif, lequel doit être pris en considération dans le calcul de la dose totale administrée. [5-24-38]

2.3 Processus du suivi thérapeutique pharmacologique de la Vancomycine

2.3.1 Phase pré analytique

Le prélèvement est réalisé sur tube sec standard. Le dosage peut être également réalisé sur plasma recueillie sur tube EDTA, oxalate ou hépariné sans gel. [40]

L'acheminement au laboratoire se fait à température ambiante avec un délai maximal de 2 heures. Le sang doit être centrifugé dans un délai de 3 heures sinon décanté, et le sérum ou le plasma conservé entre 2 et 8 °C au maximum 24 heures, ou à -20 °C au-delà. [33]

Les prélèvements doivent être effectués une fois l'état d'équilibre atteint, soit au 2ème jour du traitement, et 48 heures après chaque changement de dose. [24]

La concentration résiduelle C_{min} se mesure à partir d'un prélèvement réalisé dans la demi-heure qui précède l'administration de la dose suivante. La détermination du pic se fait assidûment en réalisant un prélèvement entre 45 et 60 minutes après la fin de la perfusion. Les heures de prélèvement doivent être minutieusement respectées en considération de l'importante phase de distribution de la Vancomycine. [21]

En cas d'administration par perfusion continue, le prélèvement peut se faire à tout moment au bras opposé à la perfusion. [24]

2.3.2 Phase analytique

2.3.2.1 Méthode de dosage

Le dosage de la vancomycinémie est amplement disponible par des techniques immunologiques : immuno- polarisation de fluorescence (FPIA), enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT), substrate-labeled fluorescent immunoassay (SLFIA) ou immuno compétition sur film mince multicouche. Ces méthodes présentent l'avantage d'être rapides puisqu'elles sont complétement automatisées , ceci dit elles présentent aussi des risques de réaction croisées ce qui conduit à des discordances entre les résultats obtenus et la clinique du patient , en plus du coût élevé de l'application de ces méthodes, c'est pour cela que la Chromatographie Liquide à

Haute Performance (HPLC) constitue une alternative très intéressante en raison de sa capacité à analyser en individualisant les différents constituants du mélange, de sa haute résolution, de sa spécificité qui permet de résoudre le problème d'interférence ainsi que son coût d'application plus bas et la disponibilité constante de ses réactifs. Cependant, elle nécessite un prétraitement des échantillons, un savoir-faire pour l'utilisation des instruments ainsi qu'un temps d'analyse un peu plus allongé que pour les méthodes immunologiques. [21] [41]

2.3.2.2 Paramètres mesurés

Idéalement, le meilleur paramètre à suivre serait l'aire sous la courbe pharmacocinétique (ASC), mais sa réalisation est difficile. Pratiquement, d'autres paramètres sont utilisés à savoir la concentration résiduelle (C_{min}) et la concentration plasmatique maximale (C_{max}). On choisira l'un ou l'autre en fonction des propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques de la molécule. [6]

Dans le cas de la Vancomycine la détermination des concentrations résiduelles sériques est la méthode la plus précise et la plus pratique du contrôle de l'efficacité et de la toxicité du traitement. [15]

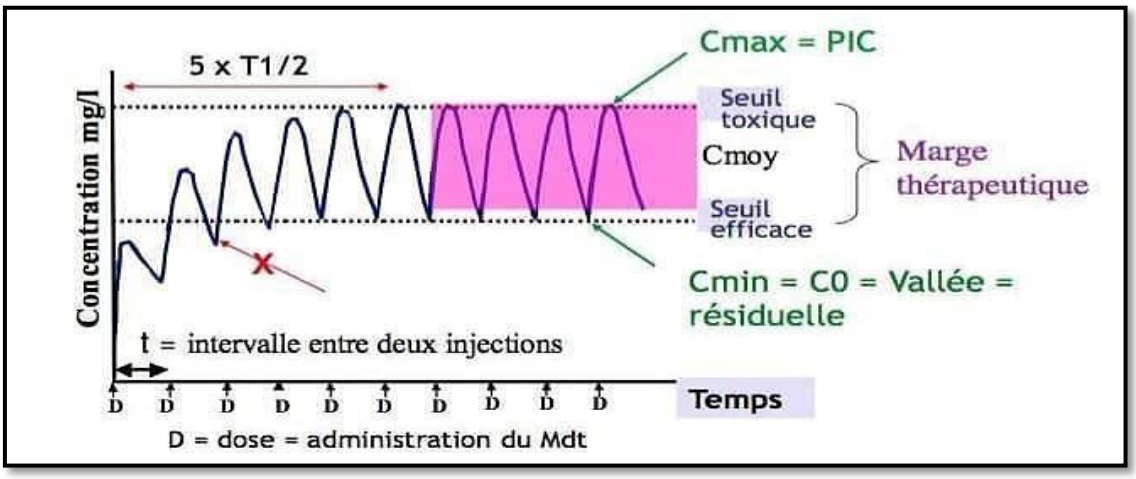


Figure 6 : Paramètres pharmacocinétiques du suivi thérapeutique pharmacologique. [42]

2.3.3 Étape post-analytique

2.3.3.1 Interprétation du résultat

- En perfusion continue : la zone thérapeutique est comprise entre 20 et 40 mg/L. Lors d'infections sévères la zone d'efficacité est de 35 à 45 mg/L sous surveillance étroite de la créatininémie et dosage au moins hebdomadaire de la vancomycinémie.

- En perfusion discontinue : l'évaluation de la réponse est basée sur la concentration résiduelle comprise entre 10 et 20 mg/L. [24-39]

Le taux résiduel peut être individualisé en fonction du germe isolé. Pour être actif en continuité, il doit être d'au moins 4 à 8 fois la CMI du germe selon la sévérité de l'infection afin d'éviter l'apparition de mutants résistants , on parle ici de la concentration des prévention des mutants résistants (CPM) . [24]

En cas d'endocardite à Staphylocoque doré, la concentration résiduelle doit être maintenue supérieure à 20 mg/L.

La concentration au pic plasmatique est comprise entre 20 et 40 mg/L. En pratique, elle a peu d'intérêt dans le cadre du STP de la Vancomycine antibiotique temps- dépendant.

Des concentrations > à 50 mg/L au pic et > à 20 mg/L en résiduel ont été associées à un risque de toxicité plus important. [24]

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

Le médicament n'est pas un produit anodin, il est rigoureusement contrôlé par des analyses depuis les matières premières jusqu'au produit fini et ce, dans le but de garantir trois critères fondamentaux : qualité, sécurité, efficacité [43]. Selon la célèbre citation de Paracelsus « seule la dose fait le poison », c'est la dose des substances médicamenteuses actives qui détermine leurs effets thérapeutiques et toxiques [44]. En effet, après administration, certains médicaments peuvent nécessiter la surveillance de leur taux plasmatique par une analyse biologique. Ces différentes analyses, pharmaceutiques comme biologiques, doivent être effectuées par des méthodes analytiques validées.

Le domaine de la bio-analyse s'est considérablement développé depuis les premières études sur le médicament, de plus, le développement de nouvelles techniques bio-analytiques a apporté une discipline progressive qui réserve de nombreuses perspectives d'amélioration.

Dans le domaine pharmaceutique, l'objectif de la bio-analyse est de mesurer quantitativement le médicament actif et/ou un (des) métabolite(s) à des fins de pharmacocinétique, de toxicocinétique, et de suivi thérapeutique.

La validation des méthodes bio-analytiques se réalise selon les directives de validation des méthodes bio-analytiques (BMV) par différentes procédures qui ont pour but de démontrer qu'une méthode particulière utilisée pour le dosage des analytes dans une matrice biologique donnée est sélective, sensible, fiable et reproductible pour l'usage prévu. [45]

1 Rôle de la validation dans l'assurance qualité

La qualité dans le domaine pharmaceutique est un critère indiscutable, aussi bien d'un point de vue commercial que réglementaire.

L'AFNOR (ISO 8402) définit cette qualité comme étant l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou d'un service qui lui confère l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites d'un client ou des utilisateurs [46]. En effet, dans l'analyse pharmaceutique comme biologique, d'importantes décisions sont prises en se basant sur des données obtenues à partir d'échantillons réel, de ce fait, il faut donc pouvoir garantir que tout

le processus en amont soit en mesure de produire des données fiables, c'est là qu'intervient le rôle de la validation dans l'assurance qualité.

Si la qualité d'une méthode analytique n'est pas confirmée, la décision de conformité ou non des produits finis, ou de la fiabilité ou non des résultats d'une bio-analyse, devient contestable.

C'est la raison pour laquelle l'assurance de la fiabilité de la méthode garantie par la validation est non seulement une exigence réglementaire, mais également un critère essentiel de l'assurance de la qualité, c'est donc un élément majeur pour la démonstration de la compétence des laboratoires accrédités, ainsi que l'une des étapes les plus importantes du processus d'introduction d'une procédure analytique dans la pratique.

2 Définition de la validation

La validation est une composante à part entière du cycle de vie d'une méthode analytique avant que cette dernière ne soit mise à l'usage de routine dans n'importe quel laboratoire, plusieurs définitions complémentaires ont été mise au point par les différents référentiels, documents et guides :

- **ISO/IEC 17025 :** « la confirmation par examen et la fourniture de preuves objectives que les exigences particulières pour l'utilisation prévue spécifique sont remplies » ; [47]
- **ICH Q2 (R1) :** « L'objectif de la validation des méthodes d'analyse est de démontrer qu'elles conviennent aux usages auxquels on les destine. » ; [48]
- **FDA** : « Valider une méthode consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevé et sous une forme documentée, que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications à l'avance. » ;
- **Pharmacopée américaine** : « Processus par lequel il est établi, par des études au laboratoire, que les caractéristiques de performance d'une méthode satisfont aux exigences pour ses applications analytiques prévues » ; [49]
- **Vocabulaire international de métrologie (VIM) :** « c'est la vérification, où les exigences spécifiées sont adéquates pour un usage déterminé ». [50]

3 But de la validation

L'objectif de la validation d'une méthode d'analyse donnée est de démontrer qu'elle est adéquate aux usages auxquels elle est destinée, de prouver sa conformité vis-à-vis des exigences réglementaires et normatives en vigueur et de donner aux laboratoires ainsi qu'aux autorités compétentes la garantie que chaque résultat qui sera donné, une fois la procédure validée, sera suffisamment fiable et proche de la vraie valeur (x) de l'échantillon, ou du moins compris dans une limite d'écart type acceptable. [51]

4 Procédures à valider

La validation étant une norme explicite, toutes les procédures analytiques doivent être validées.

Selon les normes EN-NF-ISO /CEI doivent être validées au laboratoire :

- Les méthodes non normalisées ;
- Les méthodes conçues et développées par le laboratoire ;
- Les méthodes normalisées employées en dehors de leurs domaines d'application prévues ;
- Les amplifications et les modifications de méthodes normalisées.

La validation doit être aussi étendue que l'impose la réponse aux besoins pour l'application ou le domaine d'application donné. [52]

5 Revalidation

Les méthodes analytiques sont des méthodes qui seront souvent amenées à évoluer. L'impact de ces évolutions sur la validation de la méthode n'est pas forcément absolu, et il sera évalué, pouvant passer d'un simple complément de validation à une revalidation complète de la méthode.

Si une méthode est modifiée ou appliquée dans un contexte différent comme l'usage d'une matrice d'échantillon différente, la modification de la voie de synthèse, de la composition du produit fini ou de la procédure analytique, une revalidation ou une vérification sera requise en fonction de l'étendue de la modification et de la nature de la nouvelle situation. Une revalidation sera nécessaire, par exemple, lorsqu'une méthode conçue pour une analyse urinaire est appliquée au sang, de même, une vérification sera nécessaire lorsqu'une colonne chromatographique de nature ou de dimension différente est utilisée (colonne reverse remplacée par une colonne chirale par exemple), voir même en cas de déplacement de l'appareil.

Aucune action n'est requise lorsqu'une modification n'est que faible, comme le remplacement d'une colonne chromatographique par une autre du même type quand celle-ci est qualifiée bien sûr. [53]

Selon les recommandations ICH 2005, une revalidation d'une procédure analytique quantitative requiert la détermination des paramètres de validation suivants uniquement :

- Linéarité ;
- Fidélité ;
- Spécificité ;
- Exactitude [54-55].

6 Aspect réglementaire et normatif

Les principaux référentiels qui décrivent les procédures de validation analytique sont les suivantes :

6.1 Documents ISO

- **ISO/CEI 17025 :** « Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais ». C'est une norme internationale élaborée dans le but de l'évaluation de la conformité, ainsi que l'organisation en continu de la qualité des laboratoires ; [56]
- **ISO 5725** « Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure ».Elle exprime le profil comme outil de décision. [57]

6.2 Documents ICH

Deux guidelines ICH (International Conference on Harmonization) sont dédiés à la validation analytique : Q2 :« validation analytique ».

- **ICH Q2A :** Text on validation of analytical procedures « definitions and terminology » 1995 : Textes qui regroupent les définitions et la terminologie qui doivent être prises en compte au cours de la validation des méthodes analytiques. [58]
- **ICH Q2B :** Text on validation of analytical procedures « Methodology » 1997 : son but est de fournir des conseils et recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique. En outre, le document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d'enregistrement. [59]
- **ICH Q2R1 :** Validation of analyticals procedures « Text and methodology » 2005. C'est une révision de l'ICHQ 2A et ICHQ 2B, dans le but de regrouper les textes de la terminologie et les définitions avec la méthodologie. [48]

6.3 Documents de la FDA (guidance for industry)

- Validation of chromatographic methods. FDA – November 1994 ;
- Validation of Bioanalytical Method 2001 ; [60]
- Analytical Procedures and Methods Validation. Guidance for Industry (Draft guidance). July 2015 ;
- Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. Guidance for Industry July 2015 ;
- Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program, 3rd Edition FDA, 2019. [61]

6.4 Documents des commissions SFSTP

Ils présentent les recommandations réglementaires communément admises et appliquées dans l'industrie pharmaceutique nationale et une démarche statistique pour la validation d'une procédure analytique.

- « Guide de validation, rapport d'une commission SFSTP » :
  I. Méthodologie 1992. [62]
  II. Exemples d'application 1992. [63]
- « Dosage dans les milieux biologiques par des méthodes chromatographiques »1997. [64]
- « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques » : exemple d'application de la stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP » paru dans STP Pharma Pratiques, en 1998. [65]
- « Validation des procédures analytiques : harmonisation des démarches » :
  - Partie I : généralités parues dans STP Pharma Pratique en 2003 ;
  - Partie II : statistiques parues dans STP Pharma Pratique en 2006 ;
  - Partie III : exemples d'application parus dans STP Pharma Pratique en 2006 et paru dans Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis en 2008. [66]
- SFSTP analyse des performances d'une méthode analytique : évaluation des risques lors d'une utilisation en routine en 2011.
- SFSTP 2012 : approche de capabilité. [67]

6.5 Documents AFNOR (normes AFNOR NF V 03-110)

Présentent les différents caractères de la validation des procédures analytiques (AFNOR 1994), le protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude et domaines d'application de la validation.

7 Méthodes d'analyse

7.1 Définition d'une méthode analytique

Une analyse chimique est une suite d'opérations rudimentaires, statistiquement indépendantes les unes des autres, qui commence par le prélèvement d'un échantillon analytique nommé prise d'essai et s'achève par l'expression d'un résultat qu'il faudra ensuite valider pour pouvoir mettre en place une donnée analytique.

L'analyse chimique s'encastre dans une procédure analytique qui doit à son tour être validée pour atteindre l'information chimique recherchée. [68]

Dans le domaine analytique, trois types de méthodes sont mentionnés à savoir les méthodes qualitatives, semi quantitatives et quantitatives. [69]

7.2 Méthodes bio-analytiques et interférences

La bio-analyse est une discipline très importante dans de nombreux domaines de recherche tels que le développement des médicaments, l'analyse médicale, l'évaluation toxicologique et dans les études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques.

L'analyse biologique couvre l'identification et la quantification de petits analytes (médicaments, métabolites) dans des matrices biologiques, mais également l'identification des macromolécules (protéines, peptides). [70]

En effet, les matrices biologiques contiennent une multitude de composés endogènes comme les protéines, les sels, et les phospholipides dans le plasma, souvent en concentration bien plus forte que les analytes à doser et qui sont susceptibles d'interférer au cours du dosage.

Pour prévenir les problèmes relatifs à la complexité des matrices biologiques, le prétraitement des échantillons est une étape clé qui précède la validation et l'analyse en générale. Il permet d'isoler, de purifier et de concentrer les analytes. [71]

Il peut se faire par les deux méthodes conventionnelles suivantes :

- La précipitation des protéines : généralement suivie d'une étape de centrifugation. Elle est rapide, facile à optimiser et ne nécessite pas d'équipements spéciaux.
- L'extraction : est une technique attractive dans la préparation des échantillons biologiques, elle peut être liquide-liquide, liquide-solide ou encore micro extraction liquide-liquide ou liquide-solide. [71-72]

7.3 Objectifs d'une méthode analytique

L'objectif principal d'une méthode analytique est sa mise en routine pour l'analyse de véritables échantillons de valeur inconnue.

En effet, l'objectif spécifique de chaque méthode analytique doit être prédéfini avant de se lancer dans la validation puisque chaque méthode doit être adaptée à un but donné. [73]

Ce que tout analyste attend d'une procédure analytique, c'est que la différence entre le résultat rendu (x) et la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon (μT), qui par ailleurs restera toujours inconnue, soit aussi faible que possible ou du moins inférieure à une limite d'acceptation. [73]

7.4 Cycle de vie d'une méthode quantitative

Le cycle de vie d'une méthode est un concept souligné dans la norme ISO 17025. [47]

Les méthodes d'analyse sont souvent décrites comme des procédures statiques, constantes et rigides. Or, comme tout procédé de production, les méthodes d'analyse naissent, évoluent et meurent. En effet, ce sont des entités vivantes qui passent par différentes phases interdépendantes, celles-ci caractérisent leur évolution au sein des laboratoires depuis leur création jusqu'à leur remplacement. [74]

En général, l'étape de validation vient après la mise au point complète de la méthode, pour qu'elle soit mise en routine avec une revue périodique suivie d'une revalidation ou un ajustement de(s) paramètre(s) afin d'élaborer un nouveau cycle de vie quand cela s'avère nécessaire.

Le cycle de vie d'une méthode de dosage est donc une succession de quatre grandes phases : sélection, développement, validation (interne /externe), usage en routine telles qu'illustrées dans la figure (7).

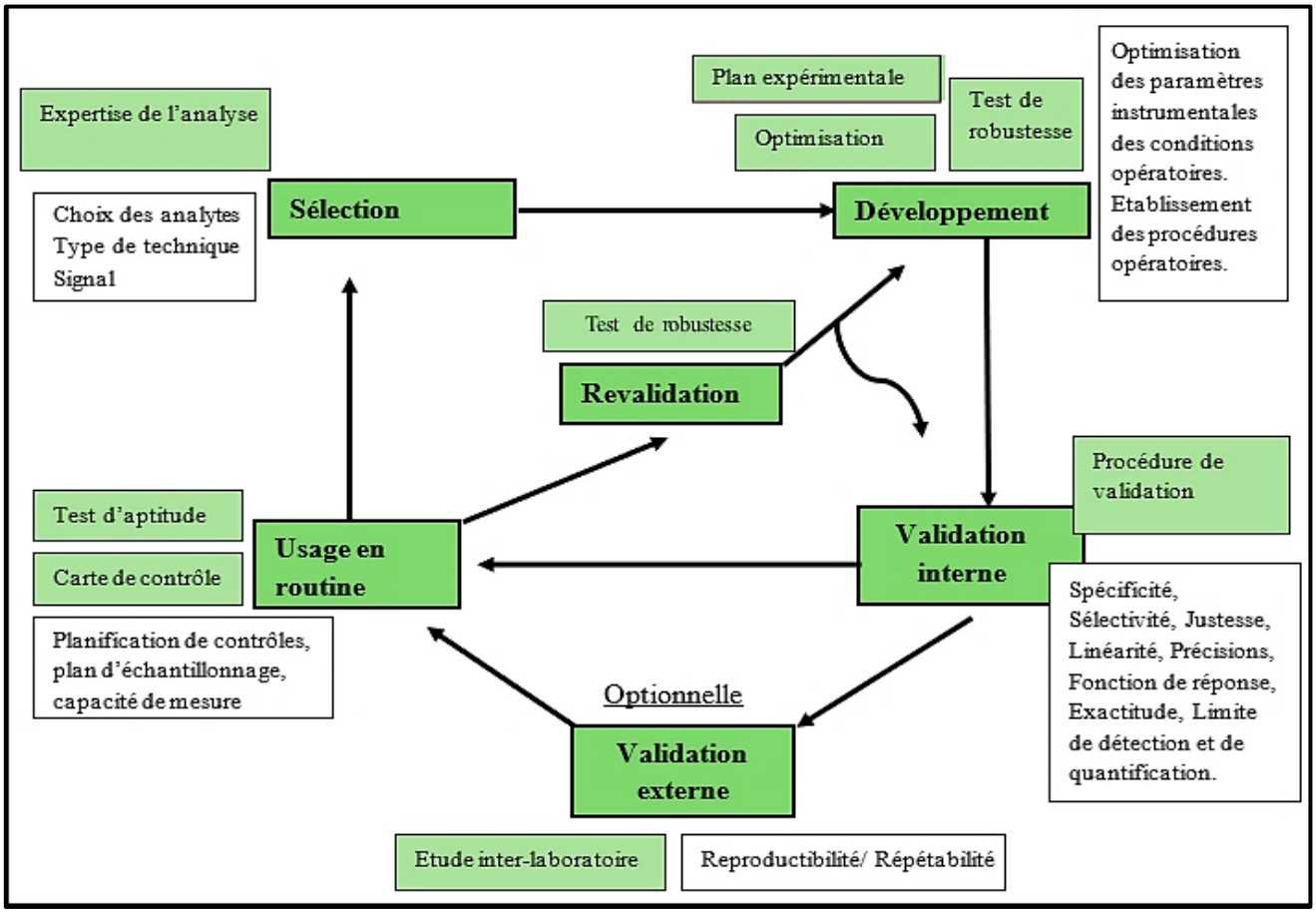


Figure 7 : Cycle de vie d'une méthode analytique. [75]

8 Critères de validation

Dans le but de démontrer la fiabilité d'une méthode analytique, et de prouver qu'elle est adéquate à l'usage auquel elle est destinée, la validation repose sur une analyse statistique fondée sur un certain nombre de critères.

En général, elle porte sur les critères de performances suivants :

- Spécificité/Sélectivité ;
- Linéarité ;
- Fidélité ;
- Justesse ;
- Exactitude ;
- Sensibilité ;
- Limite de détection ;
- Limite de quantification ;
- Robustesse ;
- Stabilité des solutions.

Un critère peut être quantitatif ou qualitatif. La linéarité et la spécificité sont qualitatives puisque l'objectif est de type binaire : conforme / non conforme. À contrario le coefficient de variation de la répétabilité est exprimé par une valeur numérique qui est le pourcentage d'où sa considération comme critère quantitatif. [76]

Les principaux critères de validation qui sont largement avérés et communément utilisés dans les laboratoires d'analyse présentent des confusions et des divergences par rapport à leurs terminologies, protocoles expérimentaux, critères d'acceptation et la nécessité de leur étude.

Une comparaison des définitions entre deux référentiels (ICH et SFSTP) se présente comme suit dans le tableau (IV).

Tableau IV : Comparatif des définitions entre deux principaux référentiels ICH et SFSTP.

Critères	SFSTP	ICH
Spécificité / Sélectivité	« La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents ». [66]	**La sélectivité** d'une méthode fait référence à la mesure dans laquelle elle peut déterminer un ou plusieurs analytes particuliers dans un mélange complexe sans interférence d'autres composants dans le mélange. Une méthode parfaitement sélective pour un analyte ou groupe d'analytes est dit spécifique. **La spécificité** est la capacité d'évaluer sans équivoque l'analyte en présence de composants dont la présence est attendue. Ceux-ci peuvent généralement inclure des impuretés, dégradants, matrices, etc. Le manque de spécificité d'une procédure analytique individuelle peut être compensé par d'autres analyses procédures. [77]
Fonction de réponse (courbe d'étalonnage)	« La fonction de réponse d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée courbe d'étalonnage ». [66]	
Linéarité	« La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (exemple : concentration) en analyte dans l'échantillon ». [66]	La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité (dans un intervalle donné) à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) de l'analyte dans l'échantillon. [48]

Justesse (biais)	« La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée » . [66]	
Fidélité (précision)	**Répétabilité :** « Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps ». [66] **Fidélité intermédiaire :** « Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné ». [66] **Reproductibilité :** « Conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents ». [66]	La précision d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures obtenues à partir de prélèvements multiples du même échantillon homogène dans les conditions prescrites. [48] **La répétabilité** exprime la précision dans les mêmes conditions de fonctionnement sur un court intervalle de temps. La répétabilité est également appelée précision intra-essai. [48] **La précision intermédiaire** exprime les variations au sein des laboratoires : jours différents, analystes différents, équipements différents. [48] **La reproductibilité** exprime la précision entre laboratoires études collaboratives, généralement appliquées à la normalisation de la méthodologie. [48]

Exactitude	L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ». L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité. [66]	L'exactitude d'une méthode d'analyse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée soit comme une valeur vraie conventionnelle, soit comme une valeur de référence acceptée, et la valeur trouvée. On parle parfois de justesse. [48]
Limite de détection	« La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure ». [66]	La limite de détection d'une procédure analytique individuelle est la plus petite quantité d'analyte dans un échantillon qui peut être détectée mais pas nécessairement quantifiée comme une valeur exacte. [48]
Limite de quantification	« La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie ». [66]	La limite de quantification d'une procédure analytique individuelle est la plus petite quantité d'analyte dans un échantillon qui peut être déterminée quantitativement avec une précision et une exactitude appropriée. La limite de quantification est un paramètre des essais quantitatifs pour les faibles niveaux de composés dans les matrices d'échantillons, et est utilisée en particulier pour la détermination des impuretés et/ou des produits de dégradation. [48]

Intervalle de dosage	« L'intervalle de dosage d'une procédure d'analyse est la région entre les niveaux supérieur et inférieur (ces valeurs incluses) pour laquelle il a été démontré que la procédure est appropriée quant à son exactitude (justesse + fidélité) et sa linéarité, en utilisant la méthode décrite ». [66]	L'intervalle de mesure d'une procédure analytique c'est l'intervalle entre la concentration (quantité) supérieure et inférieure de l'analyte dans l'échantillon (y compris ces concentrations) pour lequel il a été démontré que la procédure analytique présente un niveau approprié de précision, d'exactitude et de linéarité. [48]
Sensibilité	« La sensibilité d'une procédure d'analyse peut être définie comme étant le rapport de la variation de la réponse de la méthode d'analyse à la variation de la quantité d'analyte ». [66]	
Robustesse	La robustesse d'une procédure d'analyse est sa capacité à rendre des résultats exacts en présence de faibles changements de conditions expérimentales susceptibles de se produire dans l'utilisation de cette procédure. [63]	La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres de la méthode et fournit une indication de sa fiabilité dans des conditions normales d'utilisation. [48]

9 Choix des critères de la validation

Les critères à valider varient selon la méthode analytique utilisée et le but de l'analyse, ainsi que le référentiel pris en compte pour le domaine concerné**,** comme présenté dans le tableau (V).

Tableau V : Caractéristiques de performances à déterminer pour les méthodes qualitatives et quantitatives. [69]

Etape du processus de validation	Caractéristique		Caractéristiques de performances à déterminer en fonction du type de méthode	
			Qualitative	Quantitative
Caractéristiques intra-laboratoire	Spécificité		X	X
	Sensibilité		X	(X)
	Fonction d'étalonnage/efficacité			X
	Fidélité	Répétabilité	(X)	X
		Fidélité intermédiaire	X	X
	Justesse		Sans objet	X
	Exactitude (justesse + fidélité)		Sans objet	X
	Linéarité		Sans objet	X
	Limite de quantification		Sans objet	X
	Limite de détection		X	(X)
	Domaine de validité		X	X
Caractéristiques inter-laboratoires	Reproductibilité		X	X
	Répétabilité		(X)	X
	LOD		(X)	X
	LOQ		Sans objet	X
	Spécificité[b]		X	Sans objet
	Sensibilité[c]		X	Sans objet
	Autres caractéristiques non techniques à définir selon les points critiques et le cahier des charges (délai, rapidité efficience …)		X	X

Sans objet : caractéristique non pertinente
(x) : les caractéristiques inscrites entre parenthèses sont recommandées.
a : pour les méthodes analytiques quantitatives, l'exactitude représente toujours la combinaison de la justesse et de la fidélité.
b : le taux de faux positifs dans certains référentiels.
c : taux de faux négatifs dans certains référentiels.

10 Validation d'une procédure analytique quantitative par le profil d'exactitude

De nombreux documents officiels décrivant les critères de validation à tester ont largement contribué à faire progresser les validations analytiques, cependant, ils se limitent le plus souvent aux concepts généraux sans proposer de protocole expérimental entraînant donc des faiblesses

quant aux conclusions des tests réalisés et quant à l'aide à la prise de décision au regard des limites d'acceptation définies pour l'usage d'une procédure analytique.

C'est dans ce contexte, à partir de 2003 que la commission SFSTP a élaboré à côté des approches classiques une démarche harmonisée qui repose sur le profil d'exactitude comme outil décisionnel. [66]

Le principe de cette méthode à la fois statistique et expérimentale est d'entreprendre une démarche globale qui prend en compte l'erreur totale en combinant la justesse et la fidélité. La prise de décision est réalisée en se basant sur une représentation graphique qui présente les résultats en valeurs relatives par rapport à la valeur de référence du niveau comme illustré par la figure (8).

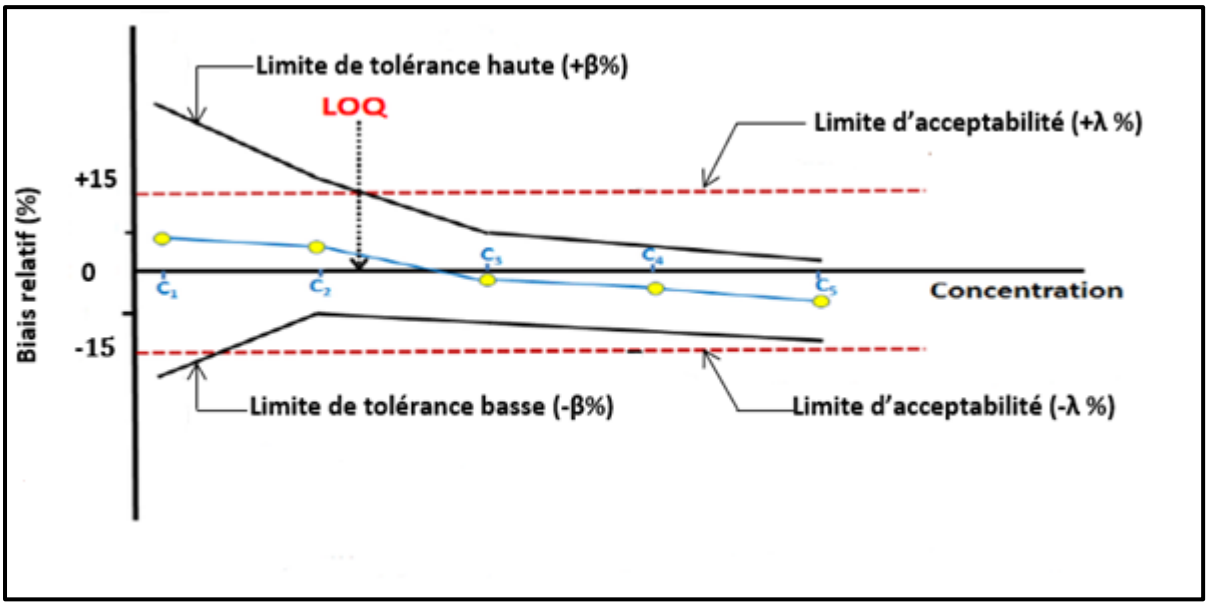


Figure 8 : Graphique du profil d'exactitude.[69]

Ce concept peut être traduit par l'équation 1 qui énonce que la différence entre une mesure (x) et sa vraie valeur (μ) doit être inférieure à la limite d'acceptation (λ) définie au préalable. [66]

$$-\lambda < x - \mu < \lambda \leftrightarrow |x - \lambda| < \lambda \quad \text{Equation 1}$$

Le seuil d'acceptation introduit comme un premier critère de décision est habituellement prédéfini à 1% ou 2 % pour le dosage de principes actifs dans une matière première, 5 % pour les formes pharmaceutiques et 15 % pour les analyses dans les matrices biologiques ou environnementales (la régularité étant plus difficile à obtenir, la marge est plus large). [73]

Une autre notion importante définie est celle de « bonne procédure analytique » avec un risque connu qui peut se traduire par la relation suivante [66] :

$$Prx\,[|x-\lambda| > \lambda] \leq \beta \quad \textbf{Equation2}$$

Avec β la proportion de mesures dans les limites d'acceptation.

Le risque associé à une procédure analytique dépend de son biais et de sa précision, il s'évalue par le taux de mesures en dehors des limites d'acceptation attendues comme l'indique la figure (9).

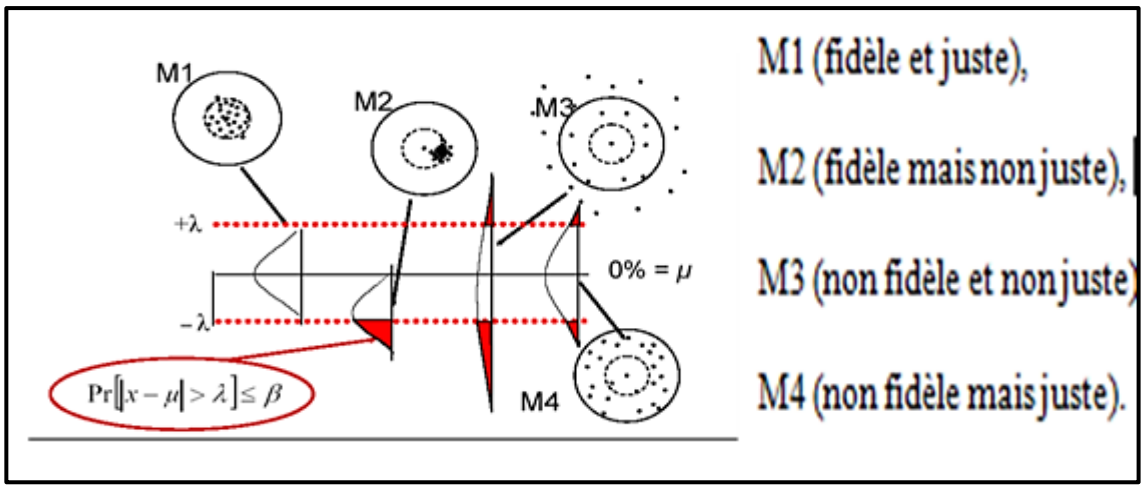


Figure 9 : Profil d'exactitude comme outil de décision pour quatre méthodes. [79]

Le profil d'exactitude est donc un outil à la fois pratique et visuel, qui permet de décider de la capacité ou non d'une procédure à fournir des résultats dans les limites d'acceptation mais aussi de contrôler le risque associé à son utilisation. [66]

11 Étapes de validation d'une méthode analytique en utilisant le profil d'exactitude

Une démarche rigoureuse est nécessaire pour toute validation analytique. C'est pourquoi, chaque étape doit être exécutée avec minutie pour obtenir les meilleurs résultats.

Ces étapes sont au nombre de dix :

- **Définition de la quantité mesurée :** à partir du mode opératoire, on définit les paramètres étudiés et la quantité mesurée en précisant les formules d'expression du résultat final et la procédure pour établir ce résultat ;
- **Précision des objectifs de la validation :** on définit au préalable le domaine d'application et les limites d'acceptabilité ;
- **Sélection des échantillons de validation :** les échantillons doivent être aussi représentatif que possible du domaine d'application de la méthode ;
- **Planification des essais de validation :** permet d'estimer les performances en routine de la méthode ;
- **Planification de l'étalonnage :** réservé aux méthodes indirectes, l'objectif est l'estimation des coefficients du modèle de la courbe d'étalonnage ;
- **Réalisation des essais et collecte des données :** c'est l'étape pratique ;
- **Calcul des concentrations prédites inverses :** recommandé pour les méthodes indirectes, pour calculer les concentrations prédites (estimées) retrouvées par étalonnage inverse ;
- **Calculer les critères de validation :** englobe le calcul de la justesse par série, la justesse et la fidélité par niveau et l'intervalle de tolérance ;
- **Construction du profil d'exactitude :** ce profil peut être construit de diverses manières en fonction du type de donnés traités dont la plus classique est celle du taux de recouvrement ;
- **Interprétation du profil d'exactitude pour la validation :** essentiellement par deux critères de décision (limites d'acceptabilité $\pm\lambda$ et la proportion). [80]

12 Protocole en phase de validation

Lors de la phase de validation, tous les résultats obtenus doivent être rapportés, au terme de cette phase et avant son exploitation en routine, la procédure analytique doit être intégralement décrite sous forme d'un mode opératoire standardisé. [81]

En raccord avec les référentiels et les lignes directrices, les principaux objectifs de la phase de validation sont :

- Valider la fonction de réponse ou le modèle d'étalonnage utilisé en routine ;
- Démontrer la spécificité ou la sélectivité ;
- Estimer la fidélité, la justesse et l'exactitude ;
- Valider les seuils de quantification (supérieurs et inférieurs) ;
- Valider l'intervalle de dosage ;
- Vérifier la linéarité de la procédure analytique. [81]

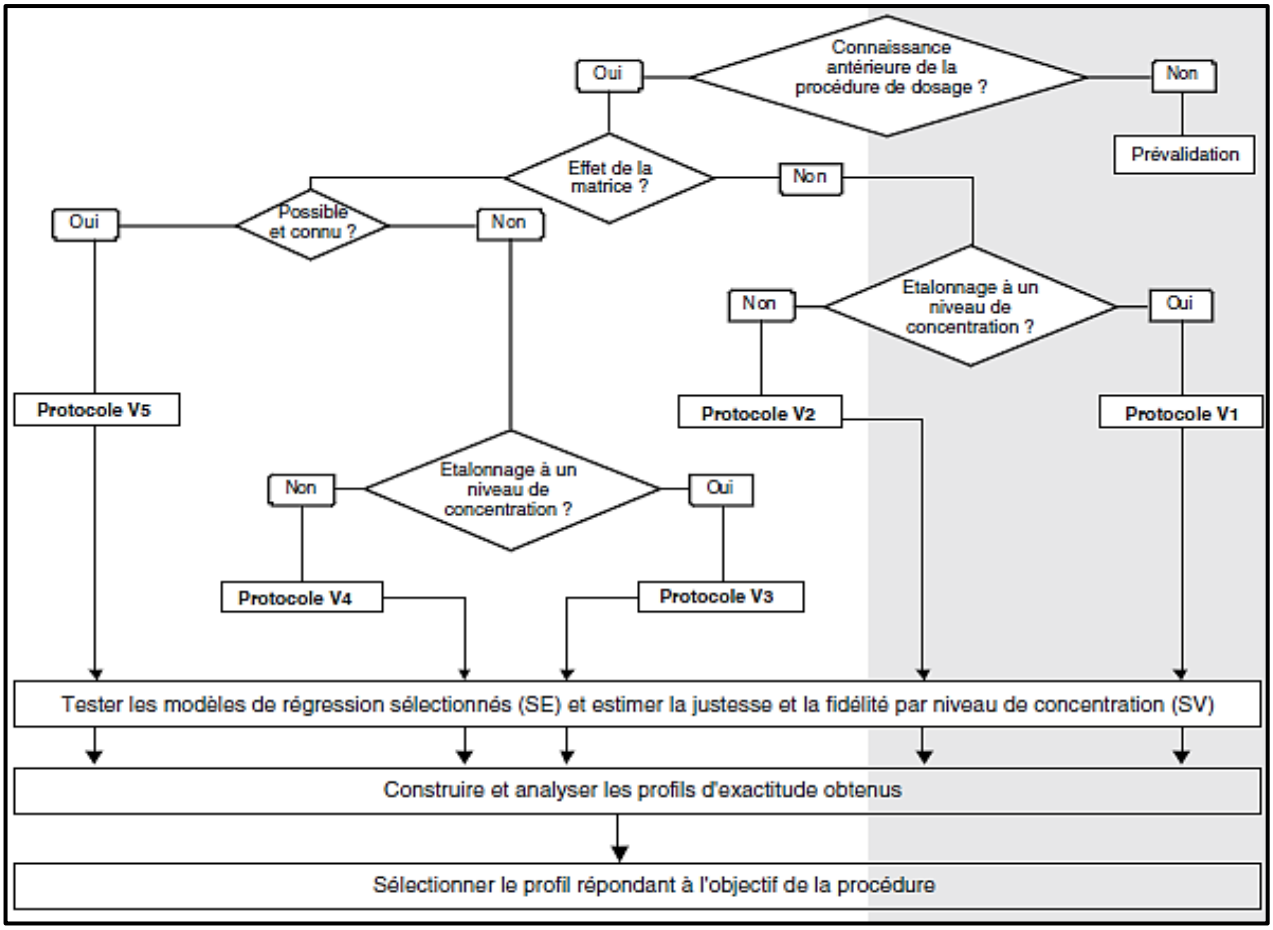
La commission SFSTP a suggéré divers protocoles pour la validation des méthodes d'analyse par le profil d'exactitude. La sélection d'un protocole expérimental doit prendre en considération les contraintes ou les spécificités associées à la méthode de dosage concernée

ainsi que son domaine d'application.

Dans un premier temps, l'analyste s'interrogera sur la présence ou l'absence d'effet matrice s'il dispose de suffisamment d'informations concernant la performance de la procédure comme la limite et l'intervalle de dosage, une pré-validation sera établie dans le cas contraire. [67]

Par la suite, la question se portera sur le (s) niveau (x) de concentration (s) qui seront utilisés pour l'étalonnage. En absence d'effet matrice, les protocoles V1 et V2 sont préconisés, dans le cas inverse le protocole V5 sera retenu. Dans le cas de situation intermédiaire et en fonction des degrés d'étalonnage souhaités le protocole V3 ou V4 sera suggéré. [66]

La démarche proposée dans le guide **SFSTP 2003** pour la sélection du protocole expérimental de la validation, selon les contraintes et les spécificités liées à la procédure de dosage, est montrée dans le logigramme suivant :



SE : standard d'étalonnage. SV : standard de validation

Figure 10 : Logigramme de sélection d'un protocole de validation. [66]

Après l'étude de la spécificité de la méthode d'analyse, on opère deux gammes de solution dont la préparation dépendra du protocole de validation choisi :

- **Standard d'étalonnage (SE)** : est réalisé sans la matrice (dans le cas d'absence avérée d'effet matrice) ou avec la matrice, utilisé pour établir une courbe d'étalonnage des fonctions de réponses y = f (x) afin d'effectuer les prédictions inverses par analogie.
- **Standard de validation (SV)** : est toujours réalisé avec la matrice, utilisé donc pour la détermination de l'erreur totale à chaque niveau de concentration, le calcul de l'intervalle de tolérance, la mise en place du profil d'exactitude et la détermination des limites inférieure et supérieure de quantification (intervalle de dosage).[82]

Pour chaque protocole, sont définis, les niveaux de concentrations des standards d'étalonnage et des standards de validation, le nombre de répétitions de chaque niveau, et le nombre minimum de séries d'analyses à effectuer, et donc le nombre minimum total d'essais à réaliser pour valider la procédure analytique en question. [66]

Le tableau (VI) présente le nombre total d'essais à réaliser pour valider une procédure analytique donnée en fonction du protocole.

Tableau VI : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi. [66]

Standards	Niveau de concentration	Protocoles				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE. Etalonnage sans la matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	$2^{(2)}$	2	$2^{(2)}$	
	Haut	$2^{(1)}$	2	$2^{(1)}$	2	
SE. Etalonnage avec la matrice	Bas				2	2
	Médian			2	$2^{(2)}$	$2^{(2)}$
	Haut			$2^{(1)}$	2	2
	Additif					$2^{(3)}$
SV. Validation avec la matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nbre minimum de séries		3	3	3	3	3
Nbre total essais (min)		33	45	39	63	45

(1) Sélection d'un niveau de concentration supérieure à la concentration cible pour l'étalonnage.
(2) Suppression possible du niveau de concentration médian pour l'étalonnage sur la base du modèle de régression retenu pour exprimer la fonction de réponse.
(3) Addition d'un niveau de concentration supplémentaire pour une fonction de réponse nécessitant un modèle plus complexe.

13 Etude statistique de la validation analytique

13.1 La spécificité

La spécificité d'une méthode d'analyse peut être évaluée par deux méthodes :

- Comparaison des signaux instrumentaux
- Les signaux obtenus à partir du diluant et du blanc plasma doivent être nul, c'est-à-dire absence de pics au temps de rétentions de (des) molécule (s) à doser.
- Les signaux obtenus à partir de la solution sans matrice et du plasma chargé doivent être comparables, autrement dit, présence des pics au même temps de rétention et avec des aires comparables. [81]

- Etude statistique

Comparaison des pentes $a1$ et $a2$ et des ordonnées à l'origine b1 et b2 des droites D1 et D2 des solutions sans matrice et celles avec matrice respectivement, en se basant sur le test t de Student, ainsi, si les deux pentes sont comparables, leur différence doit être non significative. (Annexe IV)

On a donc :

$$t_{calculé} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\sigma^2 a_1 + \sigma^2 a_2}}$$

La valeur du $t_{calculé}$ est comparée à la valeur théorique t° (α ; n1 + n2 - 4) lue sur la table de Student.

Avec :

- $\sigma^2 \alpha_1 et\ \sigma^2 \alpha_2$: les variances des pentes $a1$ et $a2$ des droites D1 et D2 respectivement ;
- n1 + n2 : étant le nombre d'échantillons réalisés pour la gamme de solution sans matrice et la gamme de solution avec matrice ;
- n1 + n2 – 4 : degré de liberté (ddl) ;
- α : risque accepté.

Si $t_{calculé}$ < t° on déduit que les pentes sont comparables au risque α, ce qui témoigne l'absence de l'effet matrice, la méthode est donc spécifique. [55]

13.2 Fonction de réponse

Les mesures effectuées sur les standards d'étalonnages permettent de déterminer la relation entre la réponse Y donnée par l'instrument et la concentration X des solutions. Cette relation est une fonction de type :

$$Y = f(X) + \varepsilon$$

Avec ε, l'erreur résiduelle associée à la fonction de réponse.

Cette fonction ne sera pas forcément linéaire, mais elle doit être strictement monotone sur l'intervalle de dosage envisagée. La fonction de réponse doit être ajustée, en évaluant ses paramètres de façon à ce que l'erreur résiduelle ε soit la plus faible possible. [81]

En fonction de la méthode utilisée, diverses fonctions de réponses peuvent être envisagées lors de la validation.

Quelques exemples de ces fonctions sont résumés dans le tableau (VII).

Tableau VII : Exemple de fonctions de réponses. [81]

Type	Equation	Paramètres	Linéarité
Droite passant par l'origine	$Y = \beta X$	β	Oui
Droite	$Y = \alpha+\beta X$	β, α	Oui
Fonction quadratique	$Y = \alpha+\beta X + \gamma X^2$	β, α, γ	Oui
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left(\frac{X}{\gamma}\right)^{\beta}}$	$\beta, \alpha, \gamma, \delta$	Non
Fonction logistique à 5 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta-\alpha}{\left[1+\left(\frac{X}{\gamma}\right)^{\beta}\right]^{\varphi}}$	$\beta, \alpha, \gamma, \delta, \psi$	Non

Pour la plus grande partie des méthodes physico-chimiques, le choix se portera sur des droites pouvant passer par l'origine ou non. Pour ce qui est des méthodes bio-analytiques, la fonction quadratique peut être adoptée dans certains cas. Quant aux immuno-dosages, ils auront recours aux fonctions logistiques à 4 ou à 5 paramètres. [81]

Certaines transformations mathématiques peuvent être appliquées à la concentration X ainsi qu'à la réponse Y, tel que le logarithme népérien, ou la racine carrée.[66]

13.3 Alignement des observations

Si, pour un niveau donné de concentration, les quantités introduites ne sont pas similaires pour toutes les séries (souvent pour de raisons de pesées qui doivent être indépendantes), il faut impérativement procéder à un alignement sur la concentration moyenne dès lors qu'un calcul de variance doit être effectué (estimation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire). Cela consiste en la transformation des réponses observées afin de les aligner sur cette concentration moyenne.

Cet alignement s'effectue par interpolation en ajoutant à la réponse observée la différence entre la valeur de la fonction de réponse considérée à la concentration moyenne et la valeur de cette fonction à la concentration introduite. [81]

En validation, l'alignement s'applique aux réponses obtenues avec les échantillons de validation en utilisant les équations ou fonctions de réponses obtenues avec les standards d'étalonnage. Ainsi l'alignement des n_{ij} répétitions du niveau de concentration j de la série i s'effectue comme suit **:**

$$y_{ijk,c} = y_{ijk} + f(\bar{x}_{ij}) - f(x_{ijk})$$

Avec : $\bar{x_{ij}}$: moyenne des concentrations introduites du niveau j de la série i.

x_{ijk} : concentration introduite du niveau j de la série i répétition k. [81]

Les règles d'alignement pour les différentes fonctions de réponses sont résumées dans le tableau (VIII).

Tableau VIII : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses. [81]

Fonction de réponse	Règle d'alignement
Droite passant ou non par l'origine	$Y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}]$
Fonction quadratique	$Y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}] + \hat{\gamma}_i [\bar{x^2}_{ij} - x^2_{ijk}]$
Logistique à 4 paramètres	$Y_{ijk,c} = y_{ijk} + (\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i) \left[\frac{1}{1+(\frac{\hat{Y}_i}{\bar{x}_{ij}})^{\hat{\beta}_i}} - \frac{1}{1+(\frac{\hat{Y}_i}{x_{ijk}})^{\hat{\beta}_i}} \right]$

13.4 Prédictions inverses

Réservées pour les méthodes indirectes et consistent à calculer les concentrations prédites (dites aussi estimées ou retrouvées) par étalonnage inverse, selon cette formule [66] :

$$x_{calc} = f^{-1}(y)$$

Avant d'appliquer cette fonction, il faut d'abord garantir l'alignement de l'intégralité des concentrations. Le tableau (IX) illustre ces prédictions en fonction de l'alignement des fonctions réponses utilisées.

Tableau IX : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses. [81]

Fonction de réponse	Concentration calculée
Droite passant par l'origine	$x_{ijk,calc} = \frac{Y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$
Droite	$x_{ijk,calc} = \frac{Y_{ijk}-\hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}$
Fonction quadratique	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i+\sqrt{\hat{\beta}^2{}_i-4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i-Y_{ijk})}}{2\hat{\gamma}_i}$
Fonction logistique à 4 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{y}_i(\frac{\hat{\delta}_i-\hat{\alpha}_i}{y_{ijk}-\hat{\alpha}_i}-1)^{\frac{1}{\beta_i}}$
Fonction logistique à 5 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{y}_i\left[\left(\frac{\hat{\delta}_i-\hat{\alpha}_i}{y_{ijk}-\hat{\alpha}_i}\right)^{\frac{1}{\psi_i}}-1\right]^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

Un remplacement des $y_{ijk\,c}$ par les y_{ijk}, est effectué (dans le tableau ci-dessus) si les observations ont été alignées. Il faudra aussi effectuer des transformations inverses si des transformations mathématiques ont été réalisées. [81]

13.5 Calculs de justesse et fidélité

13.5.1 Modèle

Pour déterminer ces deux paramètres, on doit commencer par leur estimation qui se réalise avec les concentrations calculées provenant des standards de validation. [81]

$$X_{ijk} = \mu_j + \alpha_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Avec :

- X_{ijk} : K-ième concentration calculée du niveau j de la i-ème série.
- μ_j : moyenne des concentrations calculées de niveau j.
- α_{ij} : variable aléatoire qui suit une loi normale de moyenne nulle et de variance σ^2,

Pour un niveau de concentration j cette variable est égale à l'écart entre la moyenne de la i-ème série et la moyenne µj, traduisant ainsi l'effet série.

- ε_{ijk} : est l'erreur expérimentale, considérée comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma^2{}_{W,\,j}$. Cette erreur est supposée

indépendante de la série. [81]

Les variances $\sigma^2_{B,j}$ et $\sigma^2_{W,j}$ représentent les variances inter-séries et intra-série respectivement.

La méthode des moindres carrés est utilisée pour estimer à chaque niveau de concentration j les paramètres μ_j, $\sigma^2_{B,j}$, $\sigma^2_{w,j}$ du modèle. [81]

13.5.2 Justesse

Dans le cadre d'une validation analytique, la justesse est obtenue en calculant la différence entre la moyenne des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées. Cette différence peut être exprimée sous forme de biais absolu, relatif, ou de taux de recouvrement selon les formules suivantes [81] :

- Le biais absolu : $$biais_j = \hat{\mu}_j - \bar{x}_j$$

- Le biais relatif : $$biais\ (\%) = \frac{\hat{\mu}_j - \bar{x}_j}{\bar{x}_j} \times 100$$

- Le taux de recouvrement : $$Recouvrement\ (\%) = \frac{\hat{\mu}_j}{\bar{x}_j} \times 100$$

Ce taux de recouvrement fournit une indication sur la proportion de ce qui a été dosé par rapport à ce qui est attendu. [81]

Avec :

- μj : la moyenne des concentrations calculées (retrouvées) du niveau j ;
- xj: la moyenne des concentrations introduites du niveau j. [81]

13.5.3 Fidélité

La fidélité d'une méthode peut être effectuée à trois niveaux qui seront : la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité.

Dans le cadre de la validation analytique d'une méthode destinée à être utilisée au sein d'un seul laboratoire, les conditions étudiées seront uniquement la répétabilité et la fidélité

intermédiaire.

L'estimation de la reproductibilité n'est envisageable que dans le cadre d'une validation en inter-laboratoire. [81]

❖ Calcul de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire :

- Répétabilité :

$$\hat{\sigma}^2_{W,j} = \frac{SCE_r}{I(k-1)}$$

Avec :
SCE_r : la somme des carrés des écarts intra-série ;
I : le nombre de séries ;
K : le nombre de répétitions par série.

Cette évaluation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité. [81]

L'écart type de répétabilité est donc retrouvé par la racine carrée de la variance de répétabilité comme le décrit l'équation suivante :

$$\hat{\sigma}_{W,j} = \sqrt{\hat{\sigma}^2 w,j}$$

À partir de la variance intra série on pourra également calculer la variance inter-série :

$$\hat{\sigma}^2_{B,j} = \frac{\left(\frac{SCE_B}{I-1} - \hat{\sigma}^2_{w,j}\right)}{k}$$

La somme des estimations des variances intra et inter série donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire.

- Fidélité intermédiaire [49] :

$$\hat{\sigma}^2_{IP,j} = \hat{\sigma}^2_{w,j} + \hat{\sigma}^2_{B,J}$$

L'ensemble des équations est résumé dans la figure (11) suivante :

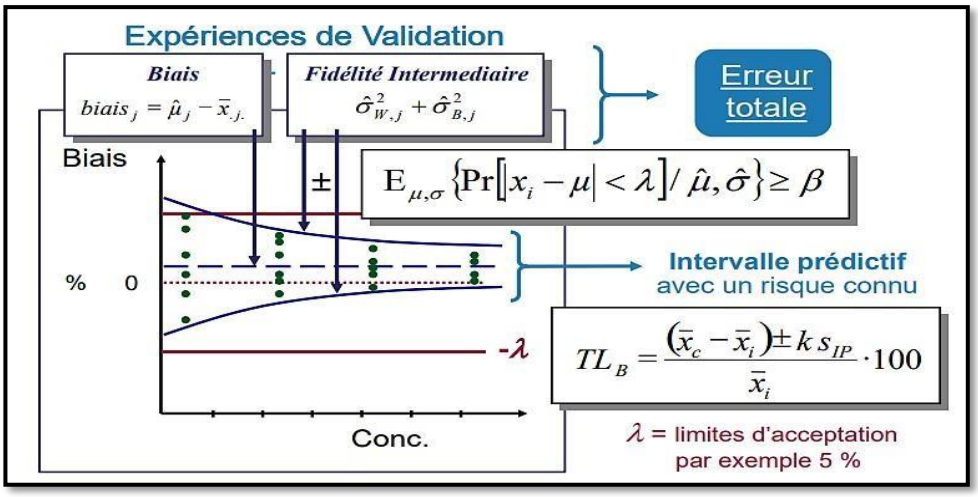


Figure 11 : Représentation graphique des équations. [83]

13.6 Exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée comme telle, appelée également "valeur conventionnellement vraie". [81]

L'exactitude peut être exprimée :

- En valeur absolue :

$$Exactitude\ (\%) = \frac{X-\mu}{\mu} \times 100$$

- En valeur relative :

$$Exactitude\ (\%) = \frac{X-\mu}{\mu} \times 100$$

Avec :
X : la concentration prédite pour chaque mesure ;
μ : la concentration introduite.

Pour les mêmes données, l'erreur maximale relative observée pour chaque modèle de fonction de réponse utilisé nous donne une indication sur son efficacité relative et met en évidence l'impact du choix de la fonction de réponse sur l'exactitude des résultats. [81]

13.7 Erreur totale et profil d'erreur totale

Chaque mesure obtenue (X) reflète la vraie valeur du biais de la méthode et de sa fidélité, ce qui s'exprime comme suit [81] :

$$X = \mu + |Biais|_{procédure} + Fidélité\ intermédiaire_{procédure}$$

$$X - \mu = |Biais|_{procédure} + Fidélité\ intermédiaire_{procédure}$$

$$X - \mu = Erreur\ total_{procédure} = \text{Erreur de mesure}$$

La figure (12) suivante illustre parfaitement les concepts d'exactitude, de fidélité et de justesse.

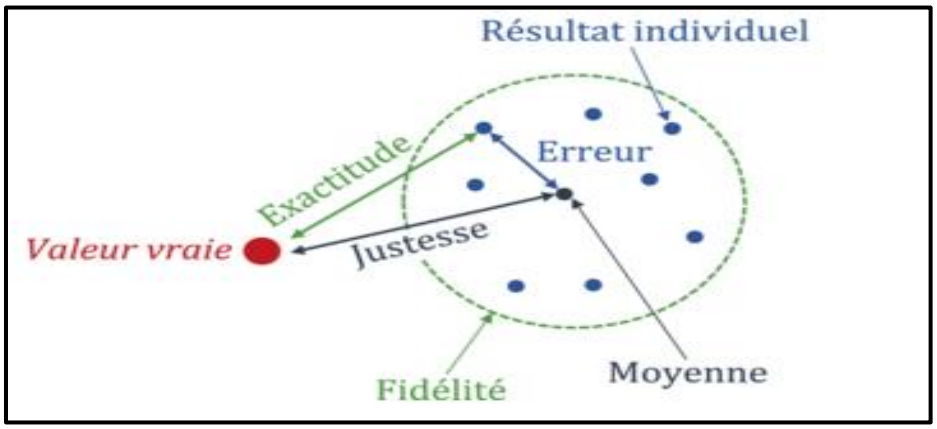


Figure 12 : Représentation des concepts d'exactitude, de fidélité et de justesse. [84]

Ces formules prouvent que l'erreur totale d'une procédure analytique évalue son aptitude à produire des résultats exacts (relation de proportionnalité inverse). C'est la somme des erreurs systématique et aléatoire qui se définissent comme suit :

- **Erreur systématique** : provient d'une défaillance dans le système d'analyse et se caractérise par une déviation de tous les résultats dans le même sens. Elle sera observée tant que la cause n'est pas éliminée et conditionne la justesse de la méthode.
- **Erreur aléatoire** : elle s'intéresse à toute déviation positive ou négative des mesures répétées d'un même échantillon par rapport à la moyenne calculée. Elle est imprévisible et incontrôlable, due par exemple aux erreurs de manipulations et conditionne la fidélité de la méthode. [85-86]

13.8 Calcul de l'intervalle de tolérance

L'intervalle de tolérance est l'intervalle dans lequel on s'attend à avoir une proportion (β%) des futurs résultats.

Il caractérise la dispersion des résultats déjà obtenus et donne une prévision ou une garantie de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultats dans le futur.

L'estimation des paramètres du biais et de la variance μ_j, $\sigma_{B,j}$ et $\sigma_{w,j}$ à chaque niveau de concentration j, a pour but de permettre l'estimation de la proportion attendue des résultats dans les limites d'acceptation prédéfinies [-λ, +λ], c'est-à-dire :

$$E_{\hat{\mu}_M,\hat{\sigma}_M}\{P\,[|X-\mu_T|<\lambda]\hat{\mu}_M,\hat{\sigma}_M\}\geq\beta$$

L'intervalle de tolérance (IT) est calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation comme suit :

- En valeur absolue :

$$E_{\hat{\mu}_M,\hat{\sigma}_M}\{P_X\,[\hat{\mu}_M-K\,\hat{\sigma}_M<X<\hat{\mu}_M+K\,\hat{\sigma}_M/\hat{\mu}_M,\hat{\sigma}_M\,]\}=\beta$$

- En échelle relative ce même intervalle devient :

$$biais\ (\%)j-Qt(\nu;\tfrac{1+\beta}{2})\sqrt{1+\tfrac{1}{PnB^2j}}\,CV_{FI,j};biais\ (\%)_j+Q_t(\nu;\tfrac{1+\beta}{2})\sqrt{1+\tfrac{1}{pnB^2j}}\,CV_{FI,j}$$

Les coefficients intervenant dans cette formule sont déterminés de cette façon :

- Écart type de fidélité intermédiaire : $\sigma_{FI,j}=\sqrt{\sigma_{w,j}^2+\sigma_{B,j}^2}$
- Coefficient B : $\mathbf{B}=\sqrt{\frac{Rj+1}{nRj+1}}$
- Rapport de variances R : traduit l'importance relative de l'effet jour (ou série) par rapport à la répétabilité (en termes de variances) : $\mathbf{R}=\frac{\sigma_{B,j}^2}{\sigma_{w,j}^2}$

- Facteur de couverture de l'IT : connu aussi sous le nom de facteur d'élargissement, il est conditionné par la valeur choisie de β et rend compte de la proportion de futures mesures qui sera prédite par l'IT :

$$Q_t = \left(t_{\nu,\frac{1+\beta}{2}}\right), \nu \text{ est le nombre de degré de liberté :}$$

$$\nu = \frac{(R+1)^2}{\frac{(R+\frac{1}{n})^2}{p-1} + \frac{1-\frac{1}{n}}{pn}}$$

Avec :

p : nombre de séries ;
n : nombre de répétitions ;
L'écart type de l'IT = L'écart type de fidélité intermédiaire × Le rapport de variances. [80]

Deux termes sont contenus dans l'intervalle de tolérance : l'un étant la justesse et l'autre étant, un facteur près, le coefficient de variation de fidélité intermédiaire. C'est pour cela que cet intervalle peut être considéré comme une expression de l'exactitude des résultats.
Mais l'intervalle de tolérance intègre une dimension en plus, à savoir, le risque pour des résultats futurs, conditionnellement à des résultats passés.
La méthode peut dès lors être considérée comme exacte au niveau de chance β pour le niveau de concentration en question, quand l'intervalle de tolérance est inclus dans les limites (-λ, +λ) définies à priori en fonction des objectifs de la méthode. [81]

13.9 Profil d'exactitude

Selon l'équation du biais, les limites de ces intervalles sont :

- L_j(Borne supérieure) $= biais(\%)_j - Q_t\ (\nu,\frac{1+\beta}{2})\sqrt{1+\frac{1}{pnB^2{}_j}}\ cv_{FI,j}$

- U_j(Borne inférieure) $= biais(\%)_j + Q_t\ (\nu,\frac{1+\beta}{2})\sqrt{1+\frac{1}{pnB^2{}_j}}\ cv_{FI,j}$

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes L_j entre elles ($L_j \ldots L_m$) et d'autres part les bornes U_j entre elles ($U_j \ldots U_m$). [81]

13.10 Linéarité

La linéarité de la relation entre les concentrations prédites (x_p) et les concentrations introduites (x_i) est estimée par l'évaluation de la fonction [$x_p = f(x_i)$] obtenue à partir des moyennes des répétitions de chaque niveau de concentration des standards de validation pour les trois séries de validation.

Cette droite de régression est analysée statistiquement par comparaison de la pente à la valeur de référence 1 et l'ordonnée à l'origine à la valeur de référence 0 au moyen du test t de Student. [51]

Pour conclure à une linéarité de la méthode la pente devra être proche de 1 et l'ordonnée à l'origine proche de 0.

La linéarité de la méthode est illustrée par la figure (13) :

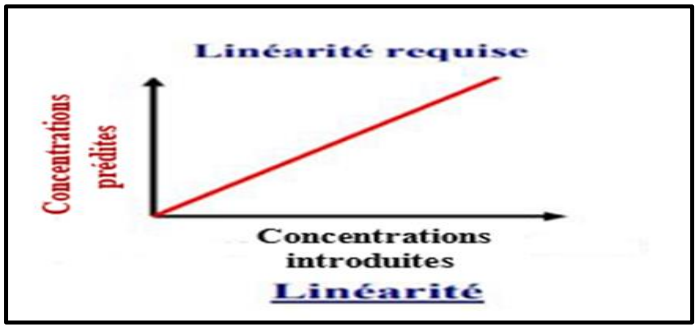


Figure 13 : La courbe de linéarité. [85]

13.11 Limite de quantification

Les limites de quantification sont les valeurs extrêmes qui peuvent être quantifiées avec une exactitude définie ; en d'autres termes, ce sont les deux bornes inférieure et supérieure de l'intervalle de dosage.

Les limites de quantification haute et basse représentent le carrefour entre le profil d'exactitude (les limites de tolérance) et les limites d'acceptation. Ce profil d'exactitude se trace en partant des aléas totaux calculés et des limites d'acceptation prédéfinies. [81]

Selon la SFSTP 1992, le seuil de quantification est la plus petite quantité d'une substance à examiner pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une fidélité et une exactitude définies, il est estimé par la formule de calcul suivante : $LQ = X_{blanc} + 10\ S_{blanc}$

Avec : X et S, la valeur moyenne et l'écart type sur les n mesures de blancs respectivement et $X_{blanc} = 0$ si le blanc est déduit de chaque mesure (auto zéro). [62]

Partie pratique

CHAPITRE I : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le suivi thérapeutique pharmacologique de la Vancomycine est indispensable chez certains patients puisqu'il assure un traitement approprié en accommodant la posologie. Malgré le risque des interférences, la technique de référence pour cette bio-analyse est immunologique, cependant, elle pourrait être remplacée par la technique chromatographique HPLC, compte tenu de sa haute spécificité et sensibilité.

L'objectif de ce projet de fin d'étude est donc de mettre au point et de valider une nouvelle méthode de dosage de cet antibiotique dans le plasma humain par Chromatographie Liquide à Haute Performance à détection par UV (HPLC-UV).

La pratique de ce projet de fin d'étude a eu lieu aux laboratoires de Chimie Analytique et de Biochimie du département de pharmacie de Tizi Ouzou, sur une durée de 6 mois, et cela conformément aux directives de la commission de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP) publiées dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006.

1 MATÉRIEL

1.1 Matières premières

L'accomplissement de la présente partie pratique a nécessité les matières premières résumées dans le tableau X.

Tableau X : Matières premières utilisées dans ce présent travail.

Matières premières	Fournisseurs
Vancomycine	Principe actif du laboratoire pharmaceutique Mylan.
Céfotaxime	Principe actif du laboratoire pharmaceutique Sophal.
Le plasma humain frais congelé (PFC)	Fourni gracieusement par le Centre de Transfusion Sanguine de Tizi Ouzou.

1.2 Réactifs

Les réactifs exploités dans ce travail sont avancés dans le tableau (XI) et illustrés dans la figure (14).

Tableau XI : Les réactifs utilisés dans ce présent travail.

Réactifs	Fournisseurs	Propriétés physicochimiques	Précautions d'emplois
Méthanol grade HPLC	HONEYWELL Riedel-de-Haë n™.	Formule brute : CH_3OH Mr = 32,04 g/mol Pureté ≥ à 99,9% N° CAS : 67-56-1	
Phosphate de sodium monobasique	SIGMA-ALDRICH.	Formule brute : NaH_2PO_4 Mr = 119,98 g/mol Pureté : 98-100,5 % N° CAS : 7558-80-7	Aucune.
Acide phosphorique	HONEYWELL Fluka™.	Formule brute : H_3PO_4 Mr = 98 g/mol Pureté : 85-88% N° CAS : 7664-38-2	
Acide perchlorique	SIGMA-ALDRICH.	Formule brute : $HCLO_4$ Mr = 100,46 g/mol Pureté : 70-72% N° CAS : 7601-90-3	
Acétonitrile grade HPLC	HONEYWELL Riedel-de-Haë n™.	Formule brute :C_2H_3N Mr : 41,05 g/mol Pureté :99.9% N° CAS : 75.05.8	
Acide trichloracétique	SIGMA-ALDRICH.	Formule brute :$C_2HCl_3O_2$ Mr : 163,38 g/mol Pureté :99% N° CAS : 76-03-9	

Eau purifiée	Laboratoire central Hôpital Belloua - CHU de Tizi Ouzou.	Formule brute : H_2O N° CAS : 7732-18-5 Mr : 18,02 g /mol	Aucune.

Figure 14 : Les réactifs employés dans ce présent travail.

1.3 Appareillages et équipement

L'HPLC adoptée dans ce dosage est représentée dans le tableau (XII) et la figure (15).

Tableau XII : Système HPLC employé pour ce dosage.

Désignation	Modules	Spécification	Usage
HPLC SHIMADZU LC20	Pompe	Lc-20AT	Séparation, dosage et obtention des chromatogrammes.
	Injecteur automatique	SIL-20A	
	Contrôleur	CBM-20A	
	Compartiment de la colonne	CTO-20A	
	Colonne	Purospher STAR C18 (25cm)	

	Détecteur	Spectrophotomètre UV-Visible SPD-20AV	
	Logiciel d'exploration	LC-solution	

Figure 15 : Chaine HPLC utilisée dans la présente partie pratique.

Les autres équipements nécessaires à l'accomplissement de la présente partie expérimentale sont indiqués dans le tableau (XIII) et la figure (16).

Tableau XIII : Appareillage utilisé dans ce présent travail.

Désignation	Spécification	Usage
Spectrophotomètre UV-Visible	(Perkin Elmer Lambda 25) Double faisceaux	Réalisation d'un scan pour obtenir des spectres et des longueurs d'onde d'absorption.
Pompe à vide	Fisher bioblock scientific Pmax = 4 bars	Filtration de la phase mobile sous vide.
Agitateur magnétique	NAHITA ModeL 690-1	Homogénéisation de la solution de l'acide et de la base conjuguée pour obtenir le tampon et déterminer son pH.

Agitateur vortex	IKA MS 3 digital	Agitation par vibration des tubes.
Balances analytiques	KERN METTLER TOLEDO	Pesée des différentes poudres.
Etuve	MEMMERT	Séchage de la verrerie.
Hotte	FUME HOOD LabTech	Extraction des vapeurs toxiques des produits utilisés lors des manipulations (dilution de l'acide perchlorique).
pH-mètre	METLER TOLEDO	Détermination du pH du tampon de la phase mobile.
Purificateur d'eau	ELGA	Production de l'eau purifiée.
Centrifugeuse	Hettich-EBA 20	Centrifugation des échantillons, étape ultime du procédé d'extraction.

Figure 16 : Equipement utilisé dans ce présent travail.

1.4 Verreries et autres

La verrerie et le matériel utilisés dans l'exécution de ce travail sont ceux du laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou et sont résumés dans le tableau (XIV) et illustrés par la figure (17).

Tableau XIV : Verrerie et matériels utilisés dans ce présent travail.

Verrerie	Matériel consommable	Matériel accessoire
- Fioles jaugées : 25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL ; - Béchers ; - Pipettes jaugées : 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL ; - Entonnoirs ; - Vials pour HPLC ; - Erlenmeyers ; - Eprouvette 50 mL ; 100 mL.	- Tubes à essai ; - Embouts bleus et jaunes ; - Filtre membrane 47 mm, pores 0,45 µm millipores ; - Gants.	- Comptes gouttes ; - Pompe à crémaillère ; - Pissettes ; - Spatules ; - Bouchons ; - Micropipettes 1000 µL et 50 µL ; - Portoires ; - Barreaux magnétiques

Figure 17 : Les instruments et ustensiles employés dans cette pratique.

2 MÉTHODES

2.1 Principe de la méthode de dosage

Dans ce travail, le dosage de la Vancomycine a été effectué par Chromatographie Liquide à Haute Performance à détection par UV (HPLC-UV), technique qui met à profit la capacité de la Vancomycine à absorber dans le domaine de l'Ultraviolet à une longueur d'onde de 220 nm, le mode de séparation est le partage dans une colonne à polarité de phase inversée.

La quantification a été réalisée par la méthode d'étalonnage interne afin d'augmenter la répétabilité et la reproductibilité de la méthode en corrigeant les pertes pendant la préparation de l'échantillon et son analyse.

Le Céfotaxime a été choisi comme étalon interne puisque c'est un antibiotique doué de propriétés physicochimiques proches de celles de la Vancomycine, ce n'est pas un constituant naturel du plasma, il est résolu par rapport à la molécule étudiée, inerte chimiquement et disponible.

2.2 Optimisation de la méthode

Afin de mettre au point une nouvelle méthode de dosage de la Vancomycine et d'obtenir des conditions pré analytiques et analytiques adéquates pour une meilleure résolution en un temps d'analyse optimale de nombreux articles ont été exploités, à partir desquels différents protocoles ont été testés tout en faisant varier différents paramètres empiriques en fonction des propriétés physicochimiques de la Vancomycine.

Dans un premier temps la solubilité de la Vancomycine et du Céfotaxime a été évaluée dans des diluants à savoir l'eau et l'acétonitrile, un scan a été réalisé par la suite au moyen d'un spectrophotomètre UV-Visible pour les deux molécules préparées dans des solutions distinctes, et ce dans l'objectif d'analyser leurs spectres d'absorption, de déterminer leurs longueurs d'ondes d'absorption maximales λ_{max} et de sélectionner une longueur d'onde λ où les deux molécules absorbent conjointement. Ceci a permis plus tard d'analyser leur mélange à cette même longueur d'onde équivalente dans notre cas à 220 nm.

Secondairement certains facteurs chromatographiques ont été fixés, ainsi les essais se sont déroulés sur deux colonnes chromatographiques RP 18 de 15 cm et de 25 cm de longueur, à

deux températures ; une température ambiante et une température de 30°C, et avec deux volumes d'injections 50 µL et 60 µL.

Ultérieurement plusieurs compositions de phases mobiles ont été essayées et délivrées chacune à différents débits dont 0,8 mL/min, 1 mL/min et 1,2 mL/min. Les protocoles testés sont illustrés dans le tableau (XV).

Tableau XV : Protocoles testés selon le type de la phase mobile, son mode d'élution et la longueur d'onde d'absorption.

Protocoles	Elution	Phase A	Phase B	λ (nm)
Protocole 1	Isocratique	Méthanol	Aucune	220
Protocole 2	Isocratique	Acétonitrile	Aucune	220
Protocole 3	Isocratique	Mélange 75% tampon phosphate monobasique, 25% méthanol	Aucune	220
Protocole 4	Gradient	Tampon phosphate de sodium monobasique pH= 3,15 ; 4 ; 5.	Méthanol	220
Protocole 5	Gradient	0,1% v/v acide trichloracétique (TCA)	95/5 % v/v acétonitrile 0,1 % acide trichloracétique	214

La Vancomycine est une molécule ionisable, il est donc nécessaire de tamponner les solutions pour s'opposer aux variations du pH et par conséquent à sa dégradation. À cette fin, le pH du tampon phosphate de sodium monobasique a été varié dans un domaine d'acidité (3,15 ; 4 et 5) pour sélectionner le plus favorable au maintien de la forme stable de la molécule.

Pour obtenir une meilleure séparation, une expérimentation minutieuse de plusieurs gradients d'élution pour les protocoles 4 et 5 a également été réalisée.

L'étape de prétraitement avec solubilisation des échantillons est primordiale dans un dosage biologique, deux procédés de précipitation des protéines ont été comparés, dont un simple avec différents solvants ; le méthanol, l'acétonitrile et l'acide perchlorique, et l'autre répété avec comme solvant de précipitation l'acide perchlorique.

Finalement, après de nombreux essais cette méthode de dosage a été concrétisée dans les conditions opératoires suivantes :

- Une longueur d'onde d'absorption UV-Visible de 220 nm, celle-ci a permis d'augmenter l'intensité des pics ;
- Une précipitation double à l'aide d'acide perchlorique.
- Une colonne C18 250 x 4.6 mm, 5 µm, a fourni la meilleure efficacité ;
- Une phase mobile constituée de tampon phosphate de sodium monobasique au pH 3,15 et du méthanol (protocole 4), vu qu'elle a donné la meilleure résolution ; avec une optimisation d'un nouveau gradient plus performant et inédit à ce présent travail ;
- Un débit optimal de 1 mL/min assure une bonne efficacité en un temps d'analyse raisonnable tout en minimisant les pertes de charges ;
- Un volume d'injection de 60 µL, a permis l'augmentation des aires de pics ;
- La variation de la température a conclu à la non existence d'une différence de résultats entre les niveaux testés mais une température de 30 °C a été choisie pour s'adapter à la chaleur du climat qui peut surchauffer l'automate et afin d'assurer la reproductibilité de temps de rétention ;
- Avec ces différentes conditions, le temps d'analyse obtenu est de 14 minutes.

2.3 Choix du protocole de validation

En vue de valider notre méthode de dosage de la Vancomycine dans le plasma, la démarche du logigramme de la figure (10) proposée dans le guide SFSTP pour la sélection d'un protocole adéquat, et le tableau (VI) ont été suivis.

En considérant que cette procédure de dosage est connue ultérieurement, qu'il n'y a pas d'effet matrice (prouvé par l'étude de spécificité) et que l'étalonnage ne se fait pas à un seul niveau de concentration, le protocole adapté à notre étude est le V2 ; en utilisant 5 niveaux de concentration.

Ce protocole exige trois jours de validation (3 séries), chaque jour comporte :

- Un standard d'étalonnage sans matrice avec deux répétitions.
- Un standard de validation avec trois répétitions.

Le nombre d'essais obtenus conséquemment est égale à :

- Standards d'étalonnage : 3(séries) x 2(répétitions) x 5(niveaux) = 30 essais.
- Standards de validation : 3(séries) x 3(répétitions) x 5(niveaux) = 45 essais

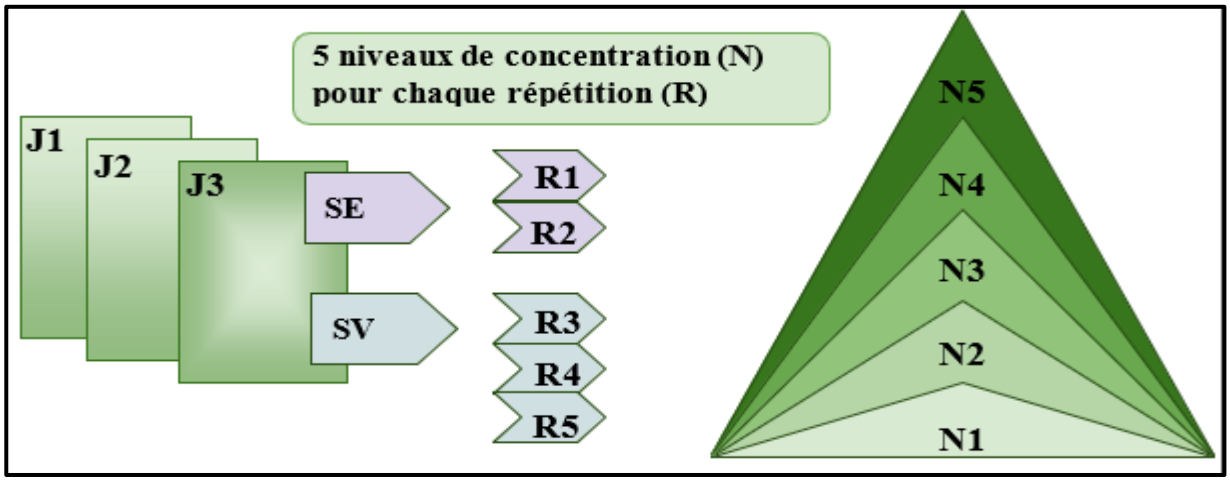


Figure 18 : Schéma représentatif du protocole de validation.

2.4 Choix des paramètres de validation

2.4.1 Niveaux de concentration

Le choix des niveaux de concentrations de la Vancomycine est fait de sorte que la gamme des concentrations puisse couvrir la fourchette thérapeutique et cela, en considérant pour une perfusion IV discontinue, une concentration plasmatique minimale qui va de 10 à 20 mg/L selon la sévérité de l'infection et la CMI du germe, et une concentration plasmatique maximale qui va de 20 jusqu'à 40 mg/L, et pour une perfusion IV continue, un taux plasmatique de 20 à 45 mg/L.

Une gamme de cinq niveaux de concentration a été alors réalisée en estimant un intervalle thérapeutique globale qui va de 10 mg/L à 50 mg/L passant par trois niveaux intermédiaires : 15 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L.

2.4.2 Limites d'acceptabilité (λ)

L'objectif d'une procédure analytique est que la différence entre le résultat donné par cette dernière et la vraie valeur de l'échantillon soit inférieure à une limite d'acceptation (λ).

La limite d'acceptabilité d'une méthode est le pourcentage d'une valeur seuil globale. Elle varie selon les exigences de l'analyste ou la finalité de la procédure analytique.

Selon les exigences de la commission SFSTP parue en 2003 dans les guides STP Pharma Pratiques, cette limite est fixée à $\pm 15\%$ pour le dosage biologique d'une substance active, cas de la présente méthode.

2.4.3 Probabilité de confiance (β)

Le but est que la proportion des futures mesures comprises dans les limites d'acceptation fixées à priori soit de 85% (β = 85%).

2.4.4 Conditions expérimentales

2.4.4.1 Choix de la dilution

Six solutions mères ont été préparées dans des fioles de 100 mL, dont cinq contiennent 25 mg de Vancomycine et une contient 25 mg de Céfotaxime. À partir des 5 solutions mères de Vancomycine ; des solutions filles ont été préparées pour avoir des standards d'étalonnage et de validation.

2.4.4.2 Choix du diluant

Pour une meilleure solubilité et stabilité de la Vancomycine et du Céfotaxime (EI), l'eau purifiée reste le diluant le plus favorable. En effet, en plus de bien solubiliser ces poudres, d'être compatible avec la phase mobile et le système chromatographique en général**,** il est disponible et moins coûteux.

2.4.4.3 Préparation des réactifs

- **Préparation de la phase mobile**

- Préparation de la base : dans une fiole de 250 mL, 5,5 g de phosphate monosodique NaH_2PO_4 ont été pesés puis dissous par agitation manuelle dans un volume d'eau purifiée, le mélange a été complété au trait de jauge avec le même solvant puis homogénéisé par retournement.
- Préparation de l'acide : dans une autre fiole de 250 mL, 270 µL d'acide phosphorique ont été additionnés à l'aide d'une micropipette à un petit volume d'eau purifiée, le mélange a été ajusté au trait de jauge avec le même diluant puis homogénéisé par retournement.
- Les deux solutions obtenues ont été mélangées dans un bécher de 500 mL puis homogénéisées au moyen d'un agitateur magnétique.
- Le pH de la solution finale a été vérifié à l'aide d'un pH mètre.
- Le pH ciblé est de 3,15, il a quelquefois été ajusté par l'ajout d'acide lorsque le pH est élevé ou de la base conjuguée lorsqu'il est bas.
- La phase mobile préparée a été filtrée avant d'être utilisée avec un dispositif de filtration sous vide sur membrane 0,45 µm, fournie par Millipore.

- **Préparation d'acide perchlorique**

À partir d'un flacon d'acide perchlorique de 11N, une solution de 0,5N a été préparées selon les étapes suivantes :

- 24 mL du réactif ont été dilués 1/4ème dans une fiole jaugée de 100 mL sous hotte avec de l'eau purifiée,
- La solution de 2,6 N obtenue a été diluée avec de l'eau purifiée au 1/5ème à l'aide d'une pipette jaugée de 5 mL dans une fiole jaugée de 25 mL, pour donner une solution finale de 0,5N.

2.4.4.4 Mode opératoire

Le mode opératoire de la validation est résumé dans le schéma ci-dessous :

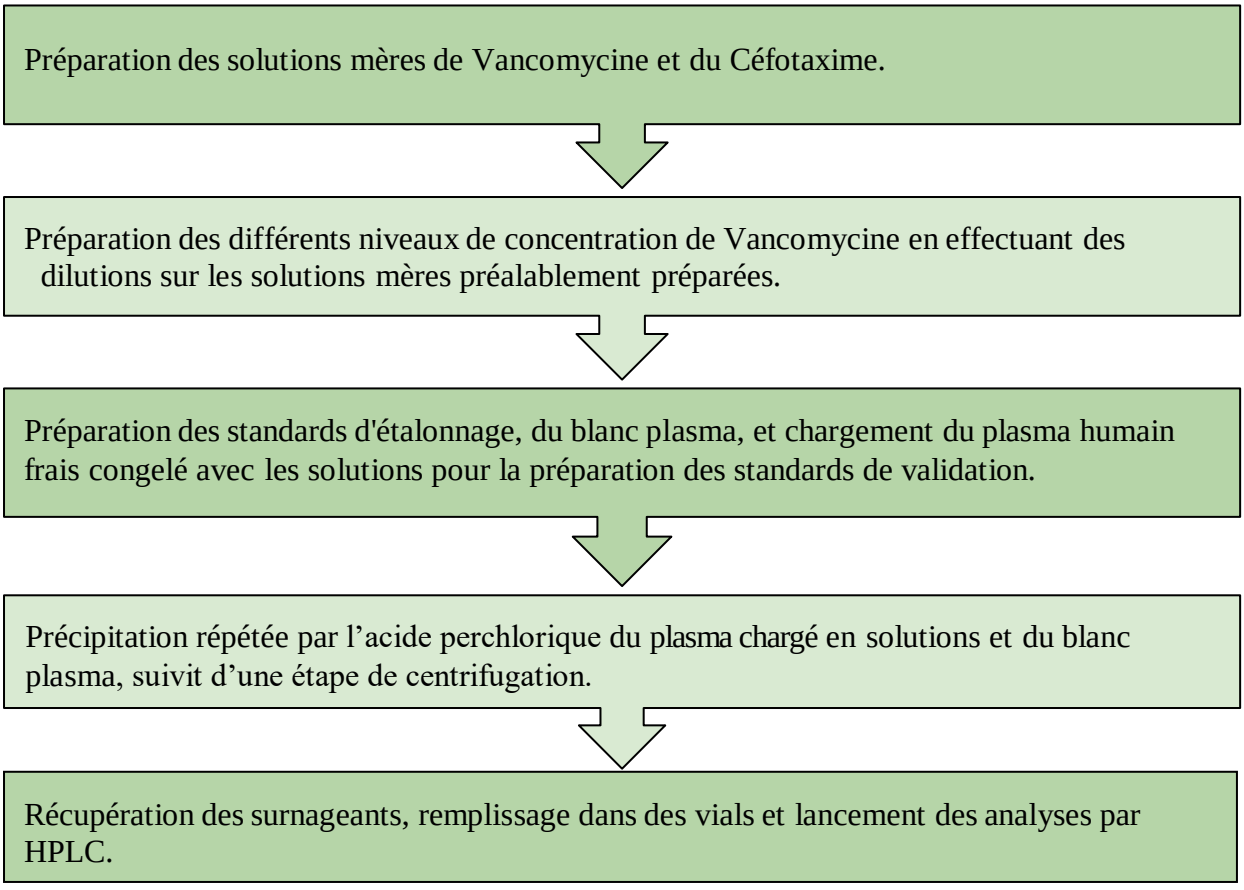


Figure 19 : Schéma du mode opératoire de la validation.

2.4.4.5 Préparation des solutions

2.4.4.5.1 Préparation de la solution d'étalon interne

- Dans une fiole jaugée de 100 mL, 25 mg de Céfotaxime ont été pesés puis solubilisés

manuellement avec un certain volume d'eau purifiée.
- Le mélange a été complété au trait de jauge avec le même diluant puis homogénéisé par retournement, la concentration de la solution mère de l'étalon interne est 250 mg/L.
- La concentration de cette solution dans les échantillons de plasma après chargement sera 50 mg/L.

2.4.4.5.2 Préparation des solutions mères de Vancomycine

- Cinq pesées de 25 mg de Vancomycine ont été réalisées dans des fioles jaugées de 100 mL.
- Les poudres pesées ont été solubilisées par agitation manuelle avec un volume d'eau purifiée.
- Le mélange a été complété au trait de jauge avec le même diluant puis homogénéisé par retournement pour avoir une concentration de 250 mg/L.
- Ces solutions mères correspondront dans les échantillons de plasma au niveau de concentration le plus élevé autrement dit 50 mg/L.

2.4.4.5.3 Préparation des standards d'étalonnage

Deux solutions mères de Vancomycine ont servi à la préparation de huit solutions filles. En effet, chacune a été diluée quatre fois de la manière suivante :

- À partir de chaque solution mère quatre volumes différents ont été prélevés à l'aide de pipettes jaugées adaptées dans des fioles jaugées correspondantes ;
- Ces volumes ont été complétés au trait de jauge avec de l'eau purifiée puis homogénéisés par retournement.

Quatre niveaux de concentration ont été obtenus pour chaque solution mère comme l'illustre la figure (20) suivante :

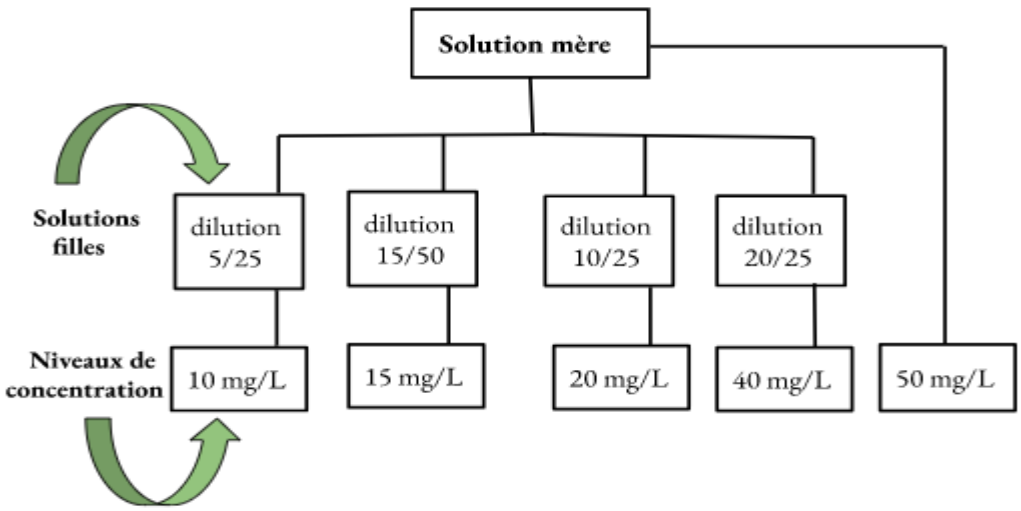


Figure 20 : Les dilutions de la solution mère de Vancomycine.

En tout cinq niveaux de concentration chacun répété deux fois ont été obtenus, à partir desquels dix standards d'étalonnage ont été préparés comme suit :

- De chaque niveau de concentration, un volume de 150 µL de Vancomycine a été prélevé à l'aide d'une micropipette dans un tube à essais en plastique auquel, 150 µL de Céfotaxime et 1600 µL d'eau purifiée (équivalents à 600 µL de plasma et 1000 µL d'acide perchlorique) ont été additionnés, l'ensemble a été homogénéisé manuellement.
- Les dix mélanges obtenus ont été introduits dans des vials puis injectés dans l'automate d'HPLC.

2.4.4.5.4 Préparation des standards de validation

Les trois solutions mères de Vancomycine restantes ont servi à la préparation de douze solutions filles en les diluant chacune quatre fois dans des fioles distinctes,comme précédemment.

Cinq niveaux de concentration chacun répété trois fois ont été ainsi obtenus et ont servi à la préparation de quinze standards de validation de la façon suivante :

- À partir de chaque solution, un volume de 150 µL de Vancomycine a été prélevé avec une micropipette dans un tube à essais en plastique auquel 150 µL de Céfotaxime et 600 µL de plasma ont été ajoutés.
- Un prétraitement des plasma chargés en solutions par l'acide perchlorique a été effectué.

- **Étape de prétraitement (précipitation des protéines)**

Une centrifugation répétée précédée d'une précipitation des protéines a été exécutée pour assurer un bon rendement. Pour cela :

- Un volume de 500 µL d'acide perchlorique a été ajouté dans chacun des échantillons de plasma précédents. Les mélanges ont été vortexés environ une minute puis ont subi une 1 ère centrifugation de 20 min à 40000 tr/min.
- Les surnageants obtenus ont été transvasés dans des tubes propres, les culots ont été reconstitués dans 500 µL d'acide perchlorique puis agités au vortex pendant une minute, les mélanges ont été ensuite centrifugés de la même manière que précédemment.
- Les surnageants obtenus ont été additionnés aux premiers puis versés dans des vials pour être analysés.

2.4.4.5.5 Préparation des blancs

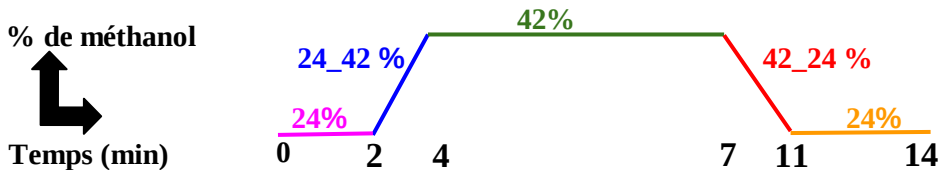
Deux blancs ont été préparés :

- Blanc plasma : à une prise d'essai de 900 µL de plasma introduite dans un tube à essais en plastique à l'aide d'une micropipette, ont été ajoutés en deux fois 500 µL d'acide perchlorique selon un procédé de précipitation similaire à celui des échantillons de plasma chargés.
- Blanc eau : une vial a été remplie avec 1900 µL d'eau purifiée.

2.4.4.6 Conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques appliquées dans ce présent travail sont résumées dans le tableau XVI :

Tableau XVI : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage.

Système de pompage	Pompe quaternaire qui peut produire des gradients basse pression.	
Phase mobile	- Phase (A) Tampon phosphate de sodium monobasique à pH = 3,15. - Phase (B) Méthanol.	
Gradient d'élution		
Débit	1 mL/min.	
Colonne	Longueur de la colonne	25 cm
	Diamètre de la colonne	4,6 mm
	Diamètre des particules	5 µm.
	Phase stationnaire	Gel de silice octadécylsilylé (C18).
Injecteur	Injecteur automatique avec passeur automatique. Volume d'injection 60 µL.	
Temps d'analyse	14 minutes.	
Température	30° C.	
Détection	Spectrophotomètre UV-Visible. Longueur d'onde λ = 220 nm.	

2.4.4.7 Préparation de la feuille de calcul

La feuille de calcul est préparée en utilisant le logiciel Excel de Microsoft Office 2019 afin d'effectuer tous les calculs statistiques nécessaires à la validation.

CHPITRE II : RÉSULTATS ET DISCUSSION

1 RÉSULTATS

La technique de dosage utilisée dans notre méthode est la Chromatographie Liquide à Haute Performance « HPLC » couplée à un détecteur UV (Annexe II), les résultats obtenus sont des chromatogrammes dont l'intégration permet de calculer leurs aires de pic. (Annexe III)

1.1 Chromatogrammes obtenus du dosage de la Vancomycine et du Céfotaxime (étalon interne).

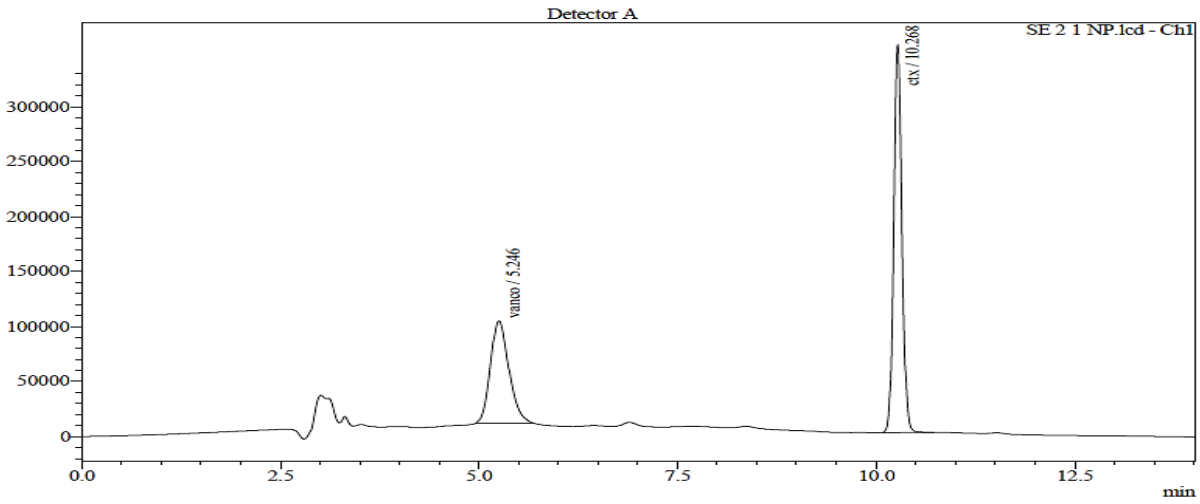


Figure 21 : Chromatogramme du standard d'étalonnage (sans matrice) de la Vancomycine et du Céfotaxime (EI).

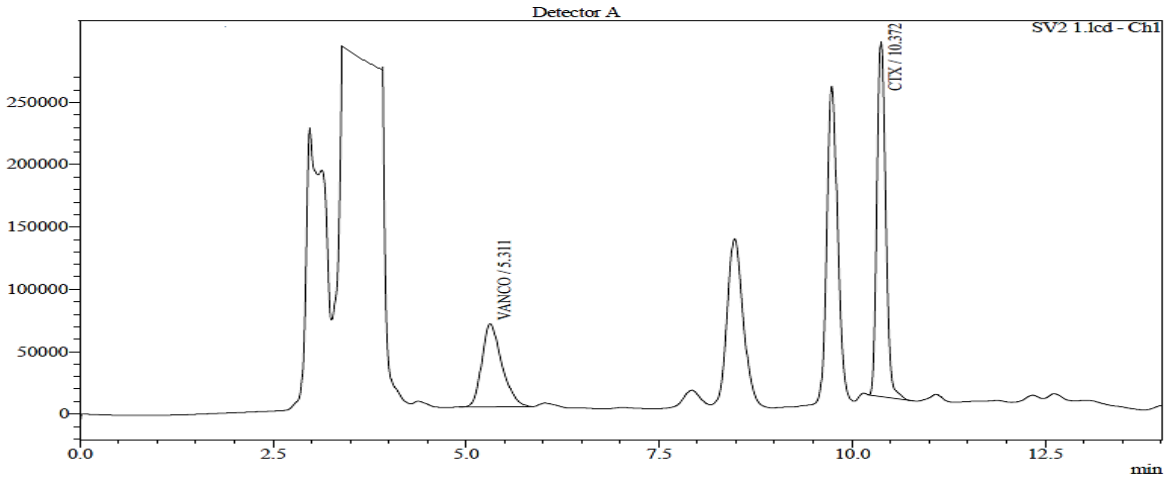


Figure 22 : Chromatogramme du standard de validation (avec matrice) de la Vancomycine et du Céfotaxime (EI).

1.2 Temps de rétention obtenus

Le temps de rétention moyen de la Vancomycine = 5,25 min. Le temps de rétention moyen du Céfotaxime = 10,25 min.

1.3 Calcul de la résolution

$$R_S = 2\frac{t_{r2} - t_{r1}}{\omega_1 + \omega_2}$$

Avec :

t_{r1} et t_{r2} : temps de rétention de la Vancomycine et du Céfotaxime respectivement ;

ω_1 et ω_2 : largeur du pic à la base de la Vancomycine et du Céfotaxime respectivement, déterminées par l'intersection des tangentes aux points d'inflexion des pics avec la ligne de base, comme l'illustre la figure (23) ci-dessous :

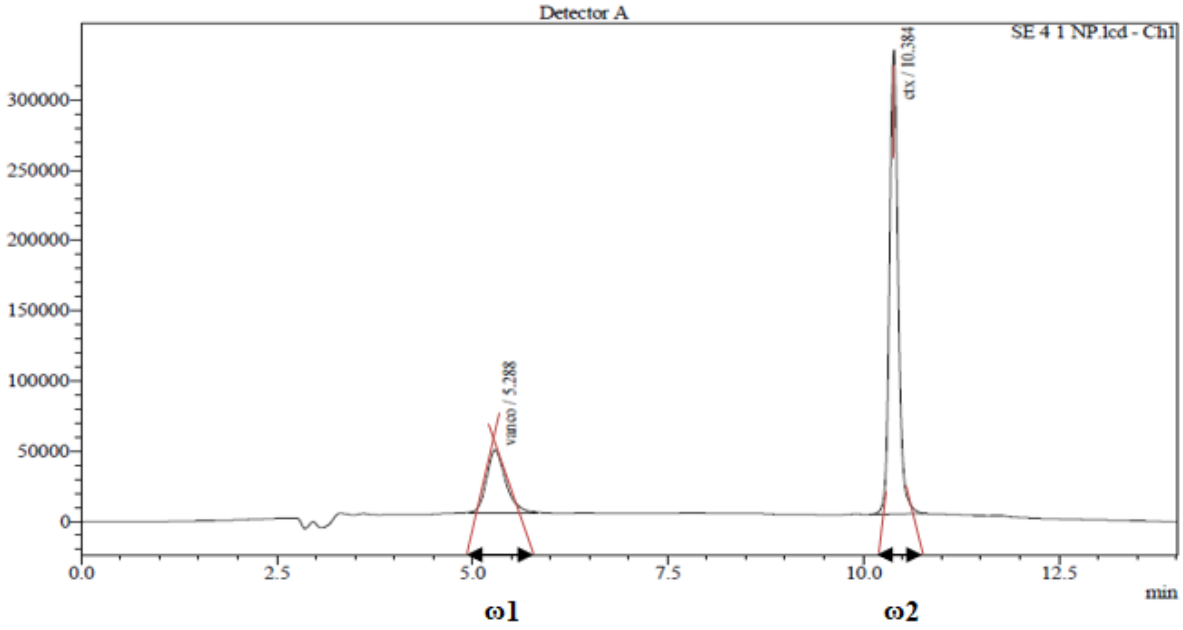


Figure 23 : Détermination des largeurs des pics à la base et des temps de rétention à partir du chromatogramme du standard d'étalonnage.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XVII : Temps de rétention et largeur du pic à la base des deux molécules.

Molécules	Vancomycine	Céfotaxime
Temps de rétention	5,25 min	10,25 min
Largeur du pic à la base	0 ,75 min	0,5 min

$$R_S = 2\frac{10{,}25 - 5{,}25}{0{,}75 + 0{,}5} = 8$$

1.4 Informations concernant les données brutes

Les résultats des concentrations et des réponses sont représentés respectivement par les rapports des concentrations et des aires de pics entre la Vancomycine et l'étalon interne.

Les rapports de concentrations sont issus des concentrations finales injectées, leurs valeurs sont choisies de façon à simuler les intervalles thérapeutiques des patients traités par la Vancomycine.

1.5 Spécificité et effet matrice

1.5.1 Comparaison des chromatogrammes

L'évaluation de la spécificité est faite par la comparaison du chromatogramme sans matrice et avec matrice d'un même niveau de concentration ainsi que celui du plasma et du diluant non chargés.

Elle est illustrée dans les figures suivantes :

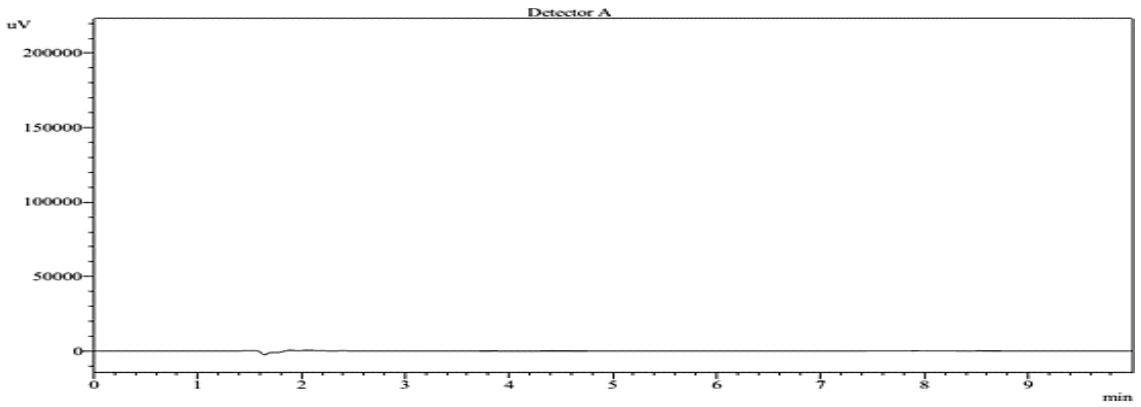


Figure 24 : Chromatogramme du diluant non chargé.

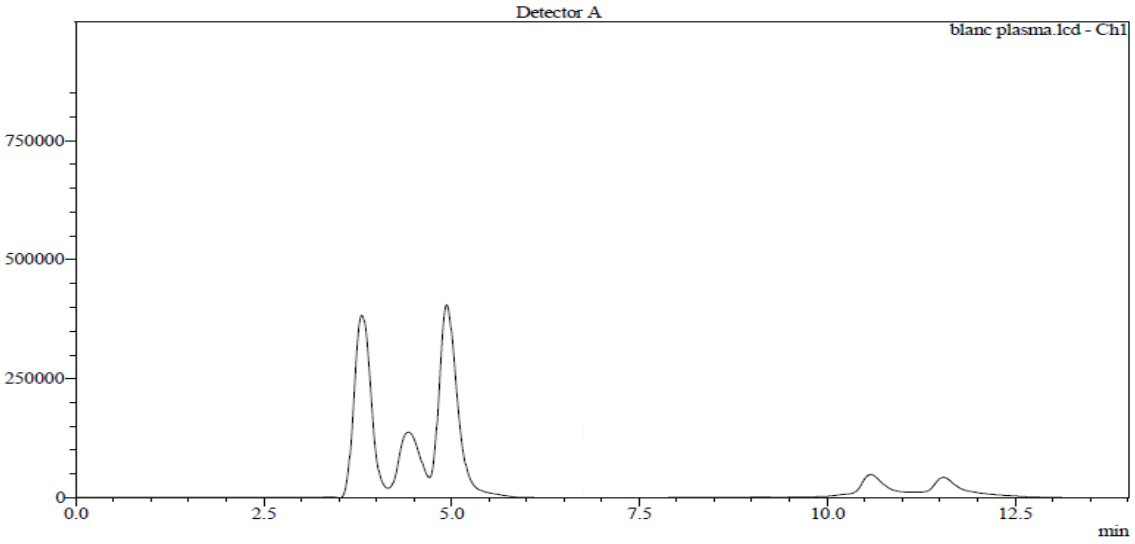


Figure 25 : Chromatogramme de Plasma non chargé.

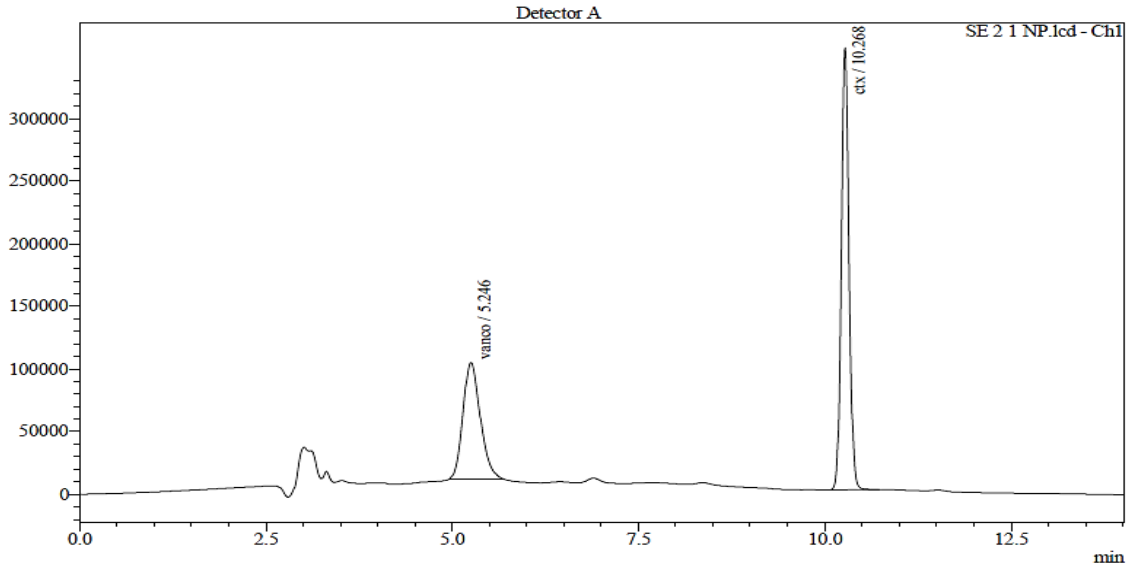


Figure 26 : Chromatogramme sans matrice de la Vancomycine et du Céfotaxime dans le diluant.

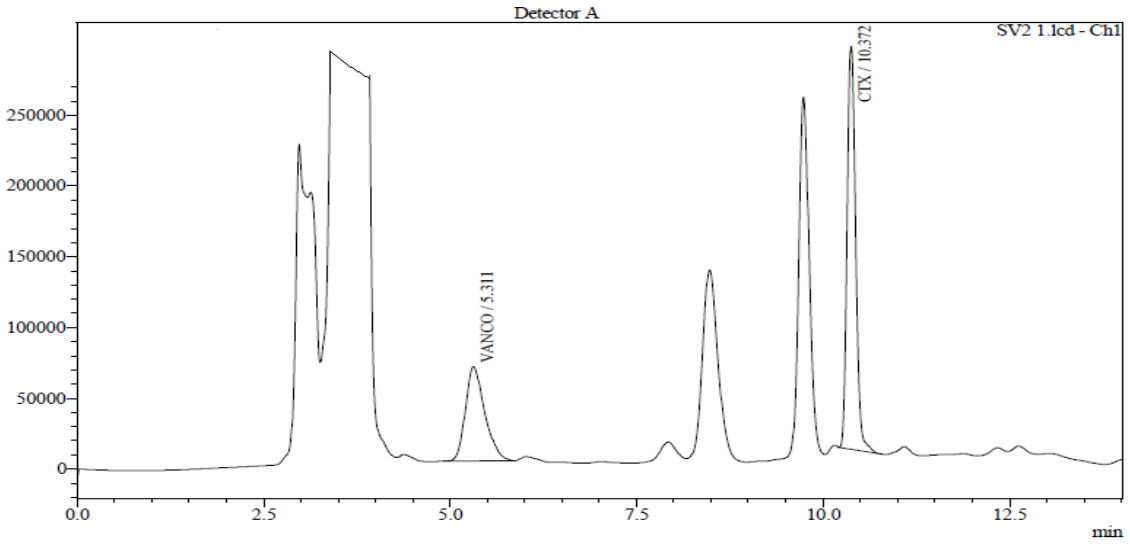


Figure 27 : Chromatogramme avec matrice de la Vancomycine et du Céfotaxime dans le Plasma.

Le tableau suivant représente les résultats de la superposition des quatre chromatogrammes :

Tableau XVIII : Résultats de la superposition des chromatogrammes.

Solutions	Temps de rétention		Aires de pics	Superposition
Diluant non chargé Plasma non chargé	Absence de pics			
Molécules dans le diluant	Vancomycine	5,246 min	Visuellement comparables	Concluante
	Céfotaxime	10,268 min		
Molécules dans le Plasma	Vancomycine	5,311 min		
	Céfotaxime	10,372 min		

1.5.2 Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation

L'étude statistique de la spécificité et d'effet matrice est réalisée sur les standards d'étalonnage de la Vancomycine seule dans le diluant et les standards de validation avec le plasma, les résultats sont résumés dans les tableaux suivants :

Tableau XIX : Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards d'étalonnage de la Vancomycine.

Niveaux	1ère Répétition de chaque série	Concentrations des standards d'étalonnage $X_i = (X_x/X_{EI})$	Réponses instrumentales $Y_i = (Y_x/Y_{EI})$	Réponses calculées (Y*i)	$(Y_i-Y^*_i)^2$	$(X_i-X')^2$
10mg/L	1	0,204	0,215	0,17	0,0024	0,11
	2	0,198	0,227	0,16	0,0044	0,12
	3	0,198	0,198	0,16	0,0014	0,12
15mg/L	1	0,306	0,264	0,26	0,0000	0,06
	2	0,297	0,261	0,25	0,0000	0,06
	3	0,298	0,262	0,26	0,0000	0,06
20mg/L	1	0,408	0,327	0,36	0,0011	0,02
	2	0,396	0,334	0,35	0,0002	0,02
	3	0,397	0,329	0,35	0,0004	0,02
40mg/L	1	0,816	0,582	0,75	0,0273	0,08
	2	0,793	0,575	0,73	0,0225	0,06
	3	0,794	0,584	0,73	0,0203	0,06
50mg/L	1	1,020	1,042	0,94	0,0102	0,23
	2	0,991	1,052	0,91	0,0192	0,20
	3	0,992	1,036	0,92	0,0145	0,20
Pente			**0,950**			
Ordonnée à l'origine			**-0,027**			
Erreur pente			**0,082**			
Erreur ordonnée à l'origine			**0,051**			

Tableau XX : Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards de validation (avec matrice) de la Vancomycine.

Niveaux	1ère répétition de chaque série	Concentrations des standards de validation $Xi = (X_x/X_{EI})$	Réponses instrumentales $Yi = (Y_x/Y_{EI})$	Réponses calculées (Y*i)	$(Y_i-Y^*_i)^2$	$(X_i-X')^2$
10mg/L	1	0,199	0,208	0,19	0,0005	0,11
	2	0,198	0,205	0,19	0,0004	0,11
	3	0,198	0,196	0,19	0,0001	0,11
15mg/L	1	0,299	0,269	0,27	0,0000	0,06
	2	0,297	0,270	0,27	0,0000	0,06
	3	0,298	0,268	0,27	0,0000	0,06
20mg/L	1	0,398	0,337	0,36	0,0003	0,02
	2	0,395	0,351	0,35	0,0000	0,02
	3	0,397	0,333	0,35	0,0005	0,02
40mg/L	1	0,796	0,674	0,69	0,0004	0,07
	2	0,791	0,685	0,69	0,0000	0,07
	3	0,794	0,654	0,69	0,0015	0,07
50mg/L	1	0,995	0,971	0,86	0,0113	0,21
	2	0,989	0,897	0,86	0,0015	0,21
	3	0,992	0,775	0,86	0,0074	0,21
Pente			**0,852**			
Ordonnée à l'origine			**0,017**			
Erreur pente			**0,036**			
Erreur ordonnée à l'origine			**0,022**			

Tableau XXI : Comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine de la droite de régression de la Vancomycine seule dans le diluant et celle de la Vancomycine dans le plasma.

Comparaison des deux pentes des deux droites de régression	***t calculé***	**1,09**	**Différence non significative**
	t°(α ; 26)	**2.06**	
	Condition	t calculé < t°(α ; 26)	
Comparaison des ordonnées à l'origine des deux droites de régression	***t calculé***	**0,79**	**Différence non significative**
	t°(α ; 26)	**2.06**	
	Condition	t calculé < t°(α ; 26)	

1.6 Fonction de réponse

Dans le but de choisir le modèle d'étalonnage le plus adéquat qui est capable de produire une proportion suffisante des futures mesures qui se situeront à l'intérieur des limites

d'acceptabilité, nous avons étudié quatre modèles reliant les rapports des aires des pics aux rapports des concentrations introduites.

Les tableaux suivants regroupent les résultats des calculs statistiques pour tous les modèles suivis par leurs courbes d'étalonnage correspondantes à chaque série :

- **1er modèle : Droite : y = ax + b**

Tableau XXII : Paramètres d'étalonnage de la Vancomycine obtenus avec la fonction y = ax + b (sans matrice).

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		(X_x/X_{EI})	(Y_x/Y_{EI})	(X_x/X_{EI})	(Y_x/Y_{EI})	(X_x/X_{EI})	(Y_x/Y_{EI})
10mg/L	**1**	0,204	0,2152	0,198	0,227	0,198	0,219
	2	0,205	0,2064	0,203	0,236	0,200	0,219
15mg/L	**1**	0,306	0,2638	0,297	0,261	0,298	0,262
	2	0,307	0,2581	0,305	0,266	0,300	0,266
20mg/L	**1**	0,408	0,3267	0,396	0,334	0,397	0,329
	2	0,410	0,3500	0,406	0,337	0,400	0,340
40mg/L	**1**	0,816	0,5821	0,793	0,575	0,794	0,584
	2	0,820	0,5890	0,812	0,567	0,800	0,563
50mg/L	**1**	1,020	1,0417	0,991	1,052	0,992	1,036
	2	1,025	1,0794	1,015	1,224	1,000	1,015
Pente		**0,9503**		***Pente***	**1,0221**	***Pente***	**0,9270**
Ordonnée à l'origine		**-0,0333**		***Ordonnée à l'origine***	**-0,0457**	***Ordonnée à l'origine***	**-0,0153**

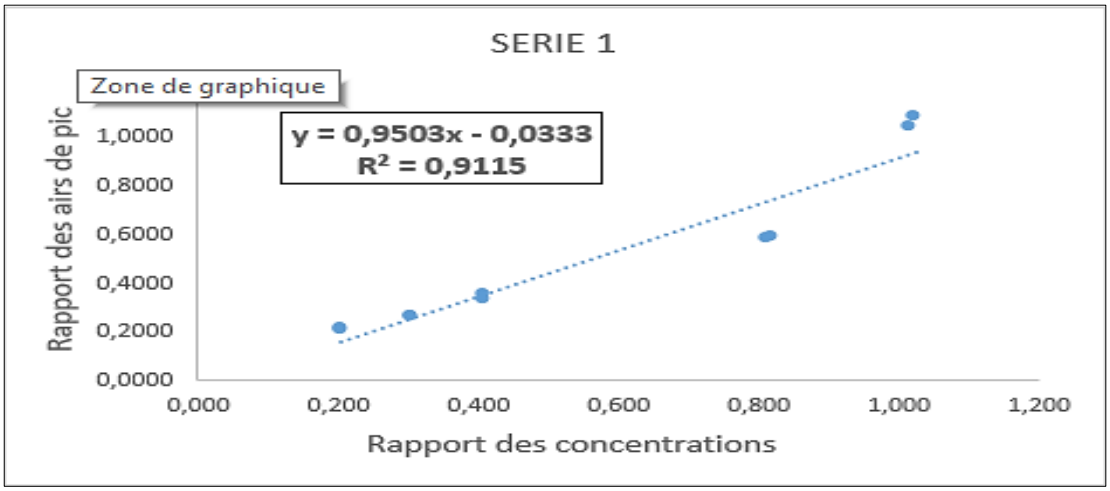


Figure 28 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction y= ax + b (Série1)

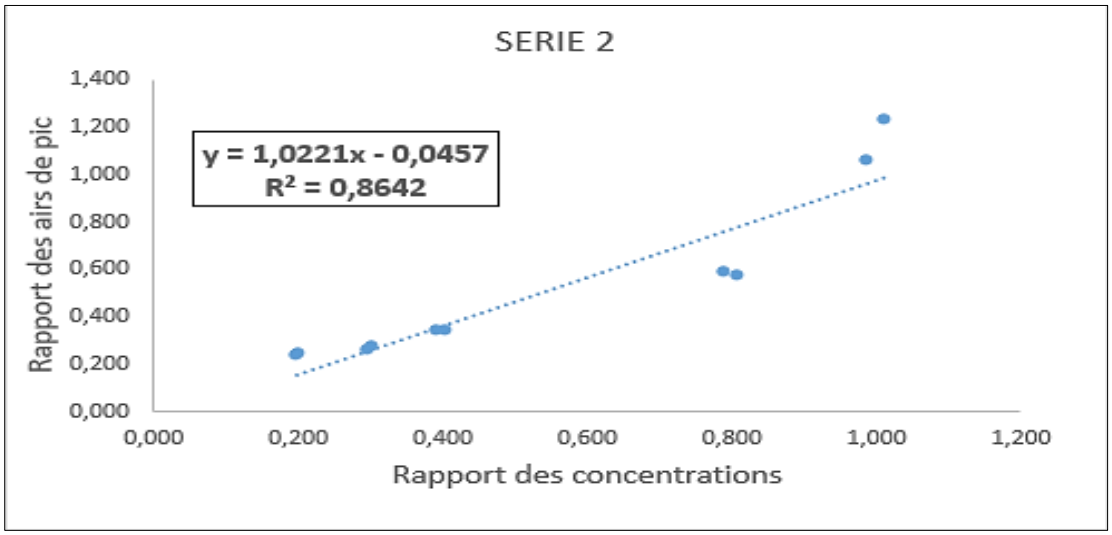


Figure 29 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction y= ax+ b (Série2)

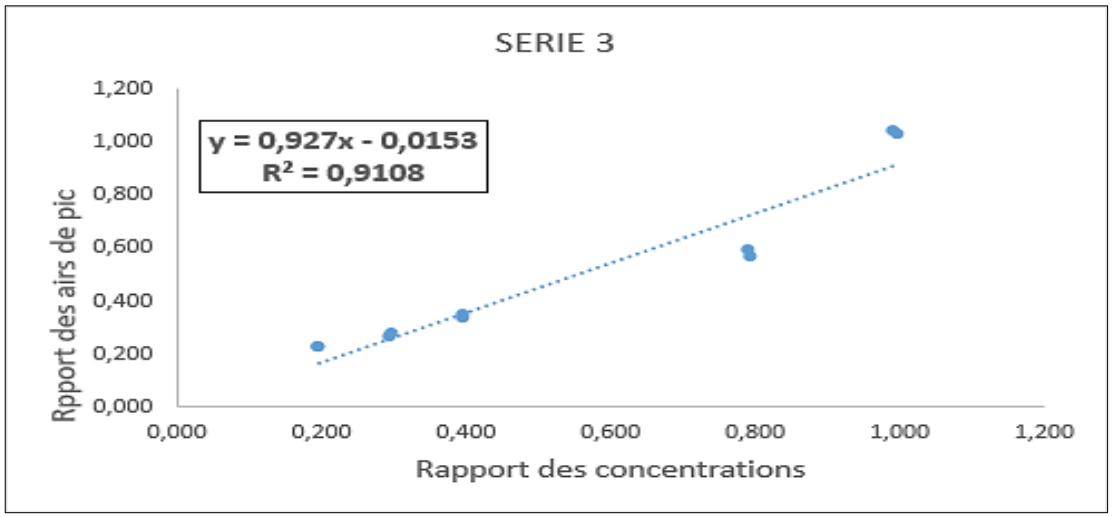


Figure 30 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction y = ax + b (Série 3)

- **2ème modèle : Droite passant par 0 : y = ax**

Tableau XXIII : Paramètres d'étalonnage de la Vancomycine obtenus avec la fonction y = ax (sans matrice)

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		(X_x/X_{EI})	(Y_x/Y_{EI})	(X_x/X_{EI})	(Y_x/Y_{EI})	(X_x/X_{EI})	(Y_x/Y_{EI})
10mg/L	**1**	0,204	0,2152	0,198	0,227	0,198	0,219
	2	0,205	0,2064	0,203	0,236	0,200	0,219
15mg/L	**1**	0,306	0,2638	0,297	0,261	0,298	0,262
	2	0,307	0,2581	0,305	0,266	0,300	0,266
20mg/L	**1**	0,408	0,3267	0,396	0,334	0,397	0,329
	2	0,410	0,3500	0,406	0,337	0,400	0,340
40mg/L	**1**	0,816	0,5821	0,793	0,575	0,794	0,584
	2	0,820	0,5890	0,812	0,567	0,800	0,563
50mg/L	**1**	1,020	1,0417	0,991	1,052	0,992	1,036
	2	1,025	1,0794	1,015	1,224	1,000	1,015
Pente		**0,9047**	***Pente***	**0,9584**	***Pente***		**0,9055**
Ordonnée à l'origine		**0,0000**	***Ordonnée à l'origine***	**0,0000**	***Ordonnée à l'origine***		**0,0000**

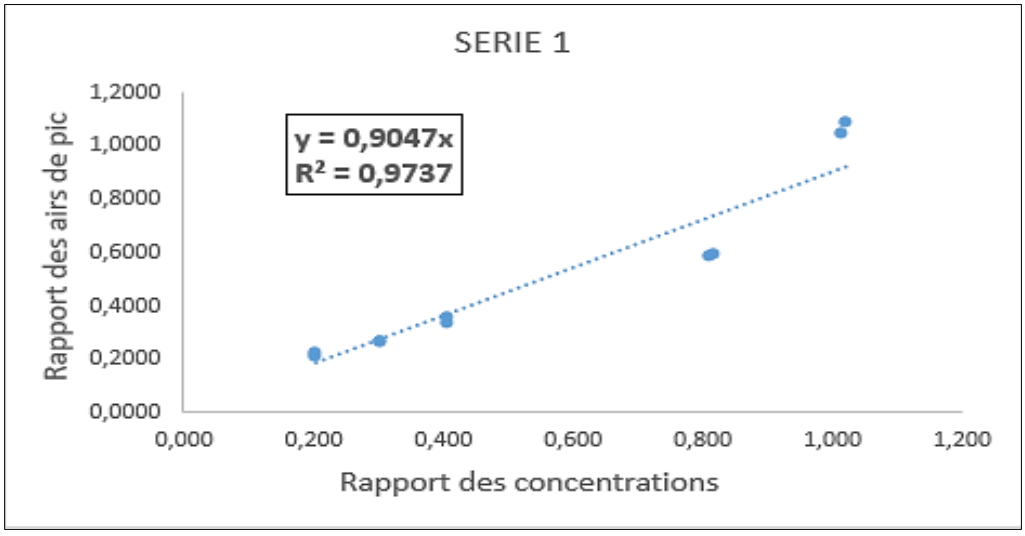


Figure 31 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction y = ax (Série 1).

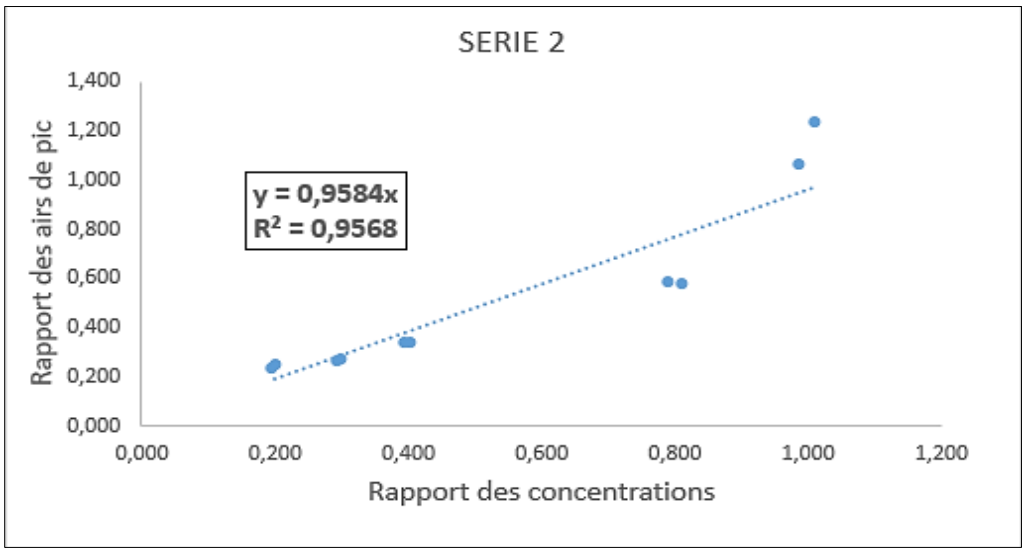


Figure 32 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction y = ax (Série 2).

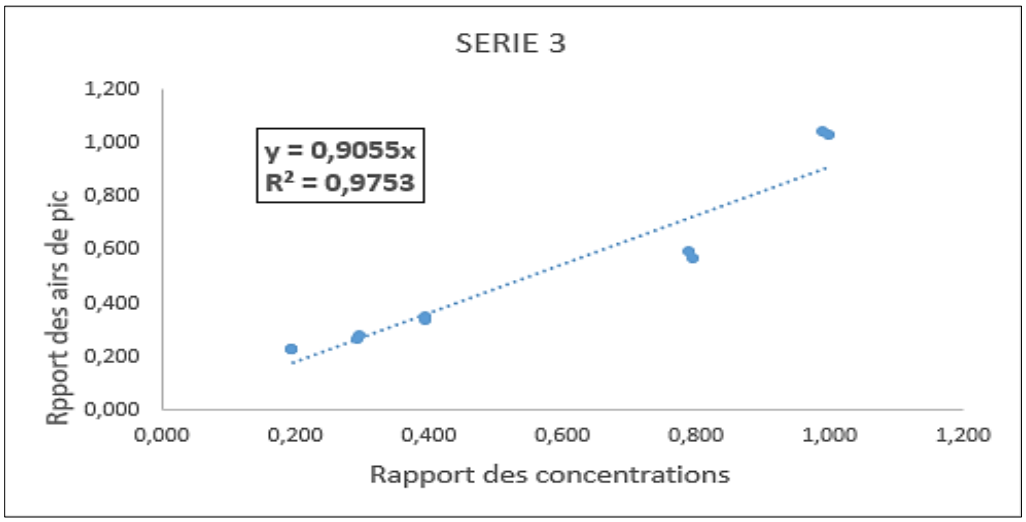


Figure 33 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction y = ax (Série 3)

- **3ème modèle : Changement de variables par la fonction Logarithmique : lny = f (lnx)**

Tableau XXIV : Paramètres d'étalonnage de la Vancomycine obtenus avec la fonction lny = f (lnx) (sans matrice)

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		ln (X_x/X_{EI})	**Ln** (Y_x/Y_{EI})	**ln** (X_x/X_{EI})	**ln** (Y_x/Y_{EI})	**ln** (X_x/X_{EI})	**Ln** (Y_x/Y_{EI})
10mg/L	1	-1,59	-1,53629	-1,62	-1,48333	-1,62	-1,51847
	2	-1,58	-1,57800	-1,59	-1,44602	-1,61	-1,51856
15mg/L	1	-1,18	-1,33268	-1,21	-1,34151	-1,21	-1,33852
	2	-1,18	-1,35445	-1,19	-1,32570	-1,20	-1,32256
20mg/L	1	-0,90	-1,11886	-0,93	-1,09634	-0,92	-1,11068
	2	-0,89	-1,04995	-0,90	-1,08701	-0,92	-1,07852
40mg/L	1	-0,20	-0,54113	-0,23	-0,55282	-0,23	-0,53777
	2	-0,20	-0,52928	-0,21	-0,56720	-0,22	-0,57450
50mg/L	1	0,02	0,04087	-0,01	0,05108	-0,01	0,03508
	2	0,02	0,07637	0,02	0,20209	0,00	0,01483
Pente		**0,9475**		***Pente***	**0,9260**	***Pente***	**0,9063**
Ordonnée à l'origine		**-0,1640**		***Ordonnée à l'origine***	**-0,1354**	***Ordonnée à l'origine***	**-0,1750**

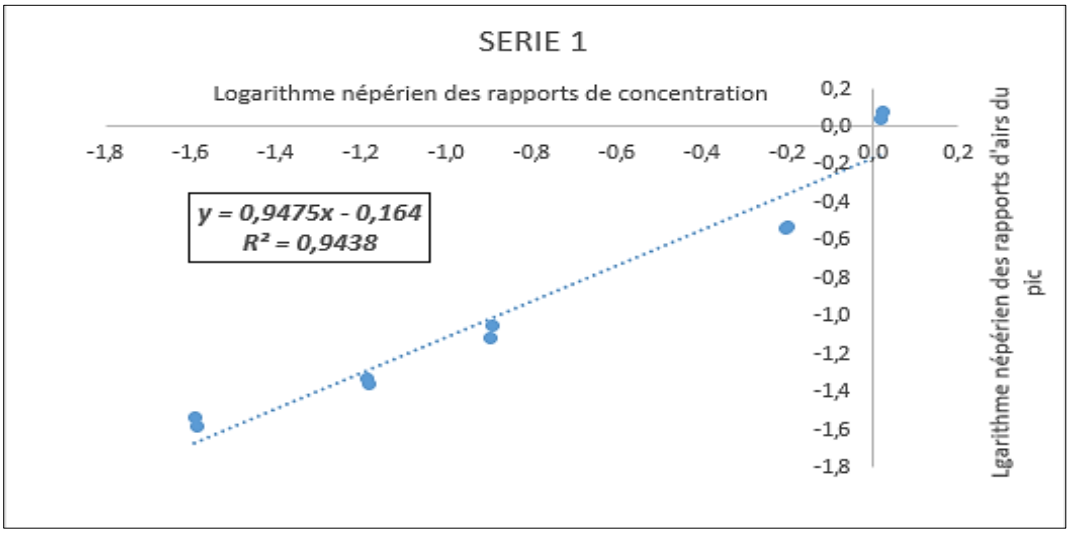


Figure 34 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction lny = f (ln x) (Série 1).

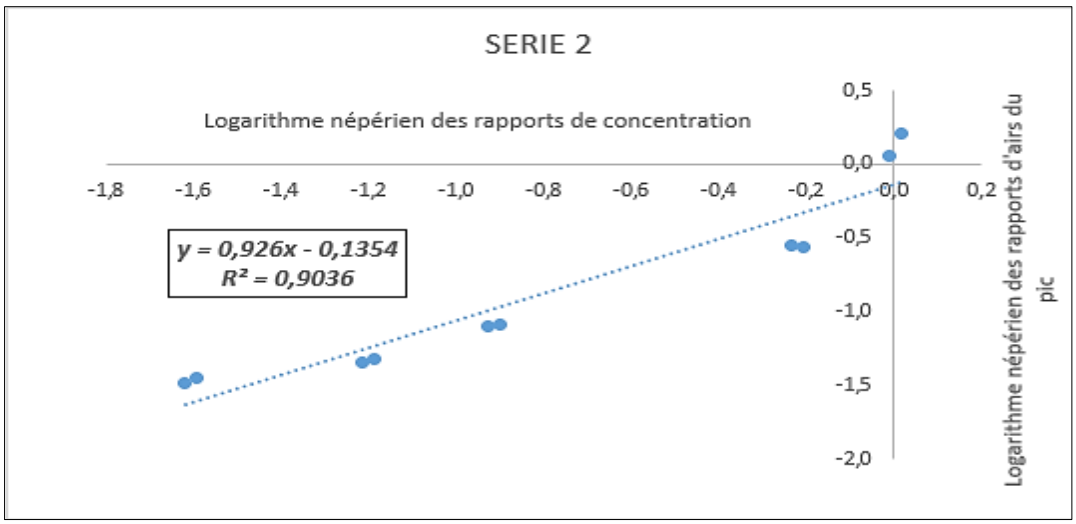


Figure 35 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction lny = f(lnx) (Série 2)

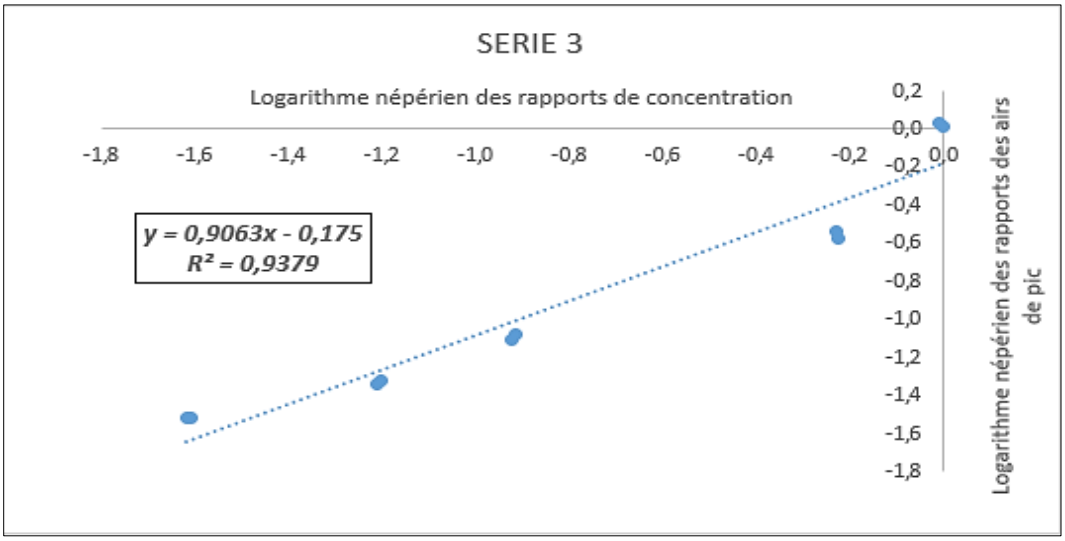


Figure 36 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction lny = f(lnx) (Série 3)

- **4ème modèle : Changement de variables par la racine carrée : $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$**

Tableau XXV : Paramètres d'étalonnage de la Vancomycine obtenus avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (sansmatrice).

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		$\sqrt{(X_x/X_{EI})}$	$\sqrt{(Y_x/Y_{EI})}$	$\sqrt{(X_x/X_{EI})}$	$\sqrt{(Y_x/Y_{EI})}$	$\sqrt{(X_x/X_{EI})}$	$\sqrt{(Y_x/Y_{EI})}$
10mg/L	1	0,452	0,46	0,445	0,48	0,446	0,47
	2	0,453	0,45	0,451	0,49	0,447	0,47
15mg/L	1	0,553	0,51	0,545	0,51	0,546	0,51
	2	0,554	0,51	0,552	0,52	0,548	0,52
20mg/L	1	0,639	0,57	0,630	0,58	0,630	0,57
	2	0,640	0,59	0,637	0,58	0,632	0,58
40mg/L	1	0,903	0,76	0,890	0,76	0,891	0,76
	2	0,905	0,77	0,901	0,75	0,894	0,75
50mg/L	1	1,010	1,02	0,995	1,03	0,996	1,02
	2	1,012	1,04	1,008	1,11	1,000	1,01
Pente		**0,9469**	***Pente***	**0,9707**	***Pente***		**0,9170**
Ordonnée à l'origine		**-0,0051**	***Ordonnée à l'origine***	**-0,0057**	***Ordonnée à l'origine***		**0,0214**

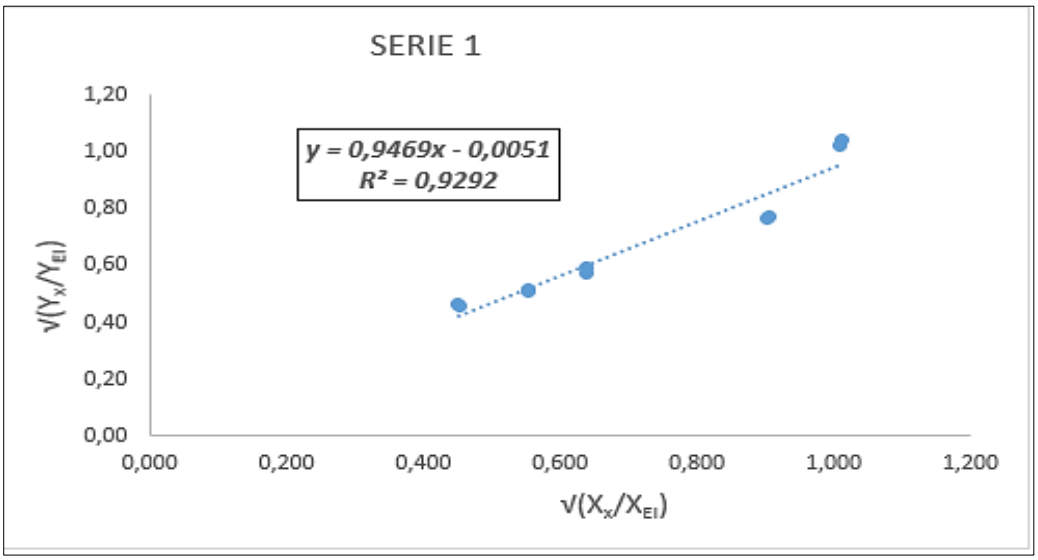


Figure 37 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (Série 1)

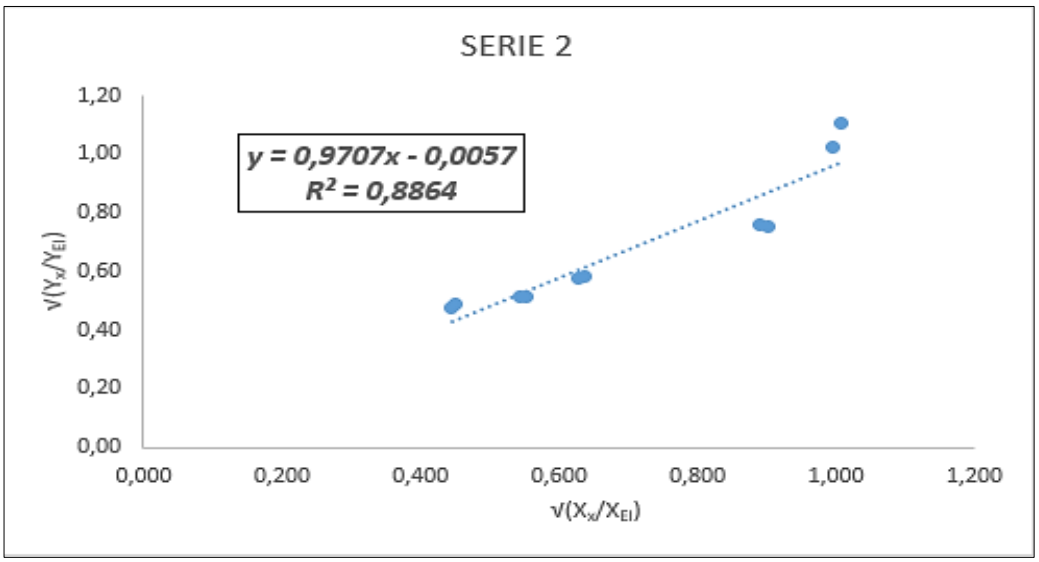


Figure 38 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (Série 2).

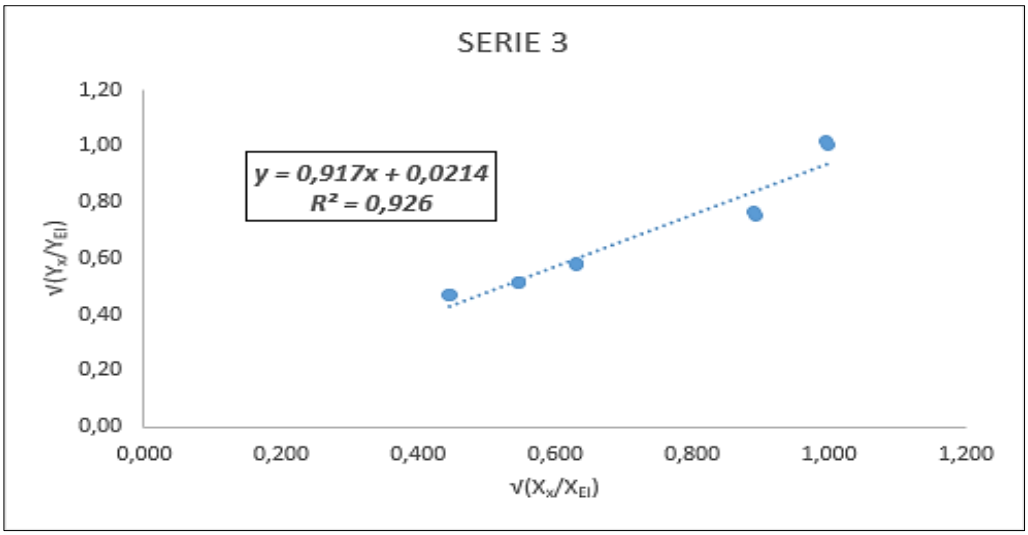
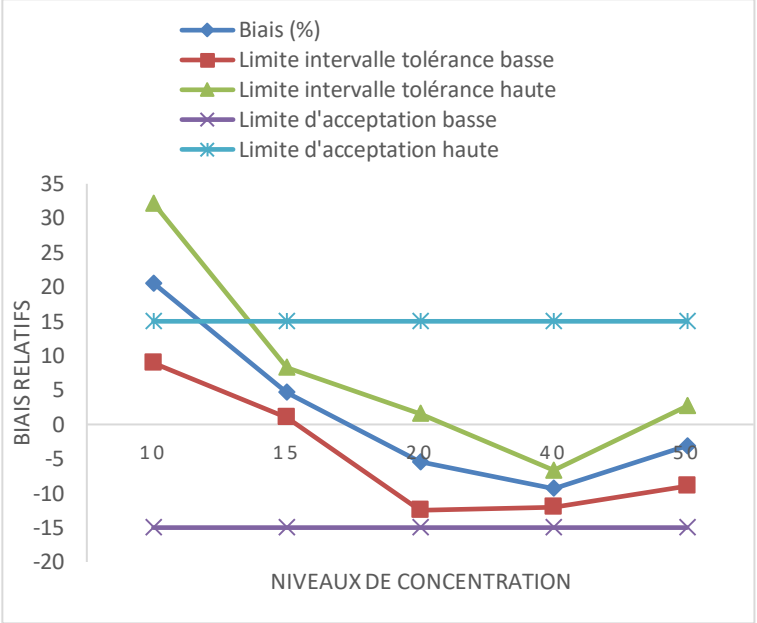
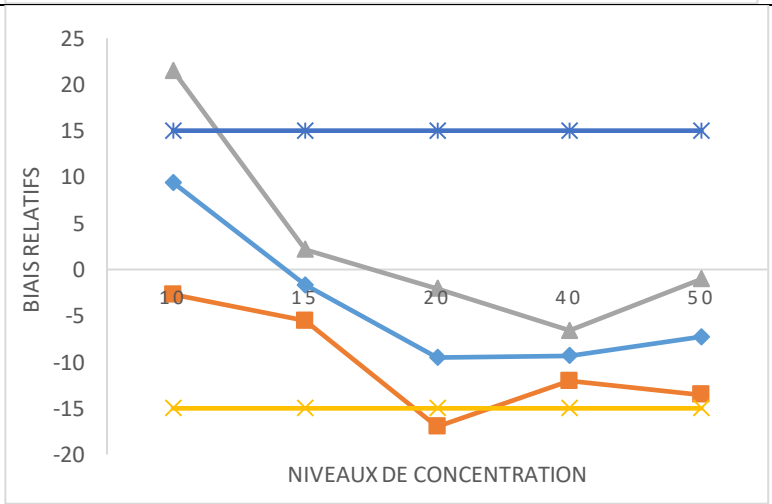


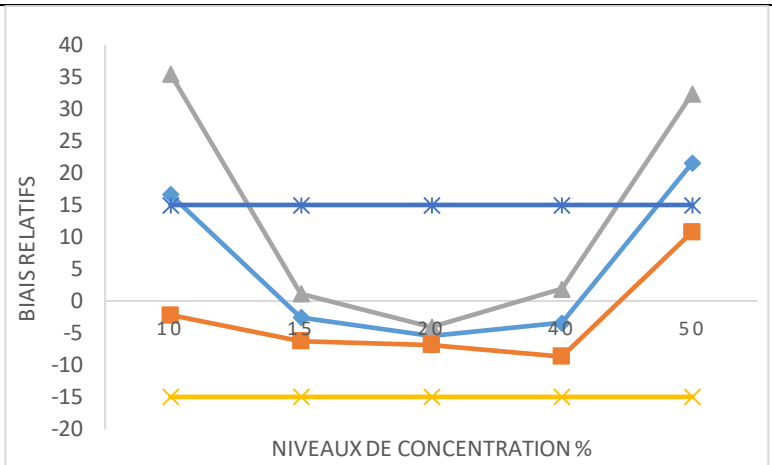
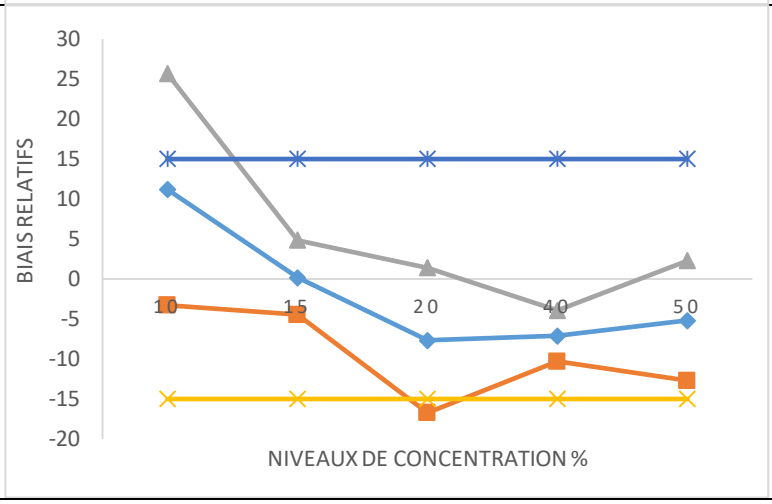
Figure 39 : Courbe d'étalonnage de la Vancomycine obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (Série3).

1.7 Profils d'exactitude obtenus

Nous avons illustré dans le tableau ci-dessous les différents profils d'exactitude à titre indicatif pour justifier notre choix de la fonction de réponse.

Tableau XXVI : Profils d'exactitude obtenus de la Vancomycine.

Fonction de réponse	Profils d'exactitude	Intervalle de dosage (mg/L)	Paramètres de validation
y = ax+ b		[13 – 50]	**λ = ± 15% β = 85%**
y = ax		[28 – 50]	**λ = ± 15% β = 85%**

lny = f(lnx)		[13 – 44]	**λ = ± 15% β = 85%**
√y = f(√x)		[25 – 50]	**λ = ± 15% β = 85%**

1.8 Choix de la fonction de réponse

Notre objectif est de choisir un modèle d'étalonnage qui donne les meilleurs résultats de validation à savoir :

- Un intervalle de dosage le plus étendu ;
- Un intervalle de tolérance le plus étroit ;
- Une simplicité d'utilisation et de transformation lors du calcul des concentrations.

La fonction de réponse qui répond le mieux à ses critères est : **y = ax + b** et elle sera choisie comme modèle d'étalonnage pour notre méthode.

Le calcul des différents critères de validation est détaillé pour les fonctions choisies, sachant que ce sont les mêmes étapes aussi suivies avec les autres modèles.

1.9 Alignement des observations

Pour chaque niveau de concentration, on applique un alignement des réponses obtenues à partir des standards de validation sur la moyenne des concentrations introduites pour avoir des réponses corrigées qui prennent en considération les variations des masses introduites lors des pesées.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XXVII : Tableau d'alignement des réponses observées avec les trois séries de validation de la Vancomycine.

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)									
		1			2			3			
		Concentration introduite (X_x/X_{EI})	Réponses instrumentales (Y_x/Y_{EI})	Réponses alignées (Y_x/Y_{EI})	Concentration introduite (X_x/X_{EI})	Réponses instrumentales (Y_x/Y_{EI})	Réponses alignées (Y_x/Y_{EI})	Concentration introduite (X_x/X_{EI})	Réponses instrumentales (Y_x/Y_{EI})	Réponses alignées (Y_x/Y_{EI})	Moyenne des PE (mg)
10mg/L	1	*0,199*	0,208	0,210	*0,198*	0,205	0,207	*0,198*	0,196	0,196	0,200
	2	*0,200*	0,198	0,199	*0,199*	0,208	0,209	*0,198*	0,188	0,189	
	3	*0,204*	0,238	0,236	*0,202*	0,208	0,205	*0,199*	0,165	0,165	
15mg/L	1	*0,299*	0,269	0,272	*0,297*	0,270	0,272	*0,298*	0,268	0,268	0,300
	2	*0,300*	0,264	0,265	*0,298*	0,285	0,286	*0,298*	0,268	0,268	
	3	*0,305*	0,264	0,261	*0,303*	0,296	0,293	*0,299*	0,262	0,261	
20mg/L	1	*0,398*	0,337	0,341	*0,395*	0,351	0,354	*0,397*	0,333	0,333	0,399
	2	*0,401*	0,335	0,336	*0,397*	0,290	0,291	*0,397*	0,334	0,334	
	3	*0,407*	0,345	0,341	*0,404*	0,325	0,319	*0,398*	0,349	0,348	
40mg/L	1	*0,796*	0,674	0,682	*0,791*	0,685	0,692	*0,794*	0,654	0,655	0,799
	2	*0,801*	0,675	0,678	*0,795*	0,686	0,689	*0,794*	0,654	0,655	
	3	*0,814*	0,653	0,643	*0,808*	0,685	0,675	*0,797*	0,648	0,646	
50mg/L	1	*0,995*	0,971	0,980	*0,989*	0,897	0,906	*0,992*	0,775	0,777	0,999
	2	*1,002*	1,019	1,022	*0,994*	0,844	0,848	*0,992*	0,784	0,785	
	3	*1,018*	1,090	1,078	*1,010*	0,926	0,913	*0,996*	0,821	0,819	
Pente			**0,9503**			**1,0221**			**0,9270**		
Ordonné à l'origine			**-0,0333**			**-0,0457**			**-0,0153**		

1.10 Prédictions inverses

Les concentrations prédites à partir des réponses alignées sont représentées pour chaque prise d'essai dans le tableau suivant :

Tableau XXVIII : Concentrations calculées par prédiction inverse de la Vancomycine.

Niveaux	Répétition	Série 1		Série 2		Série 3	
		Réponses alignées (Y_x/Y_{EI})	Prédictions inverses (X_x/X_{EI})	Réponses alignées (Y_x/Y_{EI})	Prédictions inverses (X_x/X_{EI})	Réponses alignées (Y_x/Y_{EI})	Prédictions inverses (X_x/X_{EI})
10 mg/L	1	*0,21*	0,256	0,21	0,247	0,20	0,228
	2	*0,20*	0,244	0,21	0,249	0,19	0,220
	3	*0,24*	0,283	0,20	0,245	0,16	0,194
15 mg/L	1	*0,27*	0,321	0,27	0,311	0,27	0,306
	2	*0,26*	0,314	0,29	0,324	0,27	0,306
	3	*0,26*	0,309	0,29	0,331	0,26	0,298
20 mg/L	1	*0,34*	0,394	0,35	0,392	0,33	0,376
	2	*0,34*	0,389	0,29	0,330	0,33	0,377
	3	*0,34*	0,393	0,32	0,357	0,35	0,391
40 mg/L	1	*0,68*	0,753	0,69	0,722	0,66	0,723
	2	*0,68*	0,748	0,69	0,718	0,65	0,723
	3	*0,64*	0,712	0,68	0,705	0,65	0,714
50 mg/L	1	*0,98*	1,066	0,91	0,931	0,78	0,854
	2	*1,02*	1,111	0,85	0,874	0,78	0,863
	3	*1,08*	1,169	0,91	0,938	0,82	0,900

1.11 Justesse

La justesse est exprimée en termes de biais absolu, de biais relatif et de taux de recouvrement pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Tableau XXIX : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration de la Vancomycine.

Niveau de concentration	10mg/L	15mg/L	20mg/L	40mg/L	50mg/L
Moyenne des Concentrations introduites (mg/L)	10,05	15,08	20,10	40,21	50,26
Moyenne des Concentrations calculées (mg/L)	12,12	15,78	19,01	36,45	48,696
Biais absolu	2,065	0,702	-1,094	-3,754	-1,564
Biais relatif (%)	***20,54***	***4,65***	***-5,44***	***-9,34***	***-3,11***
Taux de recouvrement (%)	***120,54***	***104,65***	***94,56***	***90,66***	***96,89***

1.12 Fidélité

La fidélité est évaluée pour chaque niveau de concentration, elle est calculée par les écarts types et les coefficients de variation qui estiment la répétabilité et la fidélité intermédiaire, les résultats sont résumés dans le tableau ci- dessous :

Tableau XXX : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration de la Vancomycine.

Niveaux de Concentrations (mg/L)	**10,00**	**15,00**	**20,00**	**40,00**	**50,00**
Moyenne des concentrations théoriques (mg/L)	10,05	15,08	20,10	40,21	50,26
Concentration moyenne retrouvé (mg/L)	12,12	15,78	19,01	36,45	48,70
SCE résiduelle	0,001	0,000	0,002	0,001	0,009
SCE totale	0,005	0,001	0,004	0,002	0,110
SCE inter séries	0,003	0,001	0,002	0,001	0,101
Ecart type de répétabilité	0,015	0,007	0,019	0,014	0,039
Ecart type inter séries	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ecart type de fidélité intermédiaire	0,015	0,007	0,019	0,014	0,039
CV de répétabilité	***6,400***	***2,300***	***4,941***	***1,956***	***3,987***
CV de fidélité intermédiaire	***6,400***	***2,300***	***4,941***	***1,956***	***3,987***

1.13 Exactitude

À partir des concentrations prédites, on peut calculer l'exactitude relative par rapport aux concentrations introduites. Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus :

Tableau XXXI : Résultats du calcul de l'exactitude relative de la Vancomycine.

Niveaux %	Répétitions	Séries (Jour)								
		1			2			3		
		Concentration introduite (X_x/X_{EI})	Concentration prédite (X_x/X_{EI})	Exactitude relative (%)	Concentration introduite (X_x/X_{EI})	Concentration prédite (X_x/X_{EI})	Exactitude relative (%)	Concentration introduite (X_x/X_{EI})	Concentration prédite (X_x/X_{EI})	Exactitude relative (%)
10mg/L	1	0,199	0,256	-22,22	0,20	0,247	-19,90	0,20	0,228	-13,10
	2	0,200	0,244	-18,05	0,20	0,249	-20,17	0,20	0,220	-9,82
	3	0,204	0,283	-28,03	0,20	0,245	-17,65	0,20	0,194	2,66
15mg/L	1	0,299	0,321	-7,07	0,30	0,311	-4,75	0,30	0,306	-2,75
	2	0,300	0,314	-4,26	0,30	0,324	-8,11	0,30	0,306	-2,76
	3	0,305	0,309	-1,26	0,30	0,331	-8,45	0,30	0,298	0,15
20mg/L	1	0,398	0,394	1,09	0,40	0,392	0,98	0,40	0,376	5,48
	2	0,401	0,389	2,96	0,40	0,330	20,60	0,40	0,377	5,31
	3	0,407	0,393	3,50	0,40	0,357	13,09	0,40	0,391	1,79
40mg/L	1	0,796	0,753	5,80	0,79	0,722	9,50	0,79	0,723	9,72
	2	0,801	0,748	7,08	0,79	0,718	10,64	0,79	0,723	9,83
	3	0,814	0,712	14,36	0,81	0,705	14,57	0,80	0,714	11,65
50mg/L	1	0,995	1,066	-6,67	0,99	0,931	6,14	0,99	0,854	16,12
	2	1,002	1,111	-9,83	0,99	0,874	13,65	0,99	0,863	14,94
	3	1,018	1,169	-12,92	1,01	0,938	7,61	1,00	0,900	10,71

1.14 Erreur totale et profil d'erreur totale

On a calculé l'erreur totale absolue et relative pour chaque niveau de concentration et les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XXXII : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration de la Vancomycine.

Niveaux (mg/L)	10,00	15,00	20,00	40,00	50,00
Moyenne des concentrations théoriques (mg/L)	10,05	15,08	20,10	40,21	50,26
Concentration moyenne retrouvé (mg/L)	12,12	15,78	19,01	36,45	48,696
Biais relatif (%)	20,545	4,654	-5,443	-9,335	-3,112
Biais relatif en valeur absolue	20,545	4,654	5,443	9,335	3,112
Coefficient de variation de fidélité intermédiaire (%)	6,400	2,300	4,941	1,956	3,987
Erreur totale (%)	**26,945**	**6,954**	**10,384**	**11,292**	**7,099**

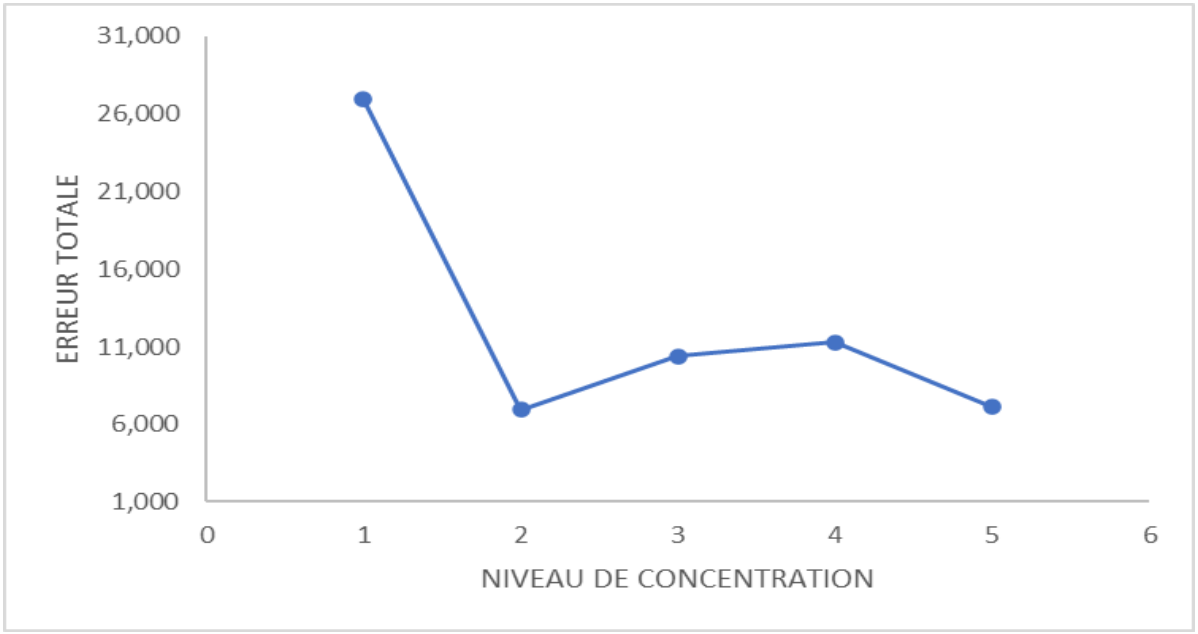


Figure 40 : Profil d'erreur totale de la Vancomycine.

1.15 Intervalle de tolérance

Les limites de l'intervalle de tolérance sont calculées et résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau XXXIII : Limites de tolérance de la Vancomycine.

Niveau de concentration	*10 mg/L*	*15 mg/L*	*20 mg/L*	*40 mg/L*	*50 mg/L*
Limite intervalle tolérance basse (%)	**8,93**	**1,03**	**-12,48**	**-12,01**	**-8,93**
Limite intervalle tolérance haute (%)	**32,16**	**8,28**	**1,59**	**-6,66**	**2,70**

1.16 Profil d'exactitude

Après le calcul des critères de validation, on collecte toutes les données obtenues pour tracer le profil d'exactitude qui réunit le biais relatif, les deux bornes de l'intervalle de tolérance et celles de l'intervalle d'acceptabilité, dans une courbe qui donne l'exactitude (%) en fonction des niveaux de concentrations introduites.

Le profil d'exactitude obtenu en utilisant la fonction choisie est représenté ci-dessous :

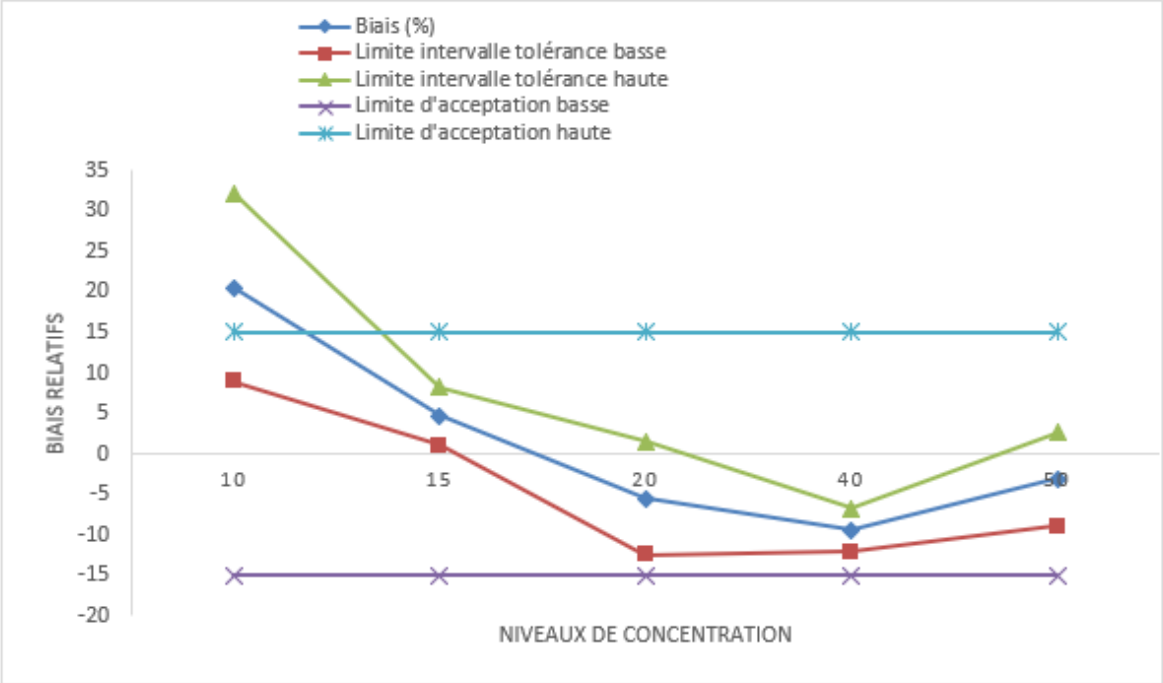


Figure 41 : Profil d'exactitude de la Vancomycine (β = 85% et λ = 15%).

1.17 Linéarité

Le calcul de la linéarité nécessite différents paramètres qui nous permettent de tracer une droite de régression linéaire des rapports des concentrations prédites en fonction des rapports des concentrations introduites.

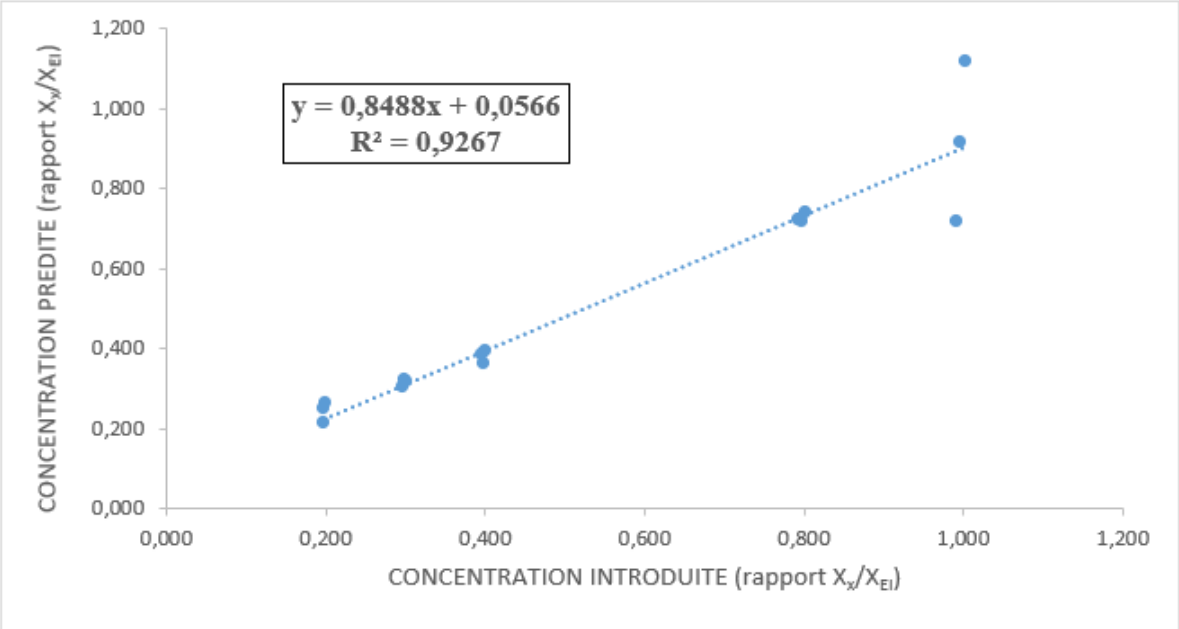


Figure 42 : Droite de linéarité des rapports des concentrations prédites en fonction des rapports des concentrations introduites de la Vancomycine.

La linéarité de la droite de régression des concentrations prédites en fonction des concentrations introduites est évaluée statistiquement en comparant la pente avec 1 et l'ordonnée à l'origine avec 0.

Tableau XXXIV : Évaluation statistique de la linéarité de la Vancomycine.

Pente	0,8994
Ordonnée à l'origine	0,0398
Erreur pente	0,0477
Erreur ordonnée à l'origine	0,0296

Comparaison de la pente avec 1	***t calculé***	**2,11**	**Différence non significative**
	t°(α ; 13)	**2,16**	
	Condition	t calculé < t°(α ; 13)	
Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0	***t calculé***	**1,34**	**Différence non significative**
	t°(α ; 13)	**2,16**	
	Condition	t calculé < t°(α ; 13)	

1.18 Limites de quantification

Les limites de quantification sont obtenues à partir du profil d'exactitude en calculant les concentrations (hautes et basses) à partir desquelles les limites supérieures ou inférieures de l'intervalle de tolérance sortent des limites d'acceptabilité (±λ) au niveau de la probabilité choisi (β).

À partir du profil d'exactitude de la Vancomycine on constate que le seul point d'intersection entre la limite haute de tolérance et la limite haute d'acceptabilité, se situe entre le niveau de plus basse concentration (10 mg/L) et le niveau supérieur (15 mg/L), donc nous pouvons considérer la limite de quantification supérieure comme étant la plus haute concentration étudiée (50 mg/L), et la limite de quantification inférieure sera calculée comme suit :

Tableau XXXV : les limites de quantification de la Vancomycine.

	Niveau A (10 mg/L)	**Niveau B (15 mg/L)**
Concentration moyenne théorique	0,20	0,30
Limite intervalle tolérance critique	0,26	0,32
Limite d'acceptabilité critique	0,23	0,34
Droite	**Pente**	**Origine**
Intervalle tolérance (U)	0,61	0,14
Limite d'acceptabilité CRITIQUE	1,15	0,00
Limite de quantification BASSE (rapport)	**0,26**	
Limite de quantification (mg/L)	**13,22**	

Les limites de quantification de la Vancomycine sont donc : **[13,22 ; 50] mg/L.**

2 DISCUSSION

2.1 Résolution

La résolution calculée est de 8 ; elle est largement supérieure à 1,5 ce qui traduit une excellente séparation de la Vancomycine et du Céfotaxime, on peut donc faire le dosage plasmatique de la Vancomycine par Chromatographie Liquide à Haute Performance en utilisant le Céfotaxime comme étalon interne.

2.2 Spécificité et effet matrice

Une fois les temps de rétention de la Vancomycine et du Céfotaxime déterminés après l'analyse séparée de chacun de leurs standards dans le diluant (sans matrice), l'étude de la spécificité est effectuée par deux méthodes complémentaires, la première étant graphique et la seconde statistique.

2.2.1 Comparaison des chromatogrammes

Selon les résultats obtenus, la spécificité de la méthode est confirmée par :

- L'absence de pics aux temps de rétention des deux antibiotiques dans les chromatogrammes obtenus à partir du blanc eau et du blanc plasma ;
- Les temps de rétention de la Vancomycine obtenus sur les chromatogrammes avec et sans matrice d'un même niveau de concentration sont comparables ;
- Les temps de rétention du Céfotaxime obtenus sur les chromatogrammes avec et sans matrice d'un même niveau de concentration sont comparables ;
- Les aires de pics de la Vancomycine et du Céfotaxime obtenues sur les chromatogrammes avec et sans matrice d'un même niveau de concentration sont comparables.

2.2.2 Etude statistique de la spécificité et de l'effet matrice par comparaison des deux pentes a1 et a2, et des deux ordonnées à l'origine b1 et b2 des deux droites de régression

D'après les résultats présentés dans le tableau (XXI), on conclut que :

- Les deux pentes ne sont pas significativement différentes au risque $\alpha = 5\%$ considéré, d'où l'absence d'effet matrice ;
- Il n'existe pas de différence significative entre les ordonnées à l'origine au risque $\alpha = 5\%$ considéré, expliquant ainsi l'absence d'erreur systématique.

L'interprétation des résultats obtenus est résumée dans le tableau qui suit :

Tableau XXXVI *:* Signification des résultats de comparaison entre deux pentes et deux ordonnées à l'origine des deux droites de régression de la Vancomycine dans l'eau et dans le plasma.

Test	Résultat	Signification
Les pentes sont-elles comparables ?	Oui	Absence d'effet matrice
Les ordonnées à l'origine sont-elles comparables ?	Oui	Absence d'erreur systématique

Ces résultats confirment ceux obtenus par l'étude des chromatogrammes.

Par déduction, avec un risque de 5%, la méthode ne présente ni d'effet matrice, ni d'erreur systématique, elle peut donc assurer le dosage univoque de la Vancomycine dans le plasma. En d'autres termes, la méthode est statistiquement **spécifique**.

2.3 Choix de la fonction de réponse

Après comparaison des profils d'exactitude correspondants aux quatre modèles étudiés, le modèle le plus adapté à la présente méthode est celui de la régression linéaire obtenue avec la fonction ***y = ax + b* : un étalonnage sans matrice (Vancomycine dans le diluant),** en raison de son intervalle de tolérance qui paraît plus étroit que celui des autres modèles, de son intervalle de quantification qui est plus étendu [13,22 - 50] mg/L avec 5 niveaux d'étalonnage contrairement aux modèles restants et de sa simplicité mathématique d'utilisation à la différence de la fonction logarithmique et racine carrée.

2.4 Justesse

Une étroitesse de l'accord entre la valeur de la concentration moyenne prédite obtenue à partir des trois séries de validation et la valeur de la moyenne des concentrations introduites considérée comme étant la valeur de référence est observée pour les quatre niveaux de concentration supérieurs à savoir 15 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L et 50 mg/L en tenant compte que les biais relatifs de ces derniers sont largement inférieurs à $\pm$10% confirmant la justesse de notre méthode au niveau de l'intervalle de dosage [13,22 - 50] mg/L. Cependant, un écart entre

les concentrations moyennes prédite et introduite est constaté pour le niveau de concentration le plus bas, à savoir 10 mg/L en tenant compte du biais relatif correspondant qui dépasse ±10% et cela peut s'expliquer par la tendance du biais relatif à augmenter aux faibles concentrations, et par la perte du volume lors de la centrifugation répétée.

2.5 Fidélité

Le degré de dispersion des concentrations prédites est assez étroit pour quatre niveaux de concentration 15 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L et 50 mg/L, puisque les coefficients de variation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire associés sont inférieurs à ±5%, par conséquent, la méthode est fidèle dans l'intervalle de dosage.

La valeur du coefficient de variation la plus élevée (6,4 %) est obtenue avec le niveau de concentration le plus bas (10 mg/L), ce qui est justifié par l'augmentation habituelle de la dispersion des résultats en allant vers les concentrations les plus faibles en raison de la difficulté de préparation des échantillons avec des faibles quantités notamment lors des prises d'essai et des dilutions, sachant que l'incertitude de mesure augmente avec la diminution des concentrations.

Cependant ces estimations de la fidélité et de la justesse ne représentent pas une finalité en elles-mêmes, elles ne permettent pas de prendre une décision quant à la validité de la méthode, elles servent par contre à la construction du profil d'exactitude utilisé pour l'interprétation des résultats, elles sont donc une étape intermédiaire obligatoire pour pouvoir évaluer si la procédure analytique va vraisemblablement pouvoir ou non quantifier avec une exactitude suffisante chacune des quantités inconnues.

2.6 Erreur totale

Selon le profil d'erreur totale élucidé dans la figure (40) tous les niveaux de concentration présentent une erreur totale relative acceptable ne dépassant pas les limites d'acceptabilité prédéfinies (±15%), excepté le premier niveau (10 mg/L) dont l'erreur totale dépasse largement les ±15%. Et ceci est confirmé par l'erreur maximale observée pour le premier niveau lors du calcul de l'exactitude relative.

2.7 Profil d'exactitude

En se référant au profil d'exactitude de la figure (41) obtenu avec la fonction d'étalonnage choisie, la méthode analytique mise au point est valide dans l'intervalle de dosage de [13.22 ; 50] mg/L, région où les limites de l'intervalle de tolérance ne sortent pas des limites d'acceptabilité (±15%).

Cela garantit que dans cet intervalle, la méthode est capable de produire une proportion de 85% des futurs résultats dans les limites d'acceptabilité $\lambda = \pm 15\%$, et seulement 15% des futures mesures d'échantillons inconnus pourraient être en dehors de ces limites.

2.8 Limites de quantification et intervalle de dosage

La méthode est considérée valide dans l'intervalle **[13,22 - 50] mg/L** pour lequel le profil d'exactitude est inclus dans les limites d'acceptation choisies [-15% ; +15%].

Le niveau 10 mg/L est exclu étant donné que le seul point d'intersection entre la limite supérieure de tolérance et la limite supérieure d'acceptabilité se trouve à un niveau estimé à 13,22 mg/L (entre 10 mg/L et 15 mg/L).

2.9 Linéarité

La linéarité a été évaluée à partir de cinq niveaux de concentration (10, 15, 20, 40 et 50) mg/L avec trois répétitions indépendantes pour chaque niveau de concentration.

La droite de régression linéaire obtenue est sous forme $y = 0,8994x + 0,0398$ où 0,8994 représente la pente de la droite et 0,0398 l'ordonnée à l'origine, avec un coefficient de détermination R^2 de 0,9647, signifiant ainsi que la variabilité totale de la concentration prédite est expliquée à 96,47 % par la variabilité de la concentration introduite de l'échantillon.

Le coefficient de détermination linéaire de la relation existante entre la concentration introduite et la concentration prédite est très acceptable. Bien que ce coefficient ne nous renseigne que très peu sur la qualité de la régression, sa valeur peut nous orienter, surtout par le fait qu'elle soit très proche de 1.

L'étude statistique de la linéarité illustrée par le tableau (XXXIV), a confirmé que la pente est

statistiquement non différente de 1 et que l'ordonnée à l'origine est comparable statistiquement avec 0 ce qui prouve la validité de la régression et la linéarité de la méthode.

2.10 Comparaison avec d'autres études

«Validation of a simple and economic HPLC-UV method for the simultaneous determination of vancomycin, meropenem, piperacillin and tazobactam in plasma samples » est un article élaboré par *Pola Milla, et al*, publié dans « Journal of Chromatography B » en juillet 2020. Son but est la validation d'une méthode de quantification simultanée du méropénème, de la Vancomycine, de la pipéracilline et du tazobactam dans des échantillons de plasma humain par Chromatographie Liquide à Haute Performance avec une détection par UV (HPLC-UV).

L'analyse chromatographique a été réalisée à l'aide d'une colonne thermostatée C18 et d'un détecteur UV réglé à une longueur d'onde de 220 nm. La phase mobile était un mélange de tampon phosphate 0,1 M à pH 3,15 et du méthanol, délivrée selon le mode gradient à 1 mL/min. La précipitation des protéines a été effectuée par l'acétonitrile.

Cette procédure a été validée sur une gamme de concentration allant de 1 à 100 ug/mL pour les paramètres analytiques suivants : spécificité, linéarité, exactitude, justesse, fidélité avec un CV inférieure à 4 %, LOD, LOQ de 1µg/mL.

Après calcul des paramètres de validation et évaluation statistique de différents critères, les résultats développés par notre procédure sont comparables avec ceux publiés dans cet article.

Un autre article intitulé « A simple and validated HPLC method for vancomycin assay in plasma samples: the necessity of TDM center development in Southern Iran » publié par *Parisa Ghasemiyeh, et al* dans le journal « School of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences » en mars 2020, décrit le développement et la validation d'une méthode simple pour la détermination de la Vancomycine dans le plasma par HPLC.

Dans cette étude, une étape de précipitation des protéines des échantillons antérieure a été effectuée à l'aide d'acide perchlorique 70 %, suivit d'une séparation chromatographique dans une colonne C18. Une phase mobile composée de tampon phosphate (30 mM, pH de 2,2) et d'acétonitrile (86 :14 % v/v) a été délivrée à un débit de 0,72 mL/min, la détection a été effectuée

à une longueur d'onde de 225 nm.

La validité de cette méthode de dosage de la Vancomycine par HPLC a été démontrée sur un intervalle de dosage bien défini allant de 1 à 30 µg/mL avec une justesse de 90-105 %, une fidélité dont le CV est inférieur à 5 % et une limite de quantification de 1µg/mL.

Les résultats obtenus par notre méthode sont similaires à ceux retrouvés dans cet article.

Ces comparaisons sont assez concluantes, ce qui fait de notre méthode un bon moyen de dosage de la Vancomycine dans le plasma.

2.11 L'intérêt du profil d'exactitude

Le profil d'exactitude est une approche globale à la fois statistique et graphique combinant la justesse et la fidélité. Il permet une vision générale de l'adéquation des performances de la méthode validée aux spécifications exigées dans le domaine d'application.

L'utilisation de cette approche nous a facilité la prise de décision quant à la validité de notre méthode tout en évaluant le risque associé à son utilisation et cela, en calculant les différents critères de validation ainsi que l'intervalle de tolérance à plusieurs niveaux de concentration.

Conclusion

Conclusion

La Vancomycine est un antibiotique à index thérapeutique étroit avec une forte variabilité pharmacocinétique interindividuelle et une toxicité rénale et auditive associée dans certains cas. Pour cela, chez les patients vulnérables, un suivi thérapeutique pharmacologique des taux plasmatiques de l'antibactérien est indispensable. Au cours de ce suivi, il est important d'utiliser une méthode analytique correctement validée pour obtenir des résultats fiables qui pourront être interprétés de façon satisfaisante.

Dans ce présent travail, a été proposée une méthode de dosage de la Vancomycine par Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à un détecteur UV-Visible, examinée et validée selon le protocole développé et proposé par les guides de validation SFSTP 2006, qui repose sur l'usage du profil d'exactitude comme outil de décision.

Les limites de quantification basse et haute sont respectivement de 13,22 et 50 mg/L, l'étalonnage est linéaire entre les limites de quantification avec un coefficient de détermination linéaire de 96,47 %. Les biais relatifs sont largement inférieurs à $\pm$ 10 %, la répétabilité et la reproductibilité sont inférieures à $\pm$5% et l'erreur totale ne dépasse pas les limites d'acceptabilité prédéfinies ($\pm$15 %) dans l'intervalle de dosage accepté.

La technique développée s'est avérée spécifique, juste, fidèle, exacte et linéaire dans l'intervalle de concentration [13,22 ; 50] mg/L avec un risque d'avoir au maximum 15% des futures mesures en dehors des limites d'acceptation fixées à [-15% ; +15%].
La méthode conçue est capable d'assurer un dosage rapide de la Vancomycine dans le plasma avec une sensibilité élevée et une excellente répétabilité, ce qui lui donne l'aptitude d'être utilisée en routine dans le cadre du suivi thérapeutique de l'antibiotique en question.

Recommandations

Recommandations

La validation de la présente méthode bio-analytique a présenté des difficultés en termes de :

- Recherche, essais et application des protocoles de dosage, en plus de l'optimisation qui prend un temps considérable ;
- Complexité du plasma nécessitant un prétraitement et du matériel adéquat ;
- Obligation d'effectuer plusieurs lavages de la colonne après chaque essai ;
- La dégradation rapide de la Vancomycine en raison de son instabilité à la lumière, à l'élévation de la température et au pH alcalin, qui exige donc l'analyse de tous les standards préparés le jour même.

Pour pallier à ses difficultés et d'améliorer ce travail, il nous est possible de proposer les recommandations suivantes :

- Utiliser une pré-colonne qui permet d'éliminer les interférences dues à la complexité de la matrice ;
- Étudier encore plus de paramètres surtout la robustesse de la méthode, et la stabilité des échantillons.
- Evaluer les conditions pré-analytiques à savoir le prélèvement, l'acheminement au laboratoire, et la conservation.
- Élaborer un système de contrôle qualité de la méthode ;
- Elargir l'intervalle de dosage surtout vers les concentrations les plus faibles ;
- Tester notre méthode sur des échantillons de patients traités par la Vancomycine et comparer les résultats retrouvés avec ceux obtenus par les méthodes déjà utilisées.
- Effectuer des dilutions ou des concentrations sur les échantillons qui présentent des valeurs supérieures ou inférieures respectivement aux limites de quantifications [13,22 ; 50] mg/L, avant de procéder au dosage par notre méthode.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

1. Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. Current opinion in microbiology. 2019 ;51 :72-80.
2. Levine DP. Vancomycin : a history. Clinical infectious diseases.2006 ;42(Supplement_1) : S5-S12.
3. De Vriese AS, Vandecasteele SJ. Vancomycin : the tale of the vanquisher and the pyrrhic victory. Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis. 2014 ;34(2) :154.
4. Phillips-Jones MK, Lithgo R, Dinu V, Gillis RB, Harding JE, Adams GG, et al. Full hydrodynamic reversibility of the weak dimerization of vancomycin and elucidation of its interaction with VanS monomers at clinical concentration. Scientific reports. 2017 ;7(1) :1-10.
5. Monographie –PrChlorhydrate de Vancomycine pour injection, USP.
6. Belahreche K. Le suivi thérapeutique de la Vancomycine en milieu hospitalier :Université de Lorraine ; 2014.
7. Mol-Instincts Realtime Predictor. A Fundamental Property Predictor based on QSPR,Copyright by ChemEssen, Inc [Available from: https://www.google.com/url?q=http://www.chemrtp.com/chemical-info.ce?ID%3DMYPYJXKWCTUITO-LYRMYLQWSA-N&sa=D&source=docs&ust=1652800599393461&usg=AOvVaw1HhqiJ-buWoGpe_xGNpM9s.Consulté le 05 mai 2022.
8. Banner W, Jr., Ray CG. Vancomycin in perspective. American journal of diseases of children (1960). 1984 ;138(1) :14-6.
9. BASE DE DONNÉES PUBLIQUE DES MÉDICAMENTS. VANCOMYCINE SANDOZ 500 mg, poudre pour solution à diluer pour perfusion ou pour solution buvable 29/12/2021 [Available from: https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=64022454&typedoc=R.Consulté le 22 mars 2022.
10. Chiquet C, Romanet J. Prescribing fortified eye drops. Journal Francais D'ophtalmologie. 2007 ;30(4) :423-30.
11. Clément NINO ÉB, Théo HENRIET, Mélisande BERNARD,Estelle SURGET, François GUYON VP, Bernard DO. Etudes-de-compatibilité-en-solution-entre-la-Vancomycine-et-la-Ticarcilline.
12. Matzke G, Zhanel G, Guay D. Clinical pharmacokinetics of vancomycin. Clinical pharmacokinetics. 1986 ;11(4) :257-82.
13. LFAQUIR A. Prise en charge d'une épidémie d'entérocoque résistant aux glycopeptides 2017.
14. CHMP. Vancomycin Article 31-1440.2017 :35.
15. Benhammou Zakarya BF. Thése de fin d'etudes, Suivi Therapeutique et Pharmacologique de la Vancomycine, Université de Tlemcen Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers,2017.
16. Kaltenbach ML, Vistelle R. Adaptation de la posologie des antibiotiques II. Les glycopeptides. Revue Francaise des Laboratoires. 1998 ;1998(304) :47-54.
17. Pou L, Rosell M, Lopez R, Pascual C. Changes in vancomycin pharmacokinetics during treatment. Therapeutic drug monitoring. 1996 ;18(2) :149-53.
18. Leone M, Ayem M, Martin C, editors. Les glycopeptides. Annales francaises d'anesthesie et de reanimation; 2000: Elsevier.
19. Jelassi ML, Benlmouden A, Lefeuvre S, Mainardi J-L, Billaud EM. Niveau de preuve pour le suivi thérapeutique pharmacologique de la Vancomycine.Therapies.2011 ;66(1) :29-37.

20. Hospitalier P, BOURGUIGNON ML, MAIRE MP. Comparaison de différentes formules d'estimation de la fonction rénale pour la prédiction des concentrations de Vancomycine en gériatrie par une approche de population.
21. R. M. Dosage des médicaments, tome II, Cahier de BIOFORMA N 18. Paris, chapitre Vancomycine. Janvier 2000 :125-35.
22. Jordan DC, Inniss WE. Selective inhibition of ribonucleic acid synthesis in Staphylococcus aureus by vancomycin. Nature. 1959 ;184(Suppl 24) :1894-5.
23. LES GLYCOPEPTIDES I/ STRUCTURE ET [Available from: https://nanopdf.com/download/chapitre-i-les-glycopeptides-i-structure-et_pdf.
24. Eurofins Biomnis.Vancomycine 2013 [Available from: https://www.eurofins-biomnis.com/services/referentiel-des-examens/page/VANC/.Consulté le 17 mai 2022.
25. Arnould J, Gerson P, Lanoy J, Latarjet J, Le Floch R, Lebreton F, et al. Table Ronde du congrès 2011. Brûlures. 2011 ;12(3).
26. McEvoy G, Snow E. American Society of Health-System Pharmacists. AHFS drug information 2018. American Society of Health System Pharmacists United States : Bethesda, MD ;2018.
27. 27 posos.Vancomycine [Available from : https://www.posos.co/app/medicaments/Vancomycine. Consulté le 3 mai 2022.
28. Cornut P-L, Chiquet C. Injections intravitréennes d'antibiotiques et endophtalmies. Journalfrançais d'ophtalmologie. 2008 ;31(8) :815-23.
29. Fuhrman LC, Jr., Stroman RT. Stability of vancomycin in an extemporaneously compounded ophthalmic solution. American journal of health-system pharmacy : AJHP : officialjournal of the American Society of Health-System Pharmacists. 1998 ;55(13) :1386-8.
30. Sautou-Miranda V, Libert F, Grand-Boyer A, Gellis C, Chopineau J. Impact of deep freezing on the stability of 25 mg/ml vancomycin ophthalmic solutions. International journal of pharmaceutics. 2002 ;234(1-2) :205-12.
31. Chédru-Legros V, Fines-Guyon M, Chérel A, Perdriel A, Albessard F, Debruyne D, et al. Stabilité à–20 C des collyres antibiotiques renforcés (amikacine, ceftazidime, Vancomycine). Journal français d'ophtalmologie. 2007 ;30(8) :807-13.
32. Daurel C, Leclercq R. Faut-il abandonner la Vancomycine ? Archives de pédiatrie.2010 ;17 : S121-S8.
33. Lacarelle B, Baltasat A, Bouquet S, Venisse N. Suivi thérapeutique pharmacologique de laVancomycine. EMC - Biologie Médicale. 2006 ;1(1) :1-4.
34. Bailie GR, Neal D. Vancomycin ototoxicity and nephrotoxicity. A review. Medical toxicology and adverse drug experience. 1988 ;3(5) :376-86.
35. Jonville-Béra A-P, Vial T. Médicaments et grossesse : prescrire et évaluer le risque : Elsevier Masson ; 2012.
36. Le Guellec C, Simon N, Hulot J, Billaud E, Marquet P. Méthodologie pour l'évaluation duniveau de preuve du suivi thérapeutique pharmacologique. La Lettre du pharmacologue (Boulogne). 2009 ;23(1) :29-34.
37. Couderc Sylvain, Nicolas P. Le suivi thérapeutique pharmacologique. Actualités Pharmaceutiques. 2017 ;56(570) :47-50.
38. Widmer N, Grouzmann E, Fayet A, Csajka C, Decosterd LA, Buclin T, et al. Suivi thérapeutique des médicaments (II) La pratique clinique. Revue médicale suisse. 2008 ;4(165).
39. Covrig A, Bolduc D, Croteau S, Després A-A, Dumaresq J, Vigneault M. Guide élaboré avec l'approbation du comité d'antibiogouvernance du CISSS de Chaudière-Appalaches.
40. Hammett-Stabler CA, Johns T. Laboratory guidelines for monitoring of antimicrobial drugs. National Academy of Clinical Biochemistry. Clinical chemistry. 1998 ;44(5) :1129-40.
41. PRINCIPES DE METHODES DE DOSAGE- NOTION DE SENSIBILITE ET PRECISION. [Available from : https://pharmacomedicale.org/. Consulté le 3 mars 2022.

42. Suivi Thérapeutique Pharmacologique.
[Available from : https://docplayer.fr/87478555-Suivi-therapeutique-pharmacologique.html?fbclid=IwAR04nA47V6mCyq-Rh2rweX9kDSZPecJx28Y89SyBNfyjvmksRAi_MjXlCwg. Consulté le 5 avril 2022.
43. Baldeshwiler AM. History of FDA good laboratory practices. The Quality Assurance Journal : The Quality Assurance Journal for Pharmaceutical, Health and Environmental Professionals. 2003 ;7(3):157-61.
44. Tripathi K. Essentials of medical pharmacology : JP Medical Ltd ; 2013.
45. Sushmaa B, Vijayaraja S. Bioanalytical Techniques–An Overview. PharmaTutor.2015 ;3(9) :14-24.
46. AFNOR. NF EN ISO 8402.Management de la qualité et assurance de la qualité - Vocabulaire (Norme européenne). Juillet 1995.
47. ISO N. CEI 17025, Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais (Norme AFNOR). Saint-Denis : 2005.
48. Guideline IHT. Validation of analytical procedures : text and methodology. Q2 (R1).2005 ;1(20) :05.
49. Borman P, Elder D. Q2 (R1) validation of analytical procedures. ICH Quality guidelines. 2017 ;5 :127-66.
50. De Bièvre P. The 2012 International Vocabulary of Metrology : ''VIM''. Chemistry International--Newsmagazine for IUPAC. 2012 ;34(3) :26-7.
51. Pinguet I. Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie. Sciences pharmaceutiques. 2015 : P14.
52. Armand S. Analyse des différentes approches de validation des méthodes de dosage et proposition d'un guide de validation de méthode de dosage en pharmaciehospitalière. 2014-2015.
53. Drugs UNOo, Laboratory C, Section S. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment Used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens: A Commitment to Quality and Continuous Improvement: United Nations Publications; 2009.
54. Ahuja S, Scypinski S. Handbook of modern pharmaceutical analysis : Academic press ; 2001.
55. Caporal-Gautier J, Nivet J, Algranti P, Guilloteau M, Histe M, Lallier M. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. II : Exemples d'application. STP pharmapratiques. 1992 ;2(4) :227-39.
56. ISO/IEC. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. 2017 ;1-5.
57. (IBN) Ibdn. Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Partie 2 :Méthode de base pour la détermination de la répétabilité d'une méthode de mesure normalisée. ISO ; 1996.
58. Guideline for Industry : Text on Validation of Analytical Procedures. ICH ; 1995.
59. Guidance for Industry : Q2B Validation of Analytical Procedures : Methodology. ICH ; 1996.
60. FDA U. Guidance for industry : bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CV). 2001.
61. (RSSC) FFPRSSC. Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FoodsProgram, 3rd EditionOctober 17, 2019 : [43 p].
62. Caporal-Gautier J, Nivet J, Algranti P, Guilloteau M, Histe M. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. I : Méthodologie. STP pharma prat. 1992 ;2(4) :205-26.
63. Caporal-Gautier J, Nivet J, Algranti P, Guilloteau M, Histe M. Guide de validation

analytique. Rapport d'une commission SFSTP. II : Exemples d'application. STP pharma pratiques.1992 ;2(4) :227-39.
64. Chapuzet E, Mercier N, LAPARRA M, LAURENTIE M, NIVET J. Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d'unecommission SFSTP. STP pharma sciences. 1997 ;7(3) :169-94.
65. Chapuzet E, Mercier N, LAPARRA M, LAURENTIE M, NIVET J. Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques. Exemple d'application de la stratégiede validation. Rapport d'une commission SFSTP. STP pharma pratiques. 1998 ;8(2) :81-107.
66. Hubert P N-HJ, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C, et al. Validation des procédures analytiques quantitatives harmonisation des démarches ; Validation of quantitative analytical procedure, harmonization of approaches. STP pharma prat. 2003 ;13 :101-38.
67. DE FONTENAY G, RESPAUD J, PUIG P, LEMAIRE C. Analyse des performances d'une méthode analytique. Evaluation des risques lors d'une utilisation en routine. STP pharma pratiques. 2011 ; 21(2).
68. Christian D. Chimie analytique, analyse chimique et chimiométrie: Concepts, démarche et méthodes: Lavoisier; 2014.
69. ANSES, (Pôle Recherche et référence). Guide de validation des méthodes d'analyses, ANSES/PR3/07/01 version (a), 2015.
70. Moein MM, El Beqqali A, Abdel-Rehim M. Bioanalytical method development and validation : Critical concepts and strategies. Journal of chromatography B, Analytical technologiesin the biomedical and life sciences. 2017 ;1043 :3-11.
71. Nicolas O, Farenc C, Bressolle F, editors. Stratégie de validation de méthodes de dosage enbio-analyse en vue d'études pharmacocinétiques et toxicologiques. Annales de toxicologie analytique ; 2004 : EDP Sciences.
72. Micro-extraction en phase liquide. [Available from : https://fr.slideshare.net/LarbaouiAmina/microextraction-en-phase-liquide-sdme.Consulté le 21 mars 2022.
73. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures : a SFSTP proposal—part I. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2004 ;36(3) :579-86.
74. Feinberg M, Boulanger B, Dewe W, Hubert P. New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. Analytical and bioanalytical chemistry. 2004 ;380(3) :502-14.
75. Lantéri P, Longeray R. Chimiometrie: le mariage reussi entre les sciences analytiques et l'informatique. Analusis. 1996 ;2(24) :M17-M27.
76. Norme I. 3534-2 : Vocabulaire et symboles Partie 2 : Statistique appliquée. ISO, Genève. 2006.
77. Vessman J. Selectivity or specificity ? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. Journal of pharmaceutical andbiomedical analysis. 1996 ;14(8-10) :867-9.
78. Jitaru P, Chekri R, Fisicaro P, Guérin T. METHOD VALIDATION BY MEANS OF THE ACCURACY PROFILE : A REALISTIC APPROACH FOR ROUTINE CHEMICAL LABORATORIES. 2016.
79. Marini R. Evaluation des différentes approches pour l'estimation de l'incertitude des Mesures analytiques,Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Pharmaceutiques , Université de Liège.2005-2006.
80. Feinberg M LM. Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. Numero special du cahier des techniques de l'Inra. 2010.
81. Hubert P N-HJ-J, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon P-A, et al. Validation

des procédures analytiques quantitatives : harmonisation des démarches-Partie II. Statistiques. STPpharma prat. 2006 ;16 :87-121.
82. SLIMANI S, ZALOUK T, ZERBOUT H. MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DE FUROSEMIDE DANS DES COMPRIMES DE 40 mg PAR LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE [Mémoire] Tizi Ouzou. 2019.
83. Hubert C, Lebrun P, Boulanger B, Hubert P. Cycle de vie des méthodes, vers une maîtrise intégrée des performances quantitatives. 2017.
84. PD ISO/TS 22176 :2020, Cosmétiques. Méthodes analytiques. Développement d'une approche globale pour la validation des méthodes analytiques quantitatives.
85. Bouabidi MA. Thèse Doctorat en Sciences Pharmaceutiques. Etude Critique des Différentes Approche de Validation des méthodes Analytique. Faculté des Sciences Ben M'Sik Casablanca. Faculté de Médecine Département Pharmacie Université de Liège ; 2014.
86. Greg Cooper C, MHA Leçons de Base de Contrôle de Qualité au Laboratoire : Bio-Rad Laboratories, Inc. Quality Systems Division ; 2009.
87. Rozet E. Improvement of the Predictive Character of Test Results Issued from Analytical Methods Life Cycle : Université de Liège, Liège, Belgique ; 2008.
88. Hutchings MI, Rouessac F, Rouessac A, Cruché D. ANALYSE CHIMIQUE.Méthodes et techniques instrumentales modernes. 6 ed: Dunod; 2004.
89. Académie De Normandie. HPLC Principe et appareillage 20-01-2010 [Available from: https://sms-bse-bgb.ac-normandie.fr/?article475. Consulté le 16 fevrier 2022.
90. Marie-Paule Bassez. La chromatographie en phase liquide CPL 24-11-2011 [Available from: https://docplayer.fr/12138653-La-chromatographie-en-phase-liquide-cpl-marie-paule-bassez-http-chemphys-u-strasbg-fr-mpb.html. Consulté le 7 mars 2022.
91. Véronique JACOB. La Chromatographie Liquide Haute Performances (HPLC). 22-08-2010 [Available from: https://docplayer.fr/8331861-La-chromatographie-performance-HPLC-salle-de-tp-de-genie-analytique-presentation-theorique-de-la-HPLC-type-de-document-dt.html. Consulté le 10 mars 2022.
92. CHIMACTIV. Quelles sont les bases de l'HPLC [Available from : http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/bases/HPLC. Consulté le 28 avril 2022.
93. CAUDE M, JARDY A. Chromatographie en phase, liquide : Théorie et méthodes de séparation. Techniques de l'ingénieur Analyse et caractérisation.1994 ;2(P1455) : p1455.1-p. 44.
94. Chimie Analytique. Chromatographie Liquide à Haute Performance HPLC [Available from : https://chimieanalytique.com/chromatographie-liquide-haute-performance-HPLC/. Consulté le 16 avril 2022.
95. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Watts J. Clarke's analysis of drugs and poisons : Pharmaceutical press London ; 2011.
96. Frendi Z, Sarah L. Mise au point, Optimisation et validation d'une méthode d'analyse physico-chimique d'un produit pharmaceutique par HPLC : Université Mouloud Mammeri ; 2015.
97. Ben Saad L. Study of the separation of fluoroquinolones using HPLC : Application to the study of their degradation by gamma radiation ; Etude de la separation des fluoroquinolones par HPLC : Application a l'etude de leur degradation par rayonnement Gamma : tunisia ; 2013.
98. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principes d'analyse instrumentale : De Boeck Supérieur ;2003.
99. Burgot G, Burgot J-L. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications : méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques : Lavoisier ; 2011.
100. CHROMATOGRAPHIE - ASPECTS GENERAUX [Available from : https://www.farm.ucl.ac.be/tpao/tpintegres/HPLC/documents/chapitre3.pdf. Consulté le 11

mai 2022.
101. Marie Paule Bassez. NOTIONS FONDAMENTALES DE CHROMATOGRAPHIE [Available from : https://www.chemphys.fr/mpb/teach/chromato1/chromato1.pdf. Consulté le 11 mars 2022.
102. Mahuzier G, Hamon M, Ferrier D, Prognon P. Chimie analytique. vol. 2, méthodes de séparation.
103. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Introduction to modern liquid chromatography: John Wiley & Sons; 2011.
104. Jeffery G, Mendham J, Denney R, Bassett J. Text book of quantitative chemicalanalysis 2016.
105. Pharmacopie Européenne neuvième édition, Tome I, 2017.
106. AOUDJEGHOUT R, AZIDANE A, KAHLOUCHE M. Etude de l'impact de la sécabilitédes comprimés sur l'uniformité de la masse et de la teneur en principe actif ; cas pratique : Furosémide. 2020.

ANNEXES

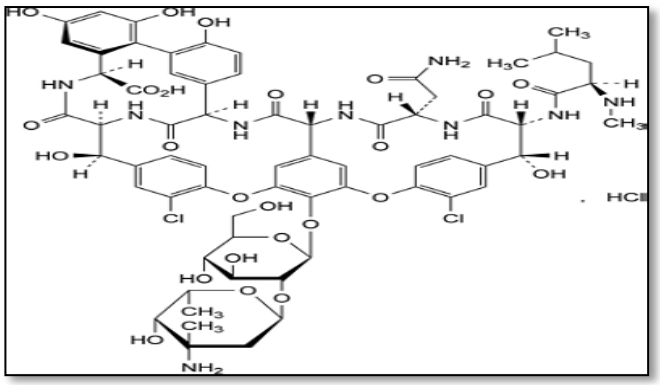
ANNEXE I
MONOGRAPHIE DE LA VANCOMYCINE

ANNEXE I : MONOGRAPHIE DE VANCOMYCINE (Pharmacopée Européenne)

VANCOMYCINE (CHLORHYDRATE DE)

01/2008 :1058
Corrigé 7.0

Vancomycini hydrochloridum



$C_{66}H_{76}Cl_3N_9O_{24}$ *M*r. 1486

DÉFINITION

Chlorhydrate d'un mélange de glycopeptides apparentés dont le constituant principal est le monochlorhydrate d'acide(3*S*,6*R*,7*R*,22*R*,23*S*,26*S*,30a*S*a,36*R*,38a*R*)-3-(2-amino-2-oxoéthyl)-44-[[2-*O*-(3-amino-2,3,6-tridésoxy-3-*C*méthyl--L-*lyxo*-hexopyranosyl)-D-glucopyranosyl]oxy]-10,19-dichloro-7,22,28,30,32-pentahydroxy-6-[[(2*R*)-4-méthyl-2-(méthylamino)pentanoyl]amino]-2,5,24,38,39-pentaoxo-2,3,4,5,6,7,23,24,25,26,36,37,38,38a-tétradécahydro-22*H*-8,11:18,21-diéthéno-23,36-(iminométhano)-13,16:31,35- diméthéno-1*H*,13*H*-[1,6,9]oxadiazacyclo hexadécino[4,5-*m*][10,2,16]benzoxadiazacyclotétracosène-26-carboxylique (Vancomycine B).

- Substance élaborée par certaines souches de *Amycolatopsis orientalis* ou obtenue par tout autre moyen.
- *Activité* : au minimum 1050 UI/mg (substance anhydre).

CARACTÈRES

-Aspect : poudre blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique.
-Solubilité : facilement soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

IDENTIFICATION

A. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de la Vancomycine B.

Résultats : le pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a) est semblable quant à son temps de rétention au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

B. Le chlorhydrate de Vancomycine donne la réaction (a) des chlorures (*2.3.1)*

ESSAI

Aspect de la solution. La solution est limpide (*2.2.1*) et son absorbance (*2.2.25*) à 450 nm est au maximum de 0,10.
Dissolvez 2,50 g de chlorhydrate de Vancomycine dans de l'*eau R* et complétez à 25,0 mL avec le même solvant.
pH (*2.2.3*) : 2,5 à 4,5.
Dissolvez 0,50 g de chlorhydrate de Vancomycine dans de l'*eau exempte de dioxyde decarbone R* et complétez à 10 ml avec le même solvant.
Vancomycine B. Chromatographie liquide (*2.2.29*). Utilisez les solutions dans les 4 h suivant leur préparation.
-*Solution à examiner (a)*. Dissolvez 10,0 mg de chlorhydrate de Vancomycine dans la phase mobile A et complétez à 5,0 mL avec la phase mobile A.
-*Solution à examiner (b)*. Prélevez 2,0 mL de solution à examiner (a) et complétez à 50,0 mL avec la phase mobile A.
-*Solution à examiner (c)*. Prélevez 0,5 mL de solution à examiner (b) et complétez à 20,0 mL avec la phase mobile A.
-*Solution témoin*. Dissolvez le contenu d'un flacon de *chlorhydrate de Vancomycine SCR* dans de l'*eau R* et complétez avec le même solvant pour obtenir une solution à 0,5 mg/mL.
Chauffez à 65 °C pendant 24 h. Laissez refroidir.

Colonne :
- Dimensions : l = 0,25 m, Ø = 4,6 mm
- Phase stationnaire : gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R (5 µm).

Phase mobile :
- *Phase mobile A* : à 4 mL de *triéthylamine R*, ajoutez 1996 mL d'*eau R*, puis ajustez à pH 3,2 avec de l'*acide phosphorique R* ; à 920 mL de cette solution, ajoutez 10 mL de *tétrahydrofurane R* et 70 mL d'*acétonitrile R* ;
- *Phase mobile B* : à 4 mL de triéthylamine R, ajoutez 1996 mL d'eau R, puis ajustez à pH 3,2 avec de l'acide phosphorique R ; à 700 mL de cette solution, ajoutez 10 mL de tétrahydrofurane R et 290 mL d'acétonitrile R.

Intervalle (min). mobile B (pour cent V/V)	Phase mobile A (pour cent V/V)	phase
0-13	100	0
13-22	100→ 0	0→100

-Débit : 1,0 mL/min.
-Détection : spectrophotomètre à 280 nm.
-Injection : 20 µL.

Conformité du système :

- *résolution* : au minimum 5,0 entre les 2 pics principaux dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

- *rapport signal/bruit* : au minimum 5 pour le pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (c).

-*facteur de symétrie* : au maximum 1,6 pour le pic dû à la Vancomycine dans lechromatogramme obtenu avec la Solution à examiner (b).

Calculez la teneur pour cent en chlorhydrate de Vancomycine B à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_{b\times 100}}{A_b+\left(\frac{A_i}{25}\right)}$$

Ab = surface du pic dû à la Vancomycine B dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b).
At = somme de la surface des pics dus aux impuretés dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner(a).

Limites :

-Vancomycine B : au minimum 93,0 pour cent.
Substances apparentées. Chromatographie liquide (*2.2.29*) selon les indications de l'essai de la Vancomycine B avec les modifications suivantes.
Injection : solutions à examiner (a), (b) et (c).
Calculez la teneur pour cent de chaque impureté à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{\left(\frac{A_i}{25}\right)\times 100}{A_b+\left(\frac{A_i}{25}\right)}$$

Ai = surface du pic dû à l'impureté considérée dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a),
A_b = surface du pic dû à la Vancomycine B dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b),
A_t = somme de la surface des pics dus aux impuretés dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a).

Limites :
- Toute impureté : pour chaque impureté, au maximum 4,0 pour cent.
- Total : au maximum 7,0 pour cent.
- Limite d'exclusion : la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (c) (0,1 pour cent).

Métaux lourds (*2.4.8*) : au maximum 30 ppm.

1,0 g de chlorhydrate de Vancomycine satisfait à l'essai C.

Préparez la solution témoin avec 3,0 mL de solution à 10 ppm de plomb (Pb)R.

Eau (*2.5.12*) : au maximum 5,0 pour cent, déterminé sur 0,500 g de chlorhydrate de Vancomycine.
Cendres sulfuriques (*2.4.14*) : au maximum 1,0 pour cent, déterminé sur 1,00 g de chlorhydrate de Vancomycine.
Endotoxines bactériennes (*2.6.14*) : moins de 0,25 UI/mg, si le chlorhydrate de Vancomycine est destiné à la fabrication de préparations parentérales sans autre procédé approprié d'élimination des endotoxines bactériennes.

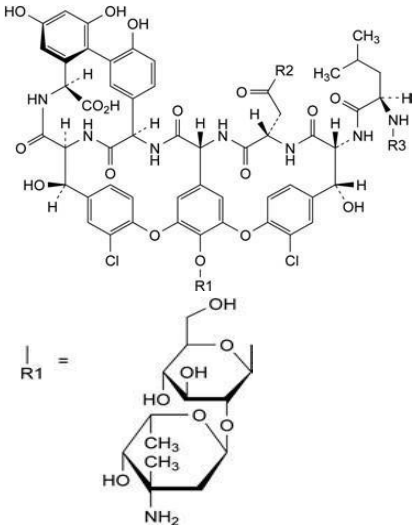
TITRAGE

Effectuez le titrage microbiologique des antibiotiques (*2.7.2*). Utilisez le chlorhydrate de Vancomycine SCR comme substance chimique de référence.

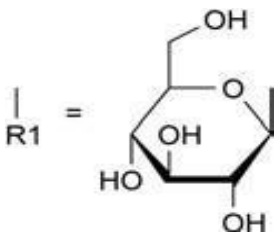
CONSERVATION

En récipient étanche, à l'abri de la lumière. Si la substance est stérile, elle est conservée en récipient stérile, étanche, à fermeture inviolable.

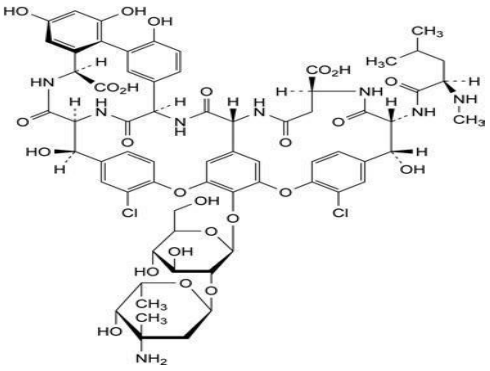
IMPURETÉS



A. R2 = NH2, R3 = H : *N*-déméthyl Vancomycine B
C. R1 = H, R2 = NH2, R3 = CH3 : agluco Vancomycine B,

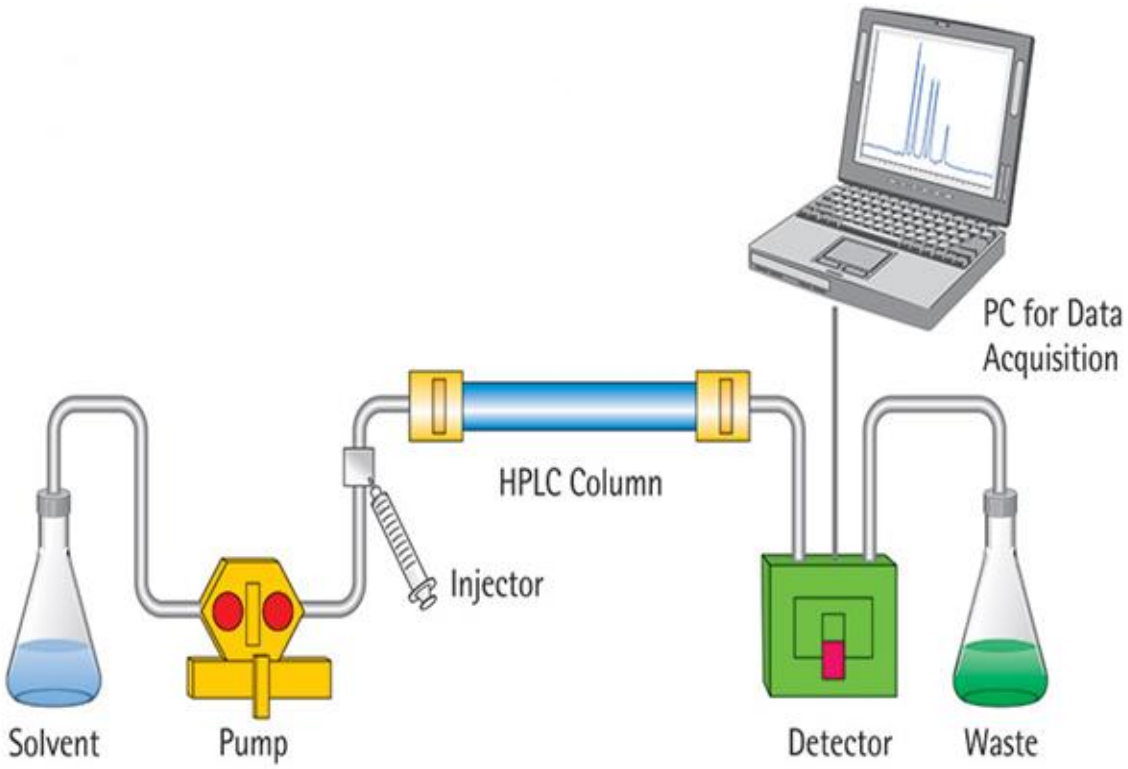


D. R2 = NH2, R3 = CH3 : dévancosaminyl Vancomycine B.



B. acide (4*S*,7*R*,8*R*,23*R*,24*S*,27*S*,31a*S*a,37*R*,39a*R*) -45- [[2-*O*-(3-amino-2,3,6-tridésoxy-3-C-méthyl-α-L -*lyxo* hexopyranosyl) -β-D - glucopyranosyl]oxy]-11,20-dichloro-8,23,29,31,33-pentahydroxy-7-[[(2*R*) -4-méthyl-2- (méthylamino) pentanoyl]amino]-2,6,25,39,40- pentaoxo -1,2,3,4,5,6,7,8,24,25, 26,27,37,38,39,39a-hexadécahydro-23*H*-9,12 :19,22-diéthéno-24,37-(iminométhano) -14,17 :32,36-diméthéno-14*H* [1,6,10] oxadiazacycloheptadécino [4,5*m*][10,2,16]benzoxadiazacyclotétracosine-4,27-dicarboxylique([β-Asp3] Vancomycine B).

ANNEXE II
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE HPLC



ANNEXE II : HPLC

Généralités sur la chromatographie

La chromatographie est une méthode physico-chimique de séparation ou de purification des constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux en vue de leur identification et quantification. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles l'une, dite stationnaire solide ou liquide, le plus souvent emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile liquide ou gazeuse, se déplace au contact de la première. [88]

La chromatographie comporte plusieurs systèmes et techniques chromatographiques qu'on classe selon différents critères : nature des deux phases en présence, du procédé, ou du phénomène physico-chimique responsable de la séparation. [88]

Ces techniques sont représentées dans la figure (43)

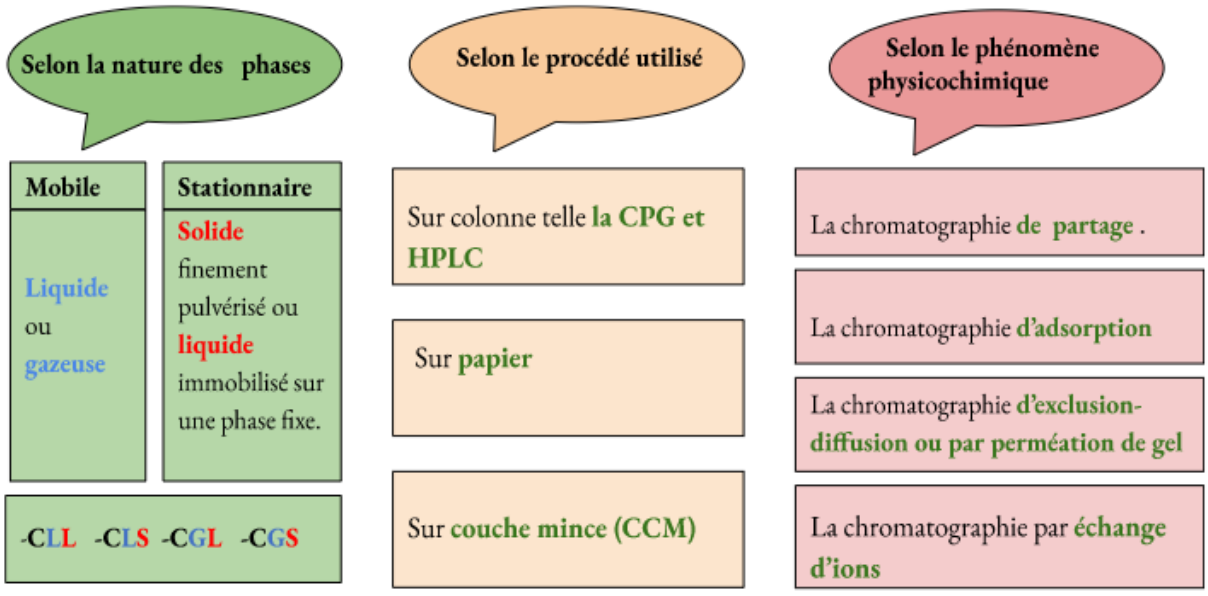


Figure 43 : Classement des différentes techniques chromatographiques

La Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

La Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) est la version de la chromatographie liquide sur colonne la plus répandue. À l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre et sous basse pression, l'augmentation de la pression a donné naissance à la chromatographie liquide sous haute pression. Par la suite ses performances en termes de sélectivité et résolution se sont perfectionnées par le choix de la composition de la phase mobile et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées, c'est comme ça que le P de pression est devenu le P de performance. [88-89]

Principe

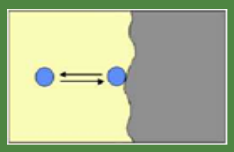
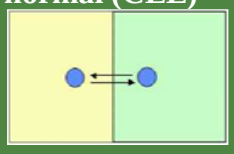
Les composés à séparer seront préalablement mis en solution puis injectés et entraînés par la phase mobile liquide propulsée par une pompe sous haute pression, le mélange va parcourir le système chromatographique. Selon leur nature, les molécules vont interagir à différents degrés avec la phase stationnaire de la colonne chromatographique, et vont se répartir entre les deux phases non miscibles selon leur affinité et leur coefficient de distribution. En sortant de la colonne, et grâce à un détecteur approprié, les différents solutés seront représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés forme le chromatogramme.
Des mécanismes d'échanges soluté/phase mobile/phase stationnaire basés sur les coefficients d'adsorption ou de partage est la principale particularité de cette méthode. [89]

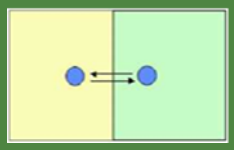
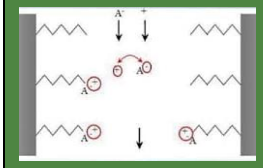
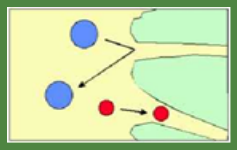
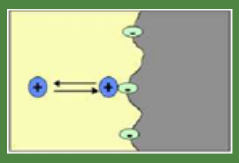
Principales modalités de la chromatographie liquide

Le choix du procédé chromatographique va dépendre des propriétés physicochimiques des solutés à séparer notamment leur poids moléculaire, leurs polarités et leurs caractères ioniques. Les différents types de chromatographie liquide sont complémentaires plutôt que concurrents.

Selon la nature des phases stationnaire et mobile utilisées en chromatographie liquide on distingue différents types de procédés résumés dans le tableau (XXXVII).

Tableau XXXVII : Types de modalités de chromatographie liquide.

Type	Phase stationnaire	Phase mobile	Principe
Adsorption (CLS) 	Phase solide constituée d' un adsorbant : -polaire (Exp : gel de silice poreuse +++), -peu polaire (Exp : charbon actif).	Solvant polaire (Exp : méthanol) ou apolaire (Exp : éther)	Les molécules s'adhérent par un double effet de physisorption et de chimisorption sur la phase stationnaire. La rétention des composés non polaires est due à une suite de processus d'adsorption/désorption. [88-90]
Partage en phase normal (CLL) 	Phase liquide fixe polaire déposée ou greffée sur un matériau inerte ayant un rôle de support solide (Exp :CN)	Phase liquide peu ou moyennement polaire (Exp : isopropanol)	La rétention est basée sur le partage du soluté entre les deux phases liquides, les composés peu polaires sont élués en premiers. [88-91]

Partage à polarité inversée de phase +++ (CLL) 	Phase liquide fixe apolaire déposée ou greffée sur un support solide (Exp : silice greffée par des chaînes C8 C18)	Phase liquide polaire (Exp : acétonitrile, méthanol, eau)	La rétention est basée sur le partage du soluté entre les deux phases liquides (solubilité relative), ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. [91]
Appariement d'ions ou paire d'ions (CLL) 	Phase apolaire (Exp : silice greffée : colonnes C8, C18)	Phase éluante contenant le contre ion	L'association de deux ions de charges opposées peut être due soit à des interactions électrostatiques ou hydrophobes. Elle permet des séparations chromatographiques de substances ionisées ou ionisables. [91]
Exclusion-Diffusion (CLS) 	Phase solide poreuse (pores de dimension choisie selon la taille des espèces à séparer) -Hydrophile (filtration sur gel). -Hydrophobe (perméation de gel).	Phase liquide : - Aqueuse (filtration sur gel) - Organique (perméation de gel).	Dans ce mode la séparation des solutés se fait d'après leur dimension moléculaire. Le coefficient de distribution prend le nom de coefficient de diffusion. [88]
Échange d'ions (CLS) 	Solide, c'est un échangeur d'ions comportant des groupements fonctionnels ionisés, fixes, porteurs de charge + ou - et des ions mobiles de signe contraire assurant l'électroneutralité.	C'est une solution aqueuse ionique contenant un électrolyte (généralement un tampon de pH) contenant l'ion présent dans l'échangeur.	La rétention est basée sur les interactions d'attraction entre les groupements chargés de la phase stationnaire et les solutés portant une charge opposée. La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique. Il se crée des équilibres du type : $(R^-X^+)_S + A^+_M \rightleftarrows (R^-A^+)_S + X^+_M$ ou $_S$ et $_M$ représentent la phase stationnaire et mobile. Selon les proportions des solutés à l'équilibre, l'échangeur aura plus d'affinité pour l'espèce A ou X selon leur proportion d'où leur séparation. [88-91]

Conception générale d'un appareil HPLC

L'instrumentation classique d'une chaîne HPLC comporte différents constituants spécialisés se présentant dans des boîtiers distincts ou intégrés dans le même châssis : un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage, un injecteur, une colonne, un détecteur et un système d'acquisition de données. Ces modules sont reliés par des canalisations courtes et de très faible diamètre interne assurant la circulation de la phase mobile. Elles peuvent être en acier inoxydable 316 ou en PEEK (polyetheretherketone).

Une conception générale de l'appareil d'HPLC est représentée par la figure (44) suivante

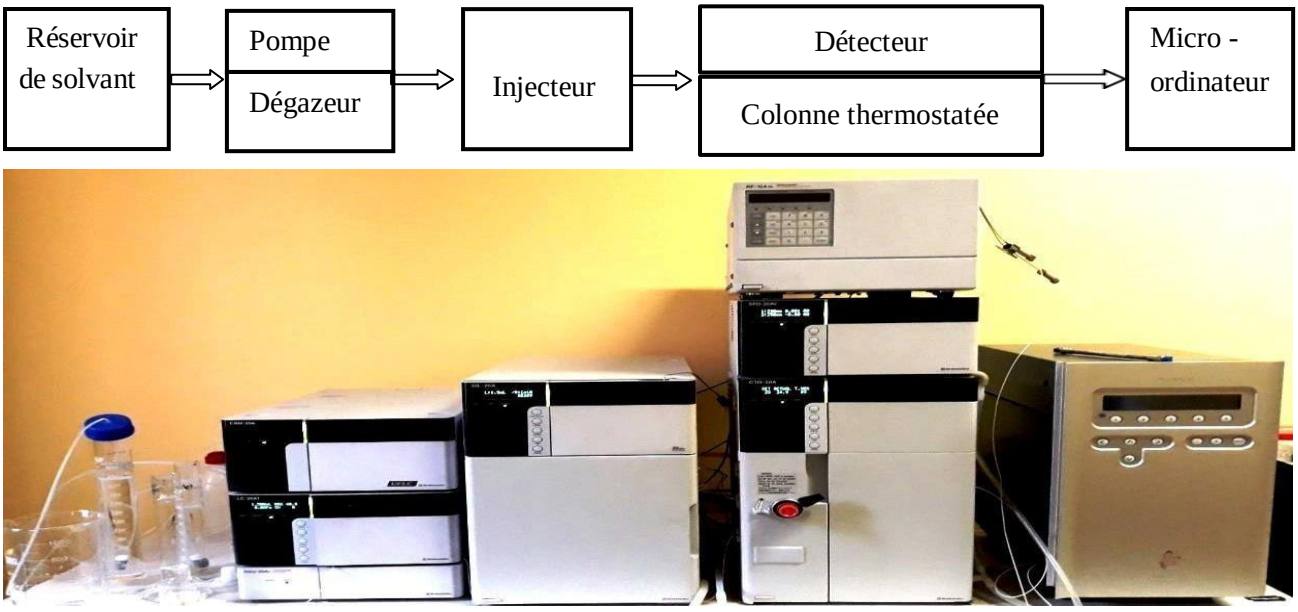


Figure 44 : Schéma d'une installation de CLHP avec triple détection. Un exemple de réalisation de type modulaire.

Réservoir de la phase mobile (solvant)

L'automate dispose d'un ou de plusieurs réservoirs en verre ou parfois en acier inoxydable de contenance d'environ 1 litre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. Ces réservoirs assurent l'exécution des analyses sans interruption et sont souvent hermétiques empêchant l'évaporation ou la contamination des solvants.

Dégazeur

À fin d'éviter la perturbation de l'analyse chromatographique, il est nécessaire de dégazer les solvants soit par des dispositifs de dégazage (par barbotage ou par mise sous vide), soit par ultrasons. Cette étape permettra l'élimination des gaz dissous et notamment de l'oxygène, agent responsable de la dégradation des échantillons et de la phase stationnaire par oxydation. [91]

La phase mobile

Suivant un principe général, à une phase stationnaire polaire on oppose une phase mobile peu ou pas polaire et vice-versa. La chromatographie est dite en phase normale dans le premier cas et à polarité de phase inverse (« R − HPLC ») dans le second. [88]

La phase mobile représente le vecteur de l'échantillon à analyser, son choix est d'une grande importance car chaque séparation nécessite une polarité de la phase mobile qui lui est propre. En changeant la composition de la phase mobile, donc sa polarité, on agit par l'intermédiaire des coefficients de distribution sur les facteurs de rétention k des composés. [88-89]

Une phase mobile peut être composée d'un ou de plusieurs solvants et à chaque composition correspond une force éluante qui caractérise son pouvoir d'entraîner les solutés comme l'illustre la figure (45).

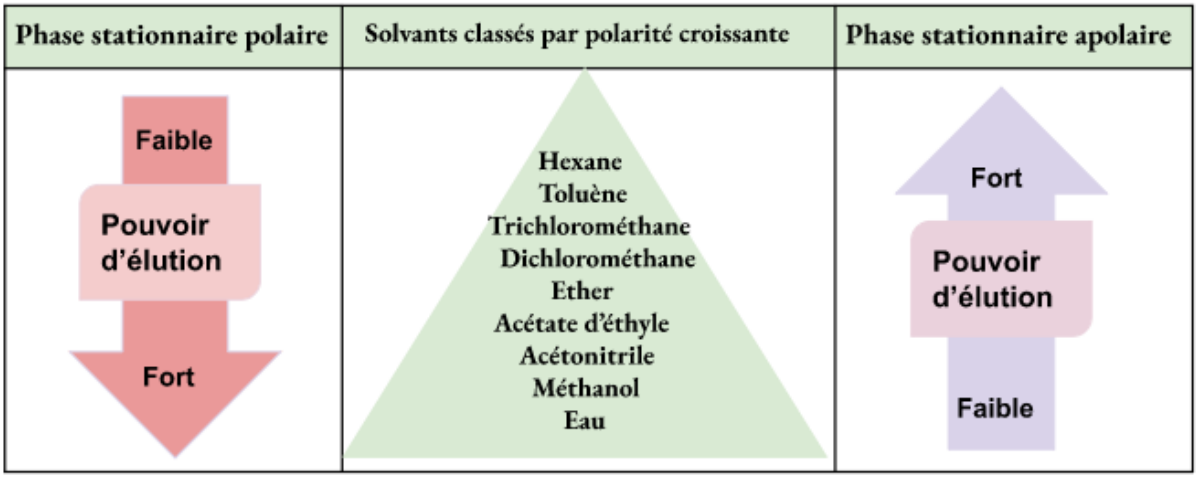


Figure 45 : pouvoir d'élution des solvants selon le type de chromatographie liquide et la polarité. [92]

La polarité d'un solvant est la résultante de trois interactions soluté/solvant à savoir les interactions de dispersion, les interactions dipôles-dipôles et les interactions hydrogène. [93] Selon l'intensité de ces forces, les molécules du soluté auront plus d'affinité pour l'une des phases.

De nombreux solvants sont disponibles, mais seuls quelques-uns pourront être utilisés car en chromatographie liquide il existe de nombreuses limitations [91] :

- Compatibilité avec le système de détection ;
- Miscibilité des solvants et solubilité des solutés ;
- Viscosité ;
- Toxicité ;
- Polarité ;
- Pouvoir élutif ;
- Pureté ;
- Température d'ébullition.

La pompe

Toute installation HPLC comporte au moins une pompe forçant le passage continu de la phase mobile à travers la colonne à un débit constant peu importe la pression, elle peut être équipée d'un dispositif de purge qui permet de chasser les bulles d'aire emprisonnées. Les pompes contrôlent la composition de la phase mobile au moyen d'un système de programmation qui permet de travailler selon l'un des modes suivants [92] :

- Élution isocratique : La composition de la phase mobile est maintenue constante durant toute la durée de l'analyse, si c'est un mélange, le pourcentage de chaque solvant du mélange reste inchangé au cours de l'élution. Il permet la séparation de solutés de polarités différentes ; [92]
- Gradient d'élution : La composition de la phase mobile évolue au cours du temps. Il permet la séparation de solutés de polarité similaire, et l'analyse des échantillons complexes. [90]

Il existe des systèmes de pompage qui délivrent le(s) solvant(s) à partir de plusieurs réservoirs, le mélange est réalisé dans une chambre de mélange située soit :

- En amont, on parle de système à gradient basse pression. Une seule pompe suffit alors à l'élution et celle-ci peut être quaternaire ;
- En aval, on parle de système à gradient haute pression. Les pompes sont appelées binaires, ternaires, suivant le nombre de solvants qu'elles peuvent mélanger. [88]

Actuellement les paramètres d'une pompe sont :

- Débit : 0,01 à 10 mL/min ;
- Stabilité < à 1% (< à 0,2 % pour des chromatographies d'exclusion diffusion) ;
- Pression maximale > 350 bars. [89]

En effet, elle doit être très puissante car la viscosité des solvants et la granulométrie très fine des phases stationnaires entraînent des différences de pression et donc des pertes de charges. [93]

On distingue :

- **Pompe à simple déplacement** : fonctionne comme une seringue, munie d'un piston qui se déplace grâce à une vis sans fin. Présente comme inconvénient un volume limité de solvant ;
- **Pompe à un piston** : la plus utilisée, le piston est entraîné par une excentrique, le ressort pousse ce piston en permanence dans le sens de remplissage de la pompe. Son volume est très grand, son fonctionnement nécessite deux phases ; aspiration et refoulement, la pression obtenue est élevée mais fluctuante (débit pulsé), ce type permet une régulation aisée du débit et facilite le gradient d'élution ; [94]
- **Des pompes à deux pistons** : fonctionnant en mode série ou en mode parallèle ont été conçues comme présentés dans le tableau (XXXVIII).

Tableau XXXVIII : Modes de fonctionnement des pompes à deux pistons. [91]

En mode série	En mode parallèle
Le premier piston refoule une quantité de solvant 2 fois plus importante que le piston en aval, soit parce que son diamètre est plus important soit parce que sa course est plus grande. Les deux pistons sont déphasés (l'un aspire, l'autre refoule). Ces montages nécessitent des vannes en amont et en aval de chaque piston.	Le système de pompage est constitué de deux têtes de pompe fonctionnant en opposition permettant d'obtenir un débit de phase liquide sans pulsations.

Une représentation visuelle de ces systèmes est schématisée dans la figure (46)

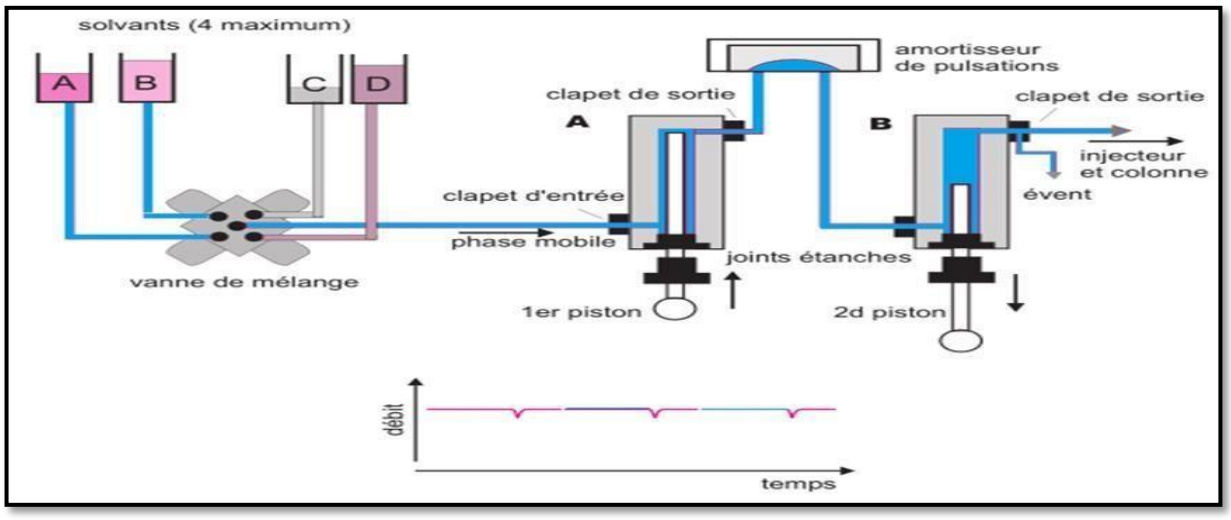


Figure 46 : Principe de fonctionnement d'une pompe à deux têtes en série. [95]

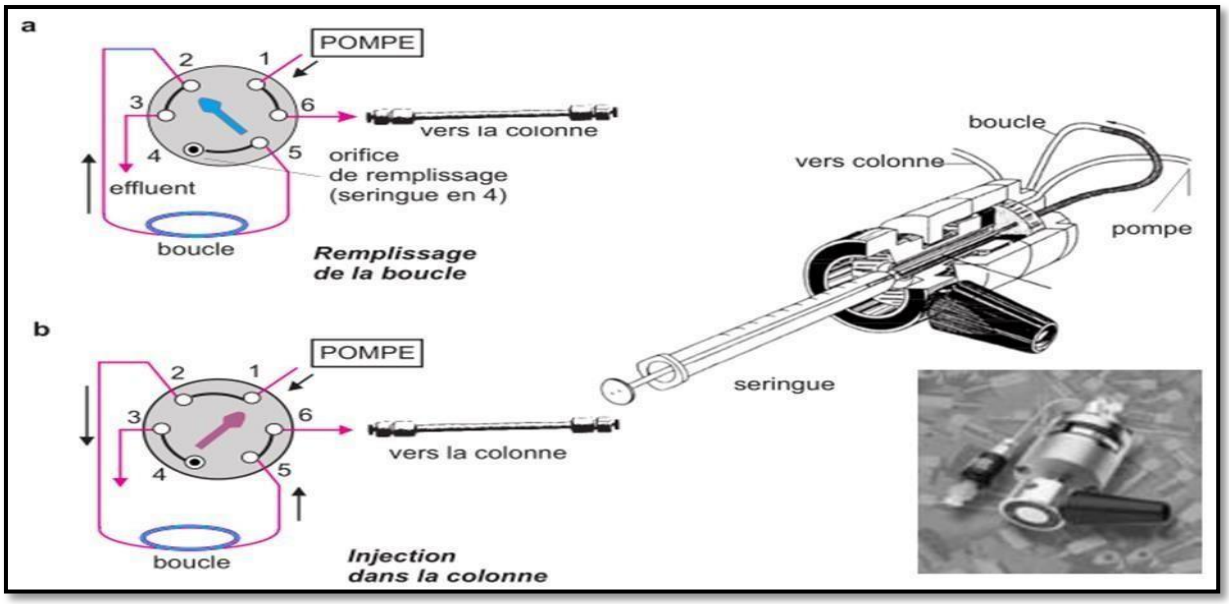
Injecteur

Permet de transférer l'échantillon vers la colonne avec un volume précis en un temps bref. Les injecteurs peuvent être à boucle fixe ou à volume variable, on utilise le plus souvent un injecteur muni d'une vanne haute pression à plusieurs voies avec une boucle d'injection de volume fixe. La vanne peut être manuelle ou automatique placée juste avant la colonne et permet d'introduire un volume fixe de l'échantillon sans variation de pression. Le système de boucle d'injection possède 2 positions :

Dans la position chargement ou load : où seule la communication entre pompe et colonne est assurée, l'échantillon est introduit à pression atmosphérique à l'aide d'une seringue dans la boucle. Celle-ci est soit extérieure, soit intégrée dans le corps de la vanne ;

Dans la position injection ou inject : à la différence de la position précédente, la boucle est reliée à la fois à la pompe et à la colonne. L'échantillon est inséré dans le flux de phase mobile par rotation de 60° d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle. [88]

Ces positions sont représentées dans la figure (47).



a) Remplissage de la boucle, dans cette étape la seringue est introduite à la position 4.
b) Injection dans la colonne (noter la nouvelle position de la manette).

Figure 47 : Injection avec une boucle. [95]

Colonne

La colonne est la pièce maîtresse de la chaîne HPLC, elle se présente sous forme d'un tube généralement court et droit souvent en acier inoxydable chimiquement inerte dont la longueur et le diamètre présentent des différences selon les modèles. La longueur de la colonne peut influer non seulement sur la résolution d'une séparation donnée (le nombre de plateaux est d'autant plus grand que la colonne est longue) mais aussi sur la vitesse de la séparation.
Souvent c'est ce dernier critère qui dicte le choix de la longueur de la colonne.
Les colonnes plus longues sont dites colonnes standards et les plus courtes colonnes rapides. [96]

La colonne est souvent précédée d'une pré colonne, dite colonne de garde, courte (0,4 à 1cm), remplie de la même phase stationnaire, elle permet de retenir certaines impuretés et d'augmenter la durée de vie de la colonne en préservant ses performances. Elle sera remplacée périodiquement. [88-91]

La figure (48) illustre une colonne standard et une pré-colonne d'HPLC.

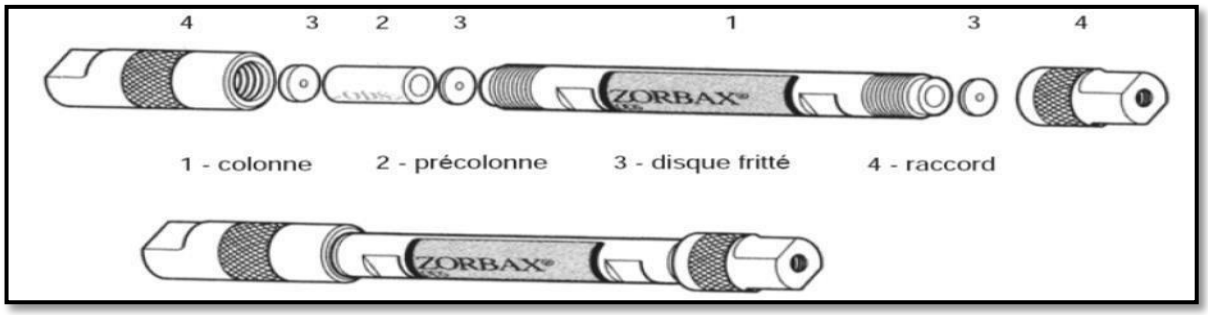


Figure 48 : Colonne standard et pré colonne d'HPLC. [88]

Phase stationnaire

La recherche d'une bonne résolution chromatographique et par voie de conséquence d'une efficacité élevée, a conduit à la création de phases stationnaires de nature et de structures variées telles que : la silice, l'alumine, graphite poreux, résines ou polymères à groupement acides ou basiques… On distingue principalement :

❖ Phase stationnaire normale à base de gel de silice

- C'est un solide amorphe ayant pour formule de composition $SIO_2(H_2O)$ n ;
- C'est un polymère inorganique réticulé ;
- Les groupements silanol (Si–OH) lui conférent un caractère acide polaire ;
- Le gel de silice comporte des pores de tailles différentes.

Le gel de silice est préparé sous deux formes :

- En micro particules sphériques, d'un diamètre constant allant de 1 à 12 µm, poreux dans la totalité de la particule ou juste en surface avec noyau non poreux ;
- En monolithes poreux, dans ce cas le gel de silice et formé d'une seule pièce dans la colonne. [88-91]

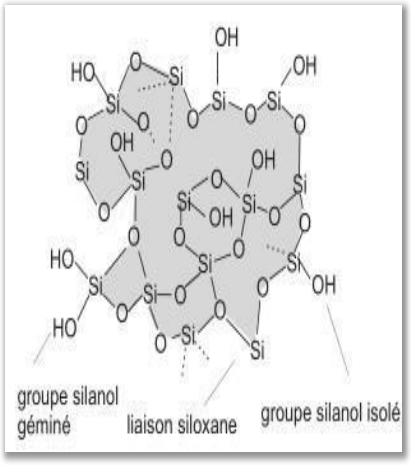


Figure 49 : Structure chimique du gel de silice. [95]

❖ Phase stationnaire inverse à base de gel de silice greffée

Le gel de silice est très hydrophile, ses caractéristiques évoluent au cours du temps, entraînant un manque de reproductibilité des séparations, il n'est donc pas très utilisé tel quel en chromatographie. Afin de le rendre hydrophobe, ce dernier subit des modifications qui consistent à greffer des molécules organiques (octyl, octadecyl, phényle…) à sa surface sur les groupements silanophiles par la réaction de silanisation. D'autres groupements fonctionnels peuvent être greffés (amines aliphatiques…) pour étendre la gamme de polarité des phases stationnaires. Ces supports chromatographiques sont stables thermiquement et difficilement hydrolysables dans le domaine de pH compris entre 2 et 7.

La colonne C18 est utilisée dans 80 % des analyses en chromatographie liquide de partage en phase inverse. [88] [91]

Deux types de chromatographie de partage se distinguent selon la nature du radical R greffé comme le présente la figure (50).

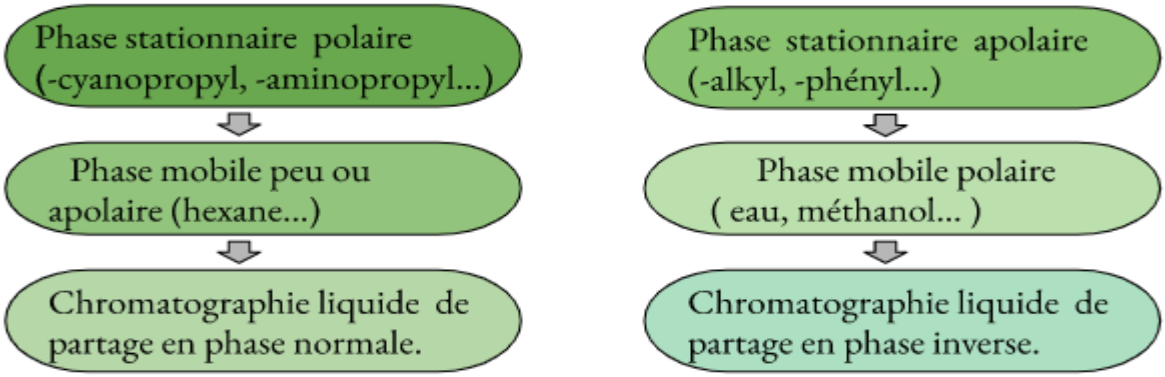


Figure 50 : Types de chromatographie en fonction de la polarité des phases. [88]

Le choix du mode de séparation se fait selon les propriétés de l'analyte à savoir sa polarité et sa solubilité, en règle générale le choix se fait comme montré dans la figure (51).

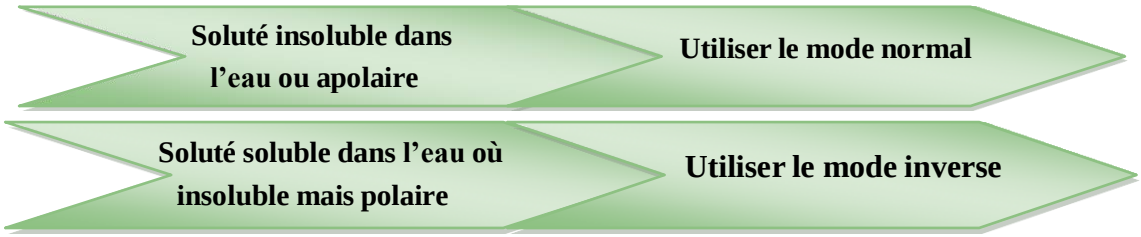


Figure 51 : Choix du mode de séparation selon les propriétés du soluté. [88]

Selon le principe de « Qui se ressemble s'assemble » :

- Si la phase stationnaire est polaire, les composés polaires seront plus retenus que les composés non polaires.
- Si la phase stationnaire est apolaire, les composés apolaires seront plus retenus que les composés polaires. La polarité est pratiquement utilisée comme une donnée comparative entre molécules. [89]

Détecteurs

À la sortie de la colonne chromatographique, les solutés sont en solution très diluée dans une phase éluante dont la nature et la composition varient d'une analyse à l'autre, de ce fait un détecteur est nécessaire puisqu'il permet de suivre en continu l'apparition des solutés en utilisant différents phénomènes physico-chimiques dont l'absorption, la fluorescence et la réfraction. Il fournit un signal enregistré en fonction du temps et permet la mesure des concentrations. [88]

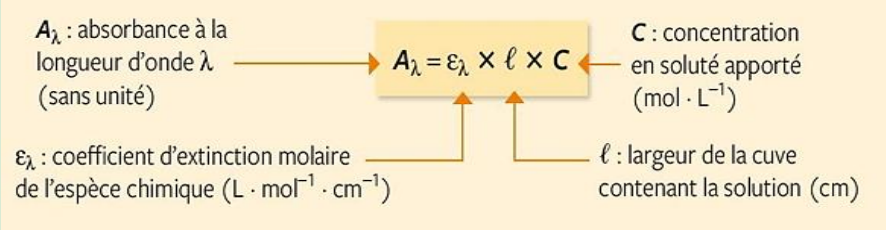
Un détecteur idéal doit répondre à certaines exigences :

- Sensibilité élevée, stabilité dans le temps, bonne reproductibilité ;
- Signal proportionnel à la concentration (linéarité) ;
- Faible temps de réponse ;
- Faible volume mort et faible bruit de fond. [97]

En HPLC, il n'existe pas de détecteur universel mais des détecteurs spécifiques de grande sensibilité, pour cette raison le choix d'un détecteur dépend à la fois des caractéristiques physiques des composés à séparer et des conditions opératoires. [88]

Le tableau (XXXIX) résume les principes d'action des détecteurs les plus couramment utilisées :

Tableau XXXIX : Types de détecteurs et leurs principes d'action.

Détecteur	Principe
Détecteurs d'absorption en UV-Visible **On distingue les spectrophotomètres :** **- Monochromatiques,** **- polychromatiques,** **- À barrette de diodes.**	L'absorbance de la phase mobile est mesurée en sortie de la colonne à une ou plusieurs longueurs d'onde dans l'UV ou le visible, l'éluant ne doit pas ou très peu absorber par lui-même. Le signal donné par ces détecteurs est proportionnel à la concentration du soluté dans l'effluent de la colonne chromatographique. En effet, l'absorbance A est liée à la concentration par la relation de Beer Lambert : [88] 
Réfractomètre différentiel	Mesure en continu la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et l'effluent de la colonne à travers laquelle passe un faisceau mono ou polychromatique. Le signal obtenu correspond à la mesure en continu de la rétroaction qu'il faut fournir à un élément optique pour compenser la déviation du faisceau réfléchi.[88]
Détecteur de fluorescence	Très sensible et sélectif pour les solutés fluorescents naturellement ou après dérivatisation. Absorbent dans l'UV et émettent une fraction de la lumière absorbée à une longueur d'onde supérieure. L'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la concentration de la substance, aux faibles valeurs de celle-ci.[91]
Détecteur électrochimique	Très sensible et spécifique à l'analyte. Leur fonctionnement est basé sur l'ampérométrie, la polarographie, la colométrie et la mesure de conductivité en estimant le courant associé à l'oxydation ou à la réduction de ses solutés une fois élués de la colonne.[88-94]

Conductimètre	Détecteur électrochimique universel non spécifique limité à la détection des espèces ionisées. Le principe repose sur la mesure, en sortie de colonne, de la conductance de la phase mobile riche en composé ionique. [91]
Autres détecteurs et différents types de couplages.	- Détecteurs de radioactivité. - Couplage HPLC/MS est en plein essor surtout grâce à la miniaturisation et devient un outil puissant d'identification et de détection. - Couplage avec la RMN (CLHP/RMN^{1}H) facilite l'étude des mélanges de composés inconnus. [88]

Intégrateur

Les variations en fonction du temps, du signal électrique transmis par le détecteur, sont traduites sous forme d'un chromatogramme, présenté en temps réel ou en différé, à partir des données mémorisées dans un micro-ordinateur. Le chromatogramme est obtenu avec un enregistreur graphique ou un enregistreur-intégrateur, l'intégration consiste à mesurer la surface sous un pic. La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de deux paramètres :

-La largeur attendue des pics.

-Le seuil d'intégration (sensibilité). [89]

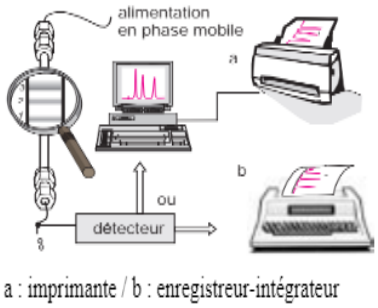


Figure 52 : Principe de l'analyse par chromatographie.

Applications de HPLC

L'HPLC est une méthode qualifiée de douce avec les molécules. En effet, ses domaines d'application sont extrêmement nombreux, elle est particulièrement utilisée pour la séparation-purification, l'analyse qualitative, l'analyse quantitative et l'étude de stabilité soit des matériaux de masse moléculaire élevée, des substances thermiquement instables ou non volatiles, soit encore des substances ionisées et ce, aussi bien dans les services de recherche et développement que dans le domaine du contrôle [88] [98]. Son champ d'activité couvre les organismes d'état et les industries de la chimie, biochimie, pharmacie et parachimie (agrochimie, cosmétiques, parfums, caoutchoucs, polymères, matériaux composites, fermentations) et même la médecine (humaine et vétérinaire), la génétique, la toxicologie, la pharmacognosie, l'environnement, le droit et la justice (police scientifique, douanes, répression des fraudes) [99]. La grande importance de l'HPLC provient de sa vitesse d'exécution, de son grand pouvoir de résolution et de son aptitude à analyser de manière qualitative et quantitative de faibles quantités d'échantillon.

Etudes théoriques de la chromatographie

Depuis un demi-siècle, différentes théories visant à modéliser la chromatographie ont été et continuent à être proposées [88]. Elles peuvent être classées en théories thermodynamiques, qui traitent les temps ou les volumes de rétention, et en théories cinétiques, qui s'attachent au processus de transfert de matière [100]. Les plus connues sont :

- Le modèle des plateaux
- La théorie cinétique

La théorie des plateaux

C'est le modèle le plus ancien, il a été élaboré par MARTIN et SYNGE pour interpréter la chromatographie de partage liquide-liquide à partir de celui conçu par GRAIG pour l'étude de la séparation à contre-courant en assimilant la colonne de chromatographie à celle de distillation.

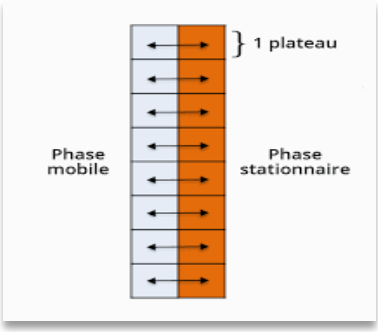
Principe

Dans le modèle statique de Craig, la colonne de longueur L est assimilée à un empilement de N petits disques (plateaux) fictifs de même hauteur H, numérotés de 1 à n, ainsi le soluté progressera d'un disque à chaque nouvel équilibre.

Le processus fait intervenir dans chaque disque au moins trois situations : soluté/phase mobile, soluté/phase stationnaire et phase mobile/phase stationnaire, chacune correspond à un cycle d'adsorption/désorption. [88]

On considère que dans chacun de ces plateaux se trouve :

- Le même volume de phase mobile ;
- Le même volume de phase stationnaire ;
- Des échanges horizontaux de matière entre les deux phases jusqu'à équilibre entre la concentration du soluté dans la phase mobile et celle dans la phase stationnaire. [88]



Théorie cinétique

Différents modèles ont été élaborés, deux sont retenus :

- Modèle de VAN DEEMTER
- Modèle de KNOX

➢ Théorie de VAN DEEMTER

Dans cette théorie, Van Deemter explique la forme des pics dans une description mathématique reliant la hauteur équivalente à un plateau théorique H à la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile en fonction de 3 coefficients numériques A, B et C à travers lequels différents phénomènes aléatoires responsables de l'étalement des pics sont caractérisés. Cette vitesse influence la progression et la dispersion des analytes dans la colonne de sorte qu'elle

conditionne la qualité de l'analyse. [88]

L'hyperbole de Van Deemter montre la variation de HEPT en fonction de (u), elle est représentée dans la figure (53).

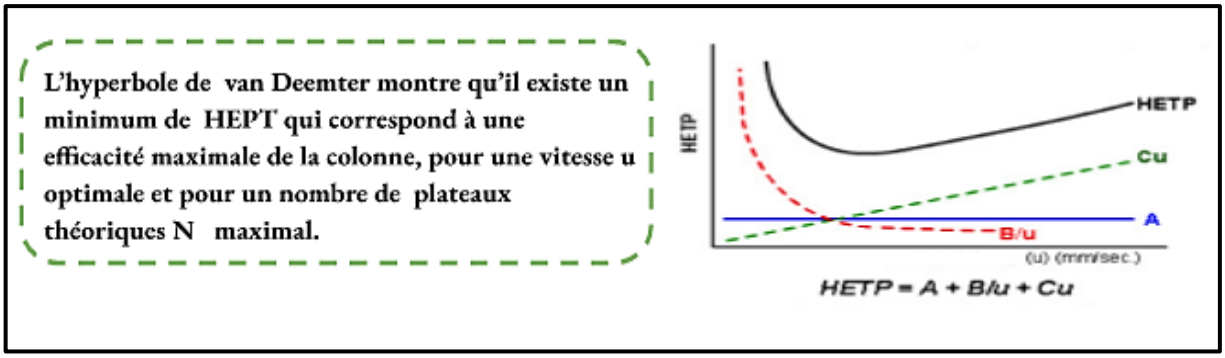


Figure 53 : Hyperbole de Van Deemter. [101]

Avec :

Terme A	Caractérise **la diffusion turbulente,** provient de la diversité des parcours pouvant être suivit par les molécules d'un même soluté à travers les espaces inter-particulaires de la colonne. Ainsi A est proportionnel aux diamètres des particules et au facteur géométrique de remplissage de la colonne, par conséquent, plus les particules sont petites plus le remplissage est homogène, plus A sera petit et plus l'efficacité de la colonne augmente. [88] [102]
Terme B	Définit la **diffusion longitudinale**, désignant la dispersion moléculaire du soluté représentée par la loi de Fick. Elle résulte de la tendance du soluté à se déplacer dans une direction parallèle à l'axe de la colonne d'une région concentré vers d'autres plus diluées en amont et en aval. En pratique, il est négligeable en HPLC. [100] [102]
Terme C	Représente **la résistance aux transferts de masse** du soluté entre les deux phases ce qui empêche l'établissement de l'équilibre entre le soluté et celles-ci. Ce phénomène est causé par la stagnation de certaines molécules dans la phase stationnaire (PS). [102]

- **Modèle de KNOX**

Ce modèle relie la hauteur de plateau théorique réduite (h), représentative de l'efficacité de la colonne et la vitesse linéaire réduite (v), représentative du débit dans la colonne en fonction des trois paramètres A B C représentatifs des phénomènes de dispersion intra-colonne via l'équation empirique de KNOX. [103]

$$h = B/v + A v^{\frac{1}{3}} + C\,v$$

Analyse d'un chromatogramme

Un chromatogramme est une courbe bidimensionnelle qui représente la variation au cours du

temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de la colonne. Le temps est porté en abscisse et l'intensité du signal de détection en ordonnée. Ainsi, sur le chromatogramme, les composés élués de la colonne seront représentés sous forme de pics. La ligne de base correspond au tracé obtenu en absence de ces derniers [88].

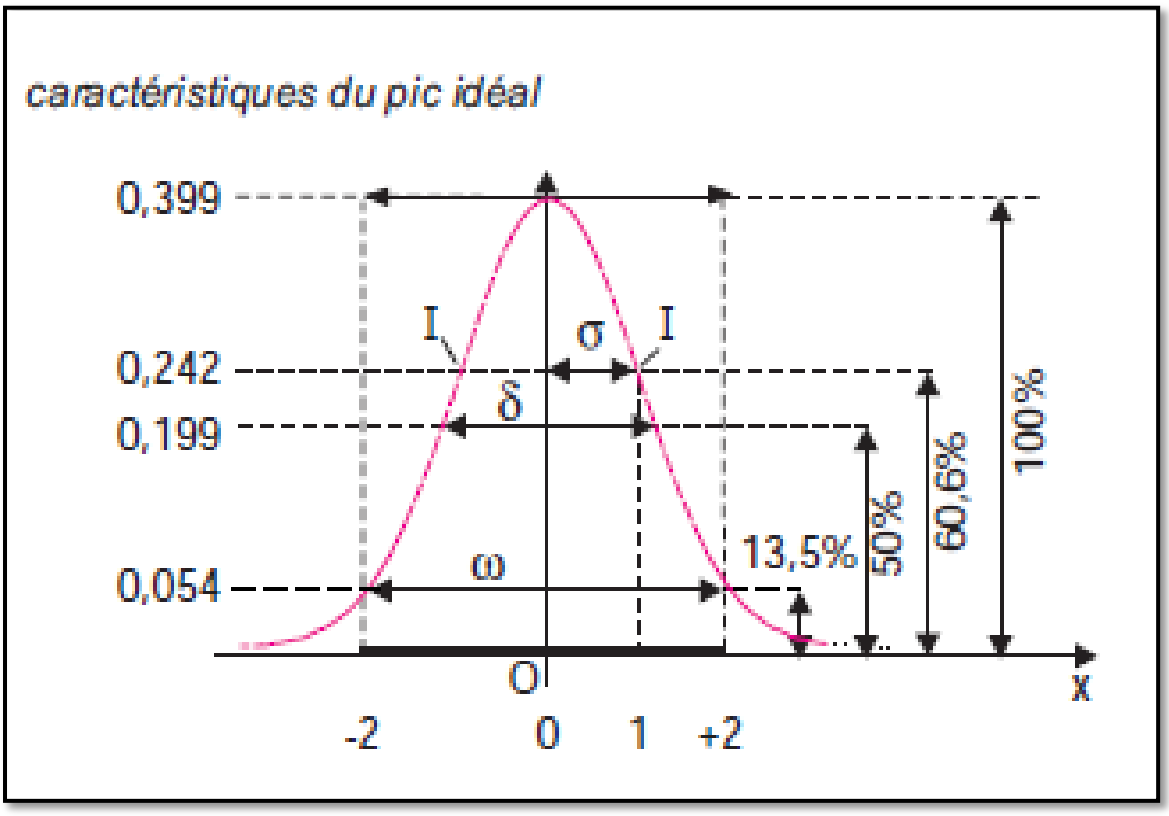
Un pic d'élution idéal présente une allure gaussienne telle que la représentation graphique de la loi Normale et se caractérise par les paramètres montrés dans la figure (54).

ω : La largeur du pic à la base, mesurée à 13.5% de la hauteur du pic ($\omega = 4\sigma = 1{,}7\delta$).

δ Ou $\omega^{\frac{1}{2}}$: La largeur à mi-hauteur du pic, mesurée à 50% de sa hauteur ($\delta = 2{,}35\sigma$).

2σ : La largeur du pic à 60,6% de sa hauteur.

v : Variance du pic, avec $v = \sigma^2$.



σ : L'écart-type (exprimé en cm). Il correspond à ½ de la largeur du pic aux points d'inflexion, c'est-à-dire à 60,6% de sa hauteur totale.

S : Surface de la Courbe ou l'aire du pic A.

h : Hauteur du pic.

RSD : Relative Standard Déviation %RSD =100 σ/A'. (A' : moyenne des aires de pic).

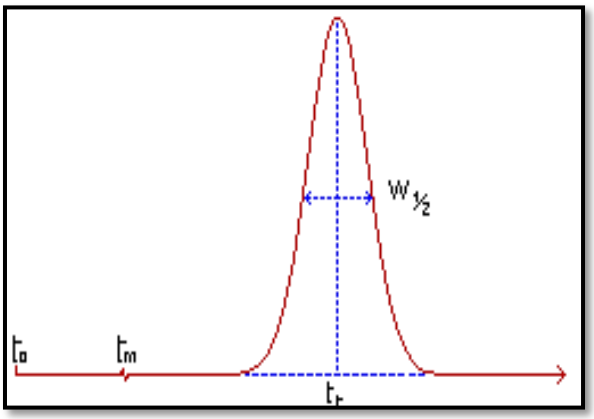
Figure 54 : Caractéristiques du pic idéal. [88]

Grandeurs de rétention

- **Notion de temps**

t_r : temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié, autrement dit c'est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne, ou encore, le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort de la colonne. Il varie en fonction du débit, de la température d'élution, de la composition de la phase mobile et du vieillissement de la colonne. [88] [103]

t_m : temps mort, c'est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile). [89]



t_r' : temps réduit ou corrigé, c'est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire. [89]

Il est donné par la formule suivante :

$t_r' = t_r - t_m$.

t_0 : temps du début d'injection. [89]

Figure 55 : Notions de temps dans un pic chromatographique.

- **Notion de concentration**

Le coefficient de partage K, d'adsorption ou de distribution

À un instant donné, le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et C_s dans la phase stationnaire. Leur rapport à l'équilibre est appelé coefficient de partage K qui est un paramètre physico chimique de base caractéristique de la distribution de chaque soluté entre les deux phases. En effet, plus K est grand, plus le composé est fortement retenu dans la phase stationnaire et inversement [88] [89]. Ce coefficient dépend de :

- La structure du composé qui détermine son affinité pour chacune des phases ;
- La nature des deux phases ;
- La température qui affecte les pressions de vapeur et les solubilités.

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

Le facteur de rétention ou de capacité K'

Quand un composé de masse totale m_T est introduit dans la colonne, il se répartit en deux quantités : m_M dans la phase mobile et m_S dans la phase stationnaire. Si on ne change pas les conditions opératoires, ces deux quantités demeurent constantes au cours de sa migration dans la colonne. Leur rapport, appelé facteur de rétention, est indépendant de m_T. [88]

$$K' = \frac{m_S}{m_M} \qquad K' = \frac{C_S \times V_S}{C_m \times V_m} = K \times \frac{V_S}{V_m}$$

K' est aussi le rapport du temps passé par un soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile.

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Ce facteur dépend de la nature du soluté, de la PS, de la PM et de la température. Selon les valeurs de K', on peut voir si l'élution est bonne ou pas. [89]

L'élution est idéale pour un K'= 5, pour :

- K' < 1 : l'élution est rapide, difficile à étudier ;
- 2 < K' < 10 : l'élution est optimale ;
- K' > 10 : l'élution est trop longue. [93] [104]

- **Notion de volume**

V_r : volume de rétention ou d'élution d'un soluté, représente le volume de la phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne. Il correspond sur le chromatogramme au volume de la PM qui s'est écoulé entre le temps d'injection et celui correspondant au maximum du pic. Si le débit D de la phase mobile est stationnaire : $V_r = t_r$ x D. [88]

V_m : volume mort, il correspond au volume interstitiel accessible de la phase mobile. Il ne dépend que de la géométrie et du remplissage de la colonne et peut être exprimé par la formule : $V_m = t_m$ x D. [88]

V_r' : volume de rétention réduit, corrigé ou relatif. Il est calculé en retranchant du volume interne de la colonne vide le volume de la phase mobile : $V_r' = V_r - V_m$. [88]

L'efficacité de la colonne

L'efficacité de la colonne se traduit par la finesse des pics obtenus pour les composés élués. Plus le pic est fin, plus la colonne est efficace, ainsi, la largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité qui est exprimée par deux grandeurs Nth et HEPT. [89]

❖ **Détermination du nombre de plateaux théoriques Nth**

C'est le nombre d'équilibres successifs qu'a subi un composant du mélange. Il est propre à chaque système chromatographique (colonne, solvants, composé à séparés). Plus le pic est fin, plus Nth est grand et donc plus la colonne est efficace.

$$\mathrm{Nth} = 16\left(\frac{t_r}{\omega}\right)^2 = 5{,}54\left(\frac{t_r}{\delta}\right)^2$$

Pour comparer les performances de colonnes de conceptions différentes, vis-à-vis d'un même soluté, il serait plus judicieux d'utiliser le nombre de plateaux théoriques effectifs (Neff) dit aussi nombre de plateaux efficaces N', puisqu'il dépend vraiment du temps passé dans la phase stationnaire sans tenir compte du temps mort. [88]

$$Neff = 16\frac{tr'^2}{\omega^2} = 5{,}54\frac{tr'^2}{\delta^2}$$

- **Détermination de la hauteur équivalente en plateaux théoriques HEPT ou H**

Il permet de comparer des colonnes de différentes longueurs, la colonne est d'autant plus efficace que la HEPT est petite. Sa valeur est relative au composé choisi et aux conditions opératoires.

$$HEPT = \frac{L}{Nth}$$ Avec L : la longueur de la colonne.

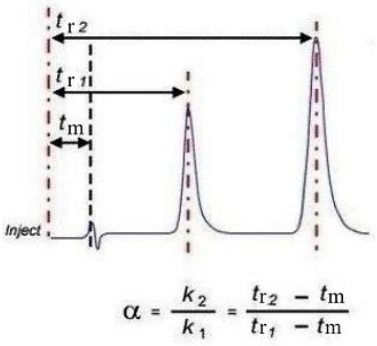
On définit également la hauteur de plateau effectif (Heff) qui fait intervenir l'efficacité réelle à la place de l'efficacité théorique [88] :

$$\mathrm{Heff} = \frac{L}{N\,eff}$$

Qualité de séparation

- **Sélectivité**

Il est dit aussi facteur de séparation, il permet de préciser les positions relatives de 2 pics adjacents sur un chromatogramme. Il ne peut être inférieur à 1 et il est égal par définition au rapport de temps de rétention corrigé de l'espèce la plus retenue, au rapport de temps de rétention corrigé de l'espèce la plus rapidement éluée.
Pour des pics non adjacents, on définit le facteur de rétention relative « r », qui est calculé de lamême façon que alpha, et qui aussi ne peut être inférieur à 1. [88]



- **Facteur de résolution R**

La résolution correspond à une grandeur numérique qui quantifie la qualité de la séparation du système chromatographique en caractérisant la présence ou l'absence de chevauchement de 2

pics contigus [89]. Elle est calculée par la formule suivante :

$$R = 2\frac{(t_{r2}-t_{r1})}{(\omega_1+\omega_2)}$$

Une séparation de qualité est un compromis entre une résolution suffisante des pics et un temps de séparation raisonnable, cette séparation est d'autant meilleure que Rs est plus grande.

- Rs ≤ 0,8 : séparation insuffisante ;
- Rs < 1 : chevauchement des pics ;
- Rs = 1 : 2% de chevauchement des pics ;
- Rs ≥ 1,5 : bonne séparation ;
- Rs = 1,8 à 2 : valeur souhaitable pour une meilleure robustesse de la méthode. [102]

Lorsque $\omega\mathbf{1} = \omega\mathbf{2}$, seuls les paramètres relatifs au produit le plus retenu sont pris en considération. [88]

$$R_s = \underbrace{\frac{1}{4}\sqrt{N}}_{\text{Efficacité}} \cdot \underbrace{\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)}_{\text{Sélectivité}} \cdot \underbrace{\left(\frac{k}{1+k}\right)}_{\text{Rétention}}$$

La formule de Purnell établit donc l'influence de l'efficacité, du facteur de capacité et de la sélectivité sur la résolution.

La pression

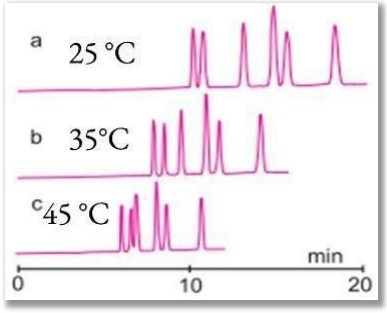
La phase mobile frotte sur les parois de la colonne mais aussi sur les particules de phase stationnaire. Ces frottements définissent la résistance à l'écoulement de la colonne.
Les particules de phase stationnaire sont sphériques. Si on diminue leur surface et leur volume, on peut placer dans la colonne 1000 fois plus de particules et donc augmenter la surface en contact avec la phase mobile. La résistance à l'écoulement est donc augmentée.

En conséquence, pour maintenir le débit constant dans la colonne il faut augmenter la pression et réduire la granulométrie de la phase stationnaire. [89]

La température

Les appareils actuels permettent de thermostater la colonne et l'éluant, à la fois pour assurer la répétitivité des analyses en maintenant la température constante et pour faire intervenir éventuellement cette dernière comme paramètre de séparation [86]. La plupart des séparations sont effectuées à température ambiante, mais il est possible de chauffer les colonnes pour obtenir une efficacité supérieure.

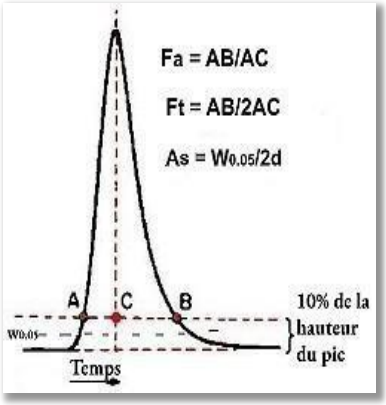
Il est toutefois recommandé de ne pas dépasser 60°C, sous peine de dégradation de la phase stationnaire ou d'altération de la composition de la phase mobile. [105]



Les écarts de température modifient les temps de rétention et la sélectivité. En effet, une élévation réduit la viscosité de la phase mobile et les temps de rétention et par conséquent le coefficient de distribution.

Symétrie des pics

Dans des conditions thermodynamiques optimales les pics sont d'allure gaussienne, cependant, les chromatogrammes peuvent parfois présenter des pics asymétriques. Ce comportement non idéal peut être la conséquence de :



L'irrégularité de concentration dans la zone de dépôt de la substance en tête de la colonne, de l'inégalité de la vitesse de la phase mobile dans la colonne qui est nulle au niveau de la paroi et maximale au centre, de la saturation de la colonne, ou encore une rétention importante du soluté par la phase stationnaire. [88]

Cette dissymétrie est exprimée par des paramètres dont le facteur d'asymétrie (F_a) et le facteur de traînée (F_t), mesurés à 10 % de la hauteur du pic, ou encore par le facteur de symétrie (As) mesuré au vingtième de la hauteur du pic. [105]

Analyse qualitative et quantitative par chromatographie

Analyse quantitative

Pour chaque pic chromatographique existe une relation linéaire entre son aire et la quantité du composé du mélange et donc de sa concentration qui est proportionnelle à l'aire du pic correspondant (A_i). [102]

$$m_i = K_i \cdot A_i$$

Ki : facteur de proportionnalité ou coefficient de réponse

- **Méthode d'étalonnage externe**

Elle consiste à faire éluer successivement et dans les mêmes conditions chromatographiques un volume V de l'étalon de concentration bien connue $C_{réf}$ et un même volume de l'échantillon contenant la substance à doser de concentration inconnue $C_{éch}$, puis à comparer les chromatogrammes résultants dont les aires sont respectivement $A_{réf}$ et $A_{éch}$. Puisque les volumes injectés sont égaux, il y a une proportionnalité entre les aires, qui dépendent des masses injectées, et les concentrations correspondantes ($m_i = C_i \cdot V$). [88]

$$C_{éch} = C_{réf}\ A_{éch} / A_{réf}$$

- **Méthode d'étalonnage interne**

Cette méthode permet de s'affranchir de l'imprécision concernant les volumes injectés, et ce en utilisant le coefficient de réponse relatif de chaque composé à doser vis-à-vis d'une substance introduite comme référence appelée étalon interne. Elle consiste à ajouter à la solution de

référence et à la solution à doser un même constituant (étalon interne) en quantité connue, qui n'interfère avec aucune des substances présentes dans l'échantillon. On obtient alors deux chromatogrammes : un chromatogramme d'étalonnage qui servira à déterminer les coefficients de réponse relatifs et un chromatogramme pour l'analyse de l'échantillon.

La précision de la méthode est améliorée en injectant une série de solutions étalons (substance étalon x + EI) et la solution à doser (substance x + EI). La seconde étape est l'établissement d'un graphique du rapport des aires (A_x/A_{EI}) en fonction du rapport de concentration (C_x/C_{EI}) correspondant à une droite d'étalonnage qui passe par l'origine, et par extrapolation on déduit la concentration C_x de la solution à doser. [88]

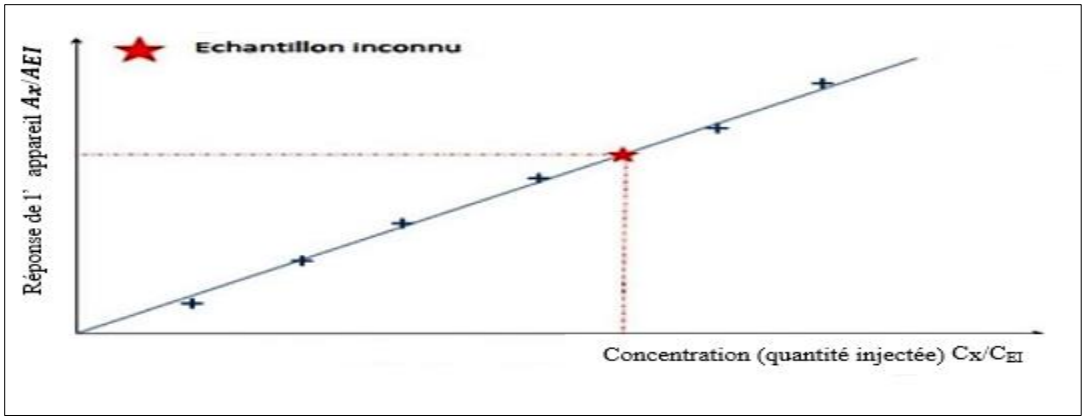


Figure 56 : Droite d'étalonnage (A_x/A_{EI}) = f(C_x/C_{EI}) [88]

❖ **Méthode des ajouts dosés**

Il s'agit d'une méthode adaptée au dosage de traces d'un soluté dans un échantillon. Elle consiste à ajouter à l'échantillon à analyser des quantité croissante et connues de l'étalon de la substance à doser appelées ajouts dosés. Le résultat obtenu est l'accroissement de l'aire du pic à analyser uniquement. [106]

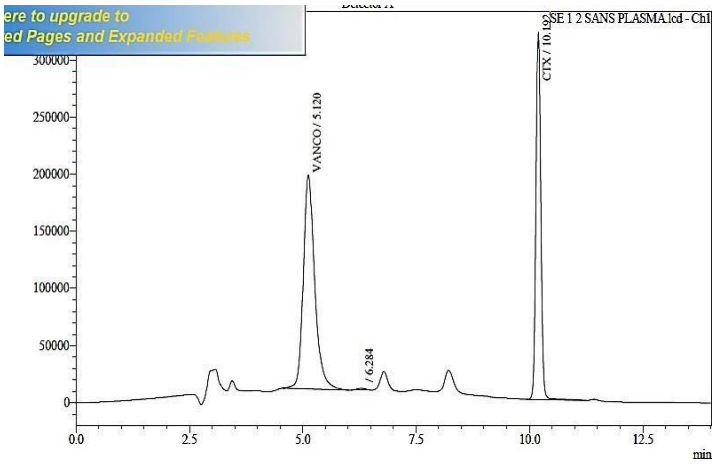
Analyse qualitative

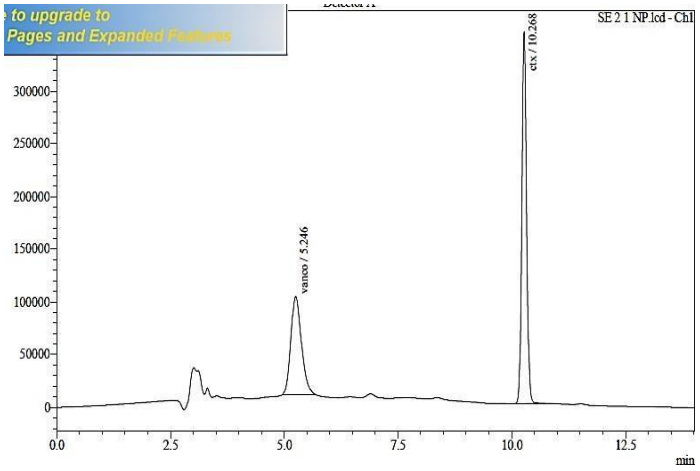
Les méthodes chromatographiques, permettent d'identifier et de tester la pureté des composés, également l'analyse quantitative ne peut être bonne si l'identification des pics n'a pas été réalisée en amont. L'identification en HPLC est une méthode comparative des grandeurs de rétention de la substance concernée. Or, le temps de rétention reste la grandeur principale la plus communément utilisée pour l'identification. Dans des conditions expérimentales identiques et avec le même appareillage cette dernière est fondée sur la comparaison du temps de rétention de la substance à celui de son étalon (témoin), l'égalité des tr oriente vers la même substance. Toutefois, cette identification à partir du chromatogramme est quelque fois aléatoire, et limitée par le nombre de paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés pour assurer une bonne reproductibilité. Une association de deux techniques complémentaires : un chromatographe et un spectromètre de masse, un spectromètre infrarouge, ou encore un spectromètre RMN donne deux types d'informations indépendantes (temps de migration et spectre) et permet ainsi de déterminer avec certitude la composition de mélanges complexes. [88]

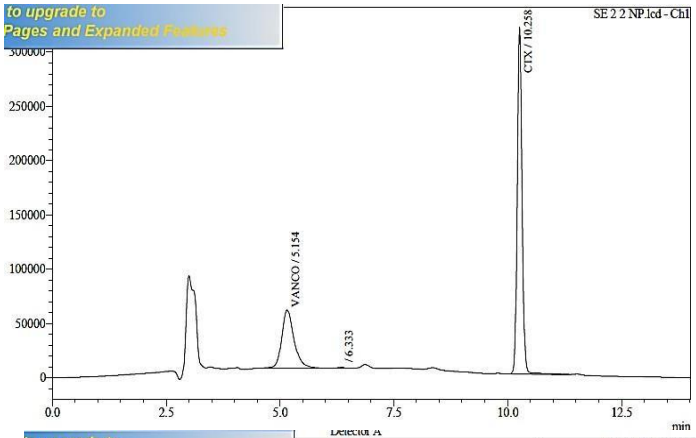
ANNEXE III
DONNEES BRUTES DE LA VALIDATION ANALYTIQUE

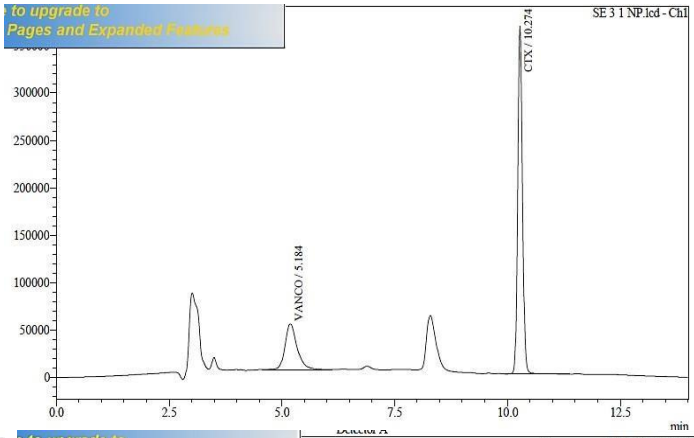
ANNEXE III : DONNEES BRUTES DE LA VALIDATION ANALYTIQUE

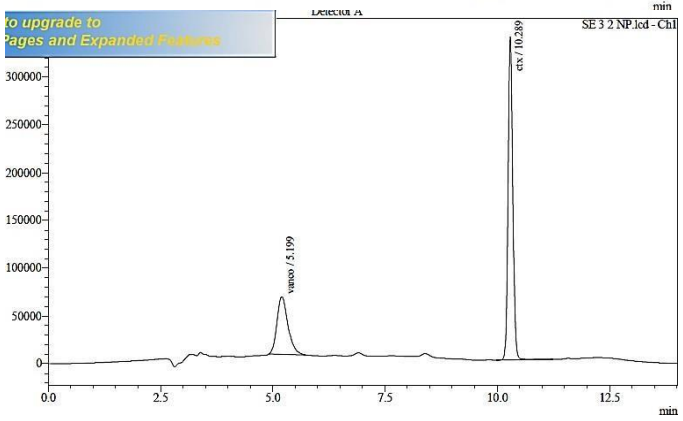
- **Série 1 :**

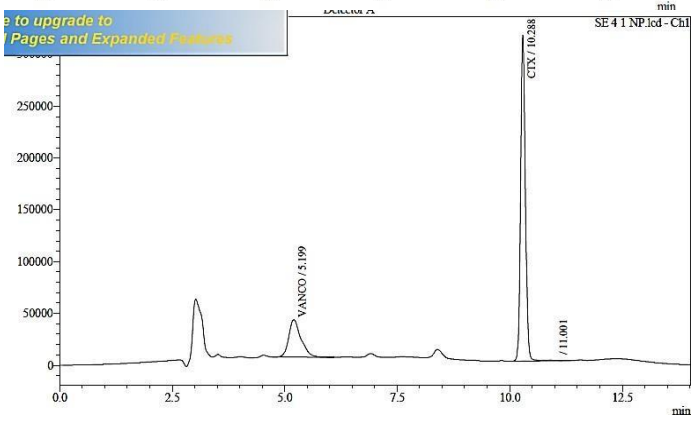


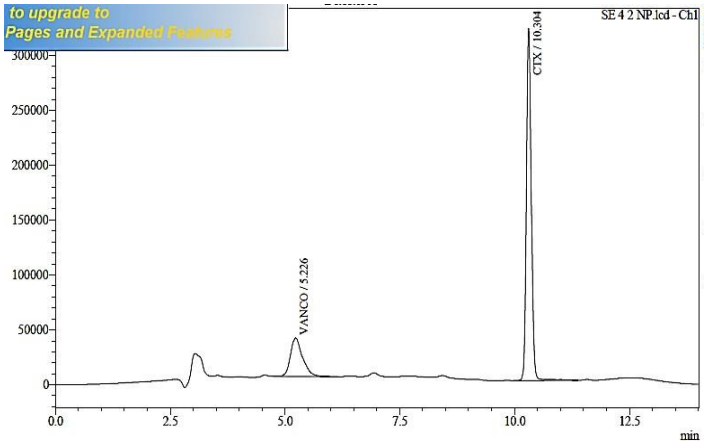


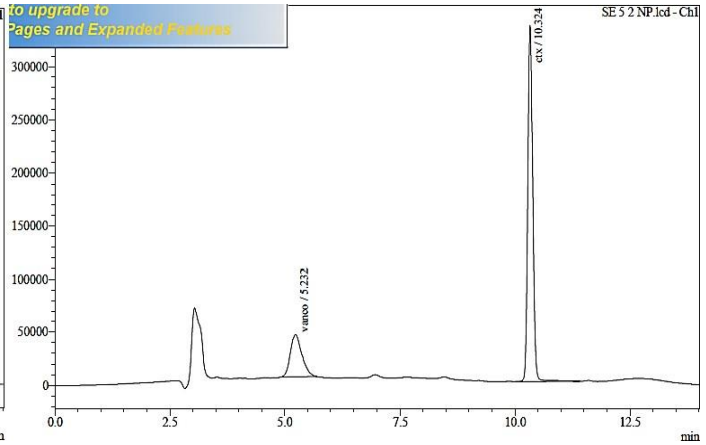


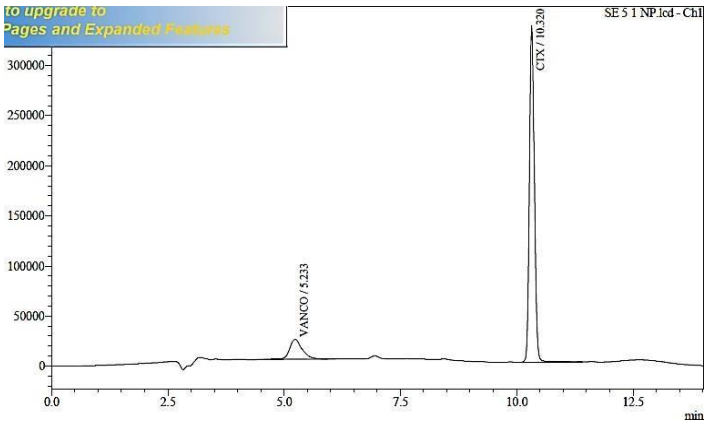


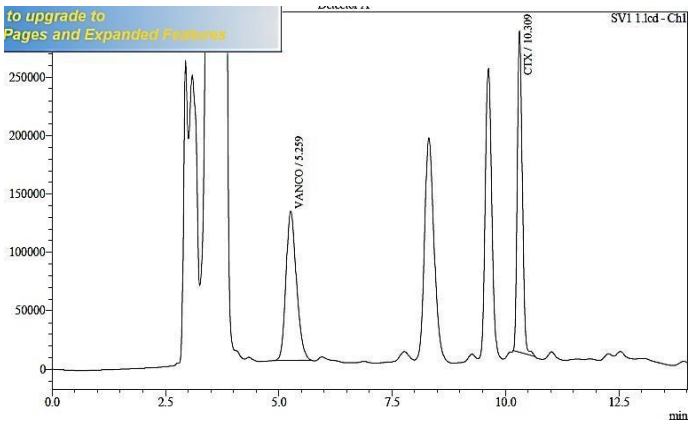


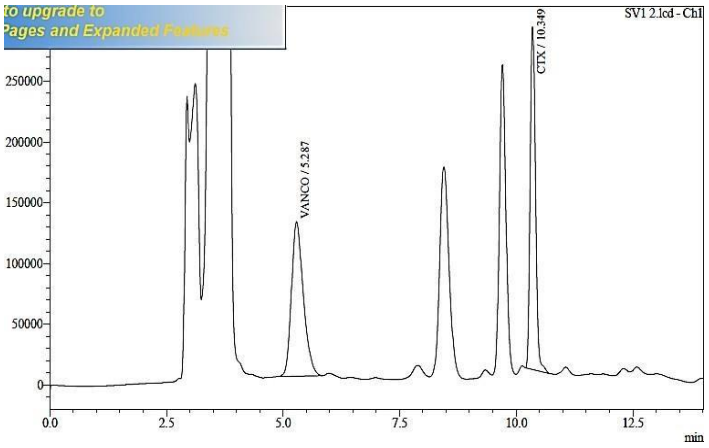


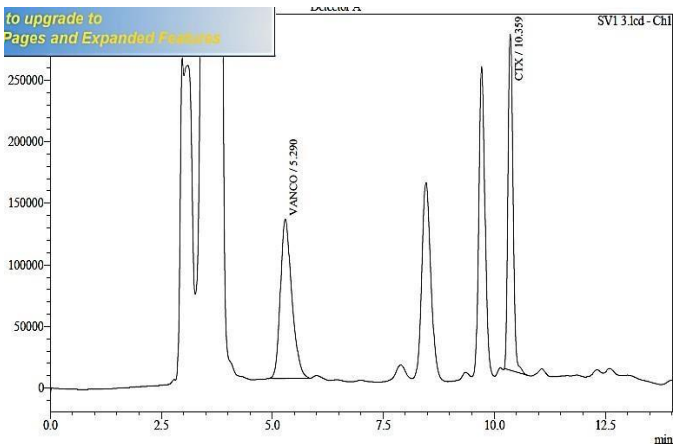


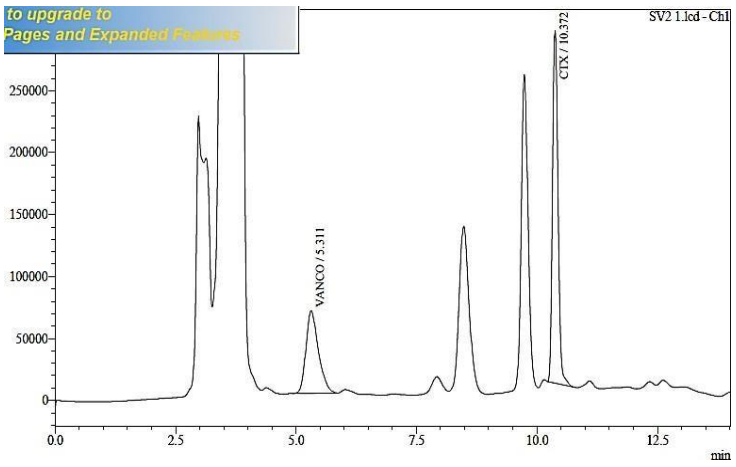


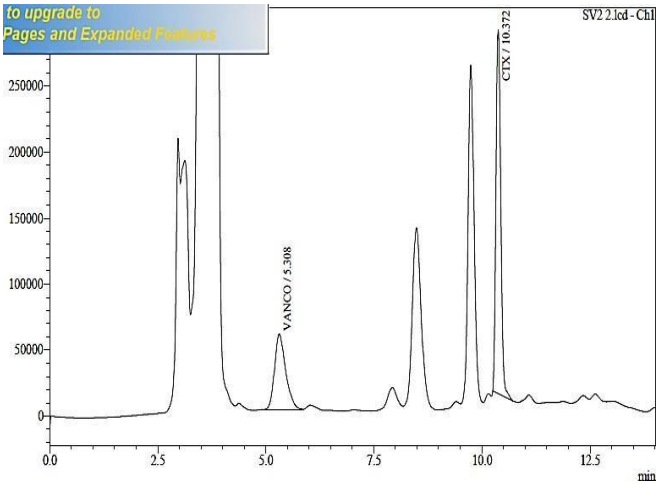

to upgrade to
Pages and Expanded Features
SE 5 1 NP.lcd - Ch1
VANCO / 5.233
CTX / 10.320
min

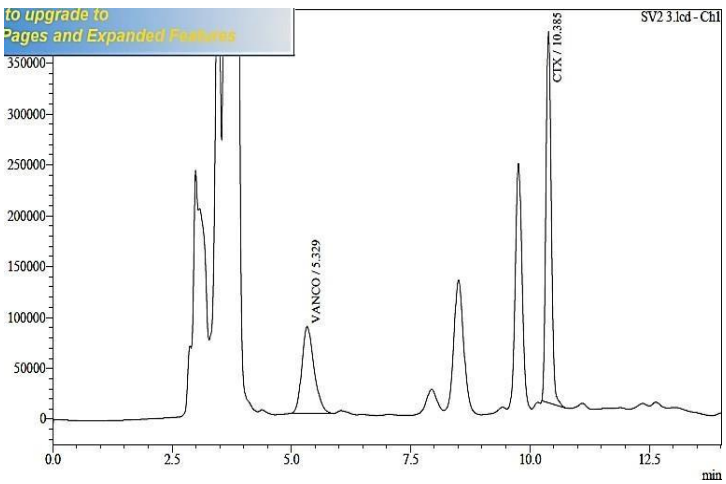

to upgrade to
Pages and Expanded Features
SV1 1.lcd - Ch1
VANCO / 5.259
CTX / 10.389
min

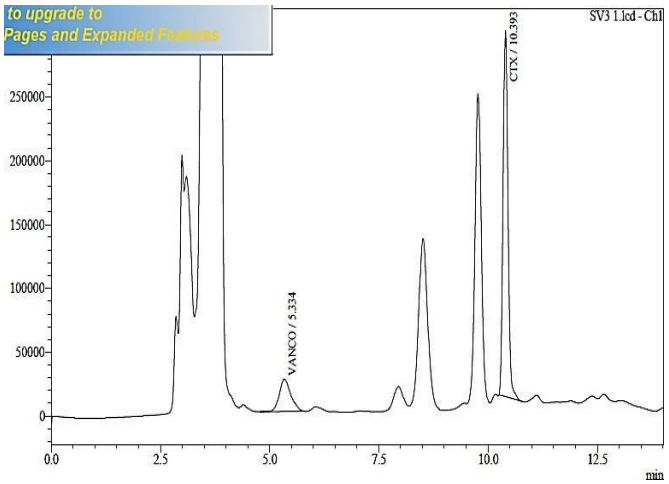

to upgrade to
Pages and Expanded Features
SV1 2.lcd - Ch1
VANCO / 5.287
CTX / 10.349
min

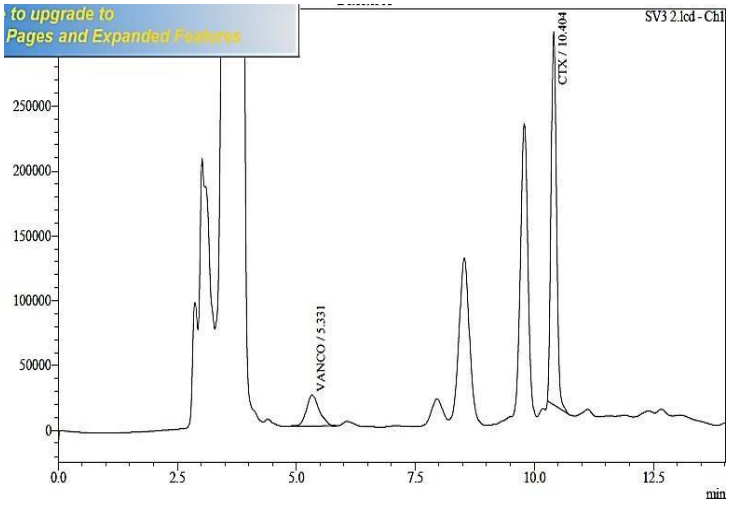

to upgrade to
Pages and Expanded Features
SV1 3.lcd - Ch1
VANCO / 5.290
CTX / 10.359
min

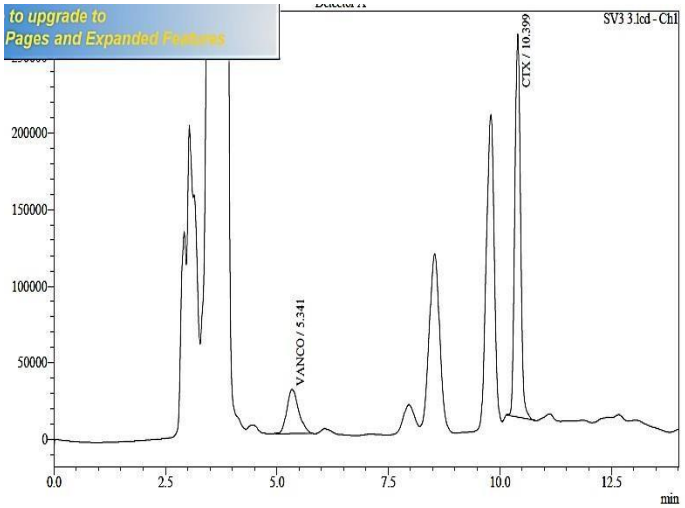

to upgrade to
Pages and Expanded Features
SV2 1.lcd - Ch1
VANCO / 5.311
CTX / 10.372
min

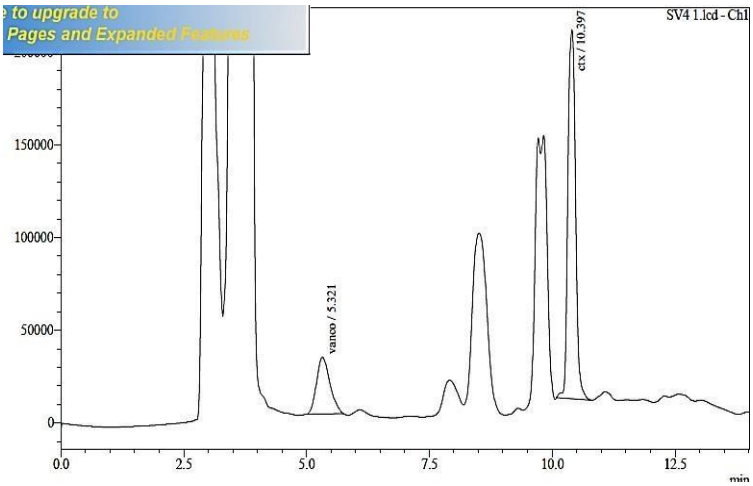

to upgrade to
Pages and Expanded Features
SV2 2.lcd - Ch1
VANCO / 5.308
CTX / 10.372
min

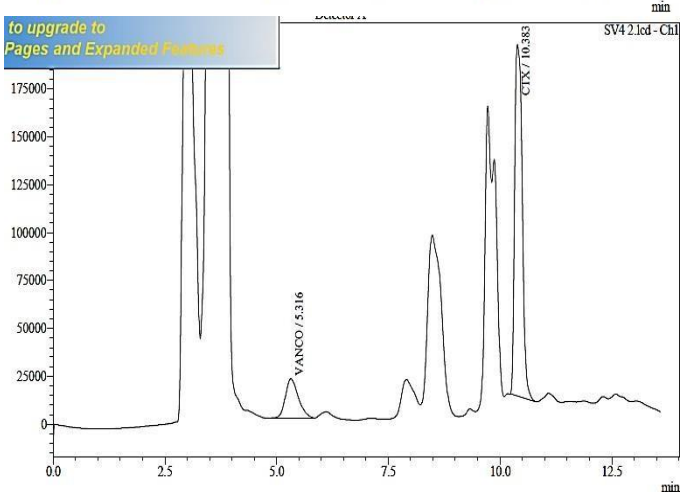

to upgrade to
Pages and Expanded Features
SV2 3.lcd - Ch1
VANCO / 5.329
CTX / 10.385
min


to upgrade to
Pages and Expanded Features
SV3 1.lcd - Ch1
VANCO / 5.334
CTX / 10.393
min









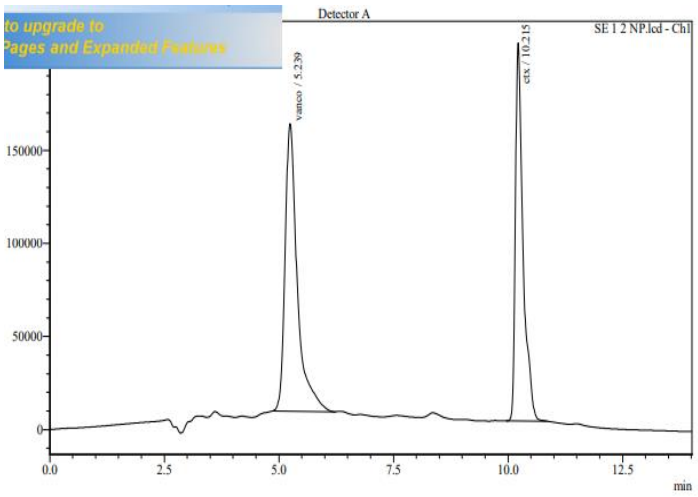
<< Detector A >>

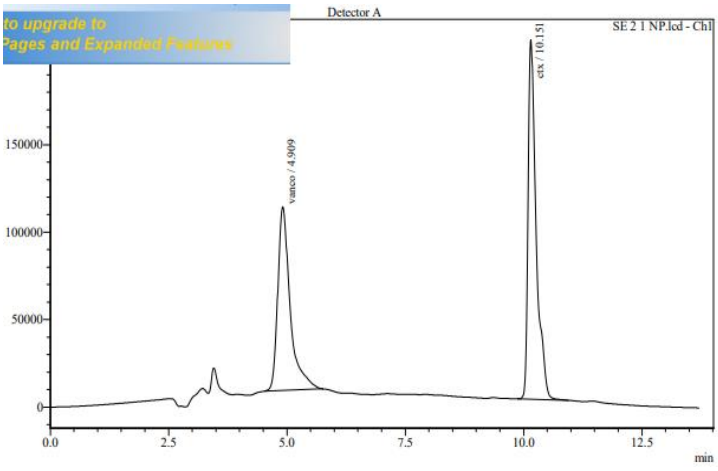
Title	Sample Name	Sample ID	VANCO	CTX
SE 1 1 SANS PLASMA 60.lcd	SE1 1	STD	2615246	2318533
SE 1 2 SANS PLASMA.lcd	SE1 2	STD	3277931	2388375
SE 2 1 NP.lcd	SE2 1	STD	1501314	2561991
SE 2 2 NP.lcd	SE2 2	STD	1007397	2379164
SE 3 1 NP.lcd	SE3 1	STD	890128	2725016
SE 3 2 NP.lcd	SE3 2	STD	1026783	2505406
SE 4 1 NP.lcd	SE4 1	STD	678421	2344555
SE 4 2 NP.lcd	SE4 2	STD	648285	2395616
SE 5 1 NP.lcd	SE5 1	STD	371150	2514901
SE 5 2 NP.lcd	SE5 2	STD	688024	2509950
SV1 1.lcd	SV1 1	ECH	2051489	2113150

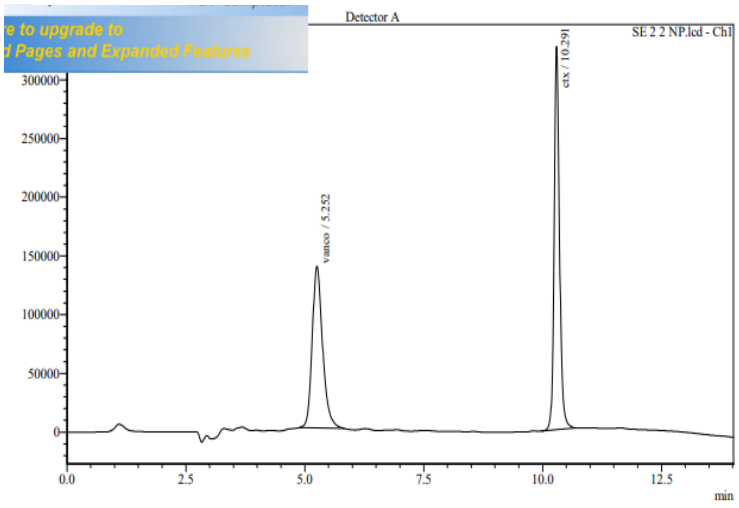
PDF Complete.
Here to upgrade to
ited Pages and Expanded Features

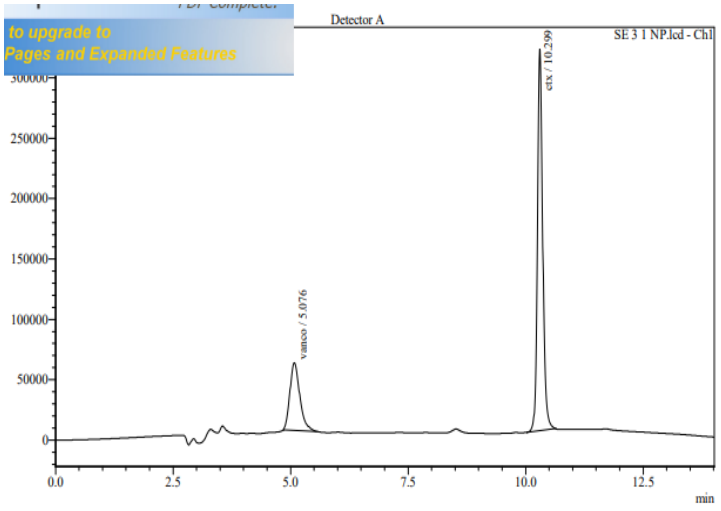
		Sample ID	VANCO	CTX
		ECH	2260248	2217759
		ECH	2312720	2121864
		ECH	1198877	2222391
SV2 2.lcd	SV2 2	ECH	1014634	2094979
SV2 3.lcd	SV2 3	ECH	1526680	2795908
SV3 1.lcd	SV3 1	ECH	462659	2223992
SV3 2.lcd	SV3 2	ECH	447978	2258444
SV3 3.lcd	SV3 3	ECH	525176	2206810
SV4 1.lcd	SV4 1	ECH	577454	2144793
SV4 2.lcd	SV4 2	ECH	413939	2136227
SV4 3.lcd	SV4 3	ECH		
SV4 4.lcd	SV4 3	ECH	0	0
SV5 1.lcd	SV5 1	ECH	2317	420725
SV5 2.lcd	SV5 2	ECH	220759	199120
SV5 3.lcd	SV5 3	ECH	178551	86854
Average			1079090	2078605
%RSD			79.635	35.479
Maximum			3277931	2795908
Minimum			2317	86854
Standard Deviation			859334	737469

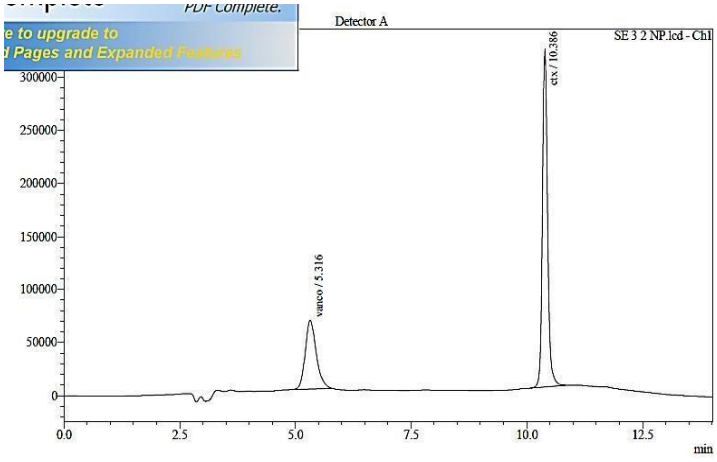
- **Série 2**

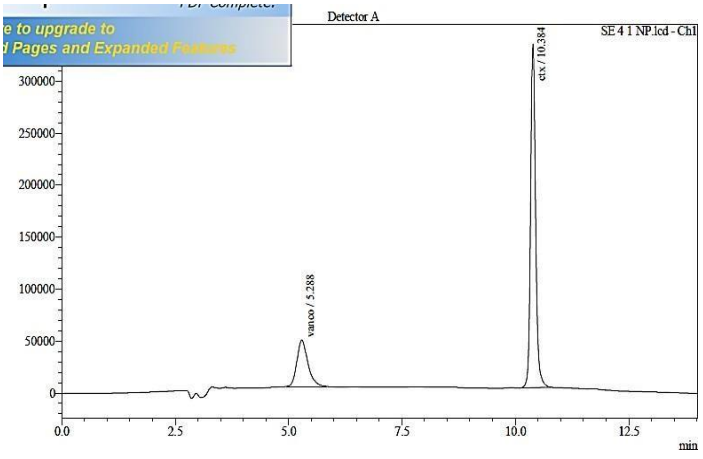

Detector A
SE 1 2 NP.lcd - Ch1
vanco / 5.239
etx / 10.215
min

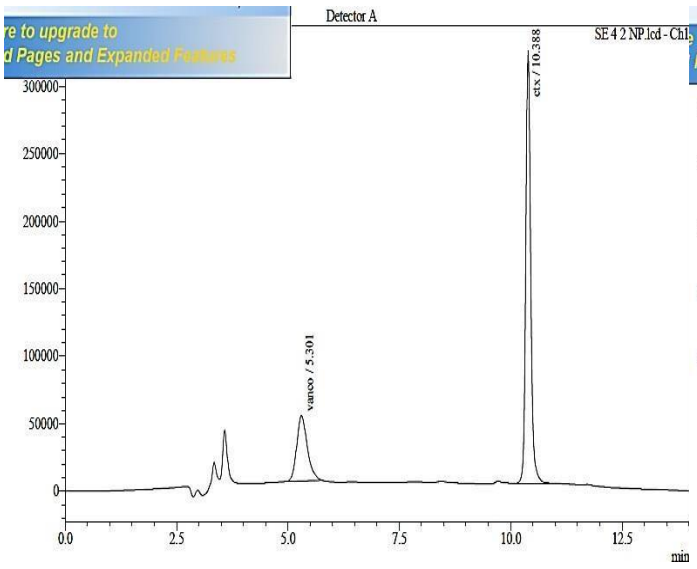

Detector A
SE 2 1 NP.lcd - Ch1
vanco / 4.909
etx / 10.151
min

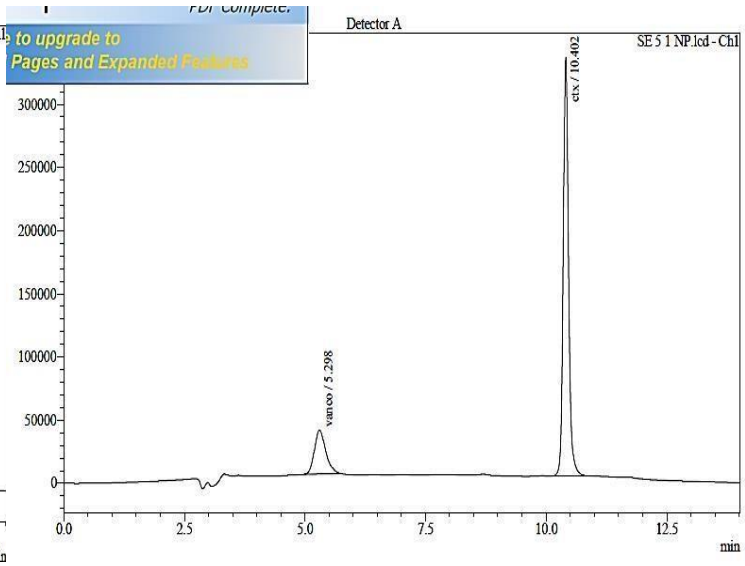

Detector A
SE 2 2 NP.lcd - Ch1
vanco / 5.252
etx / 10.291
min

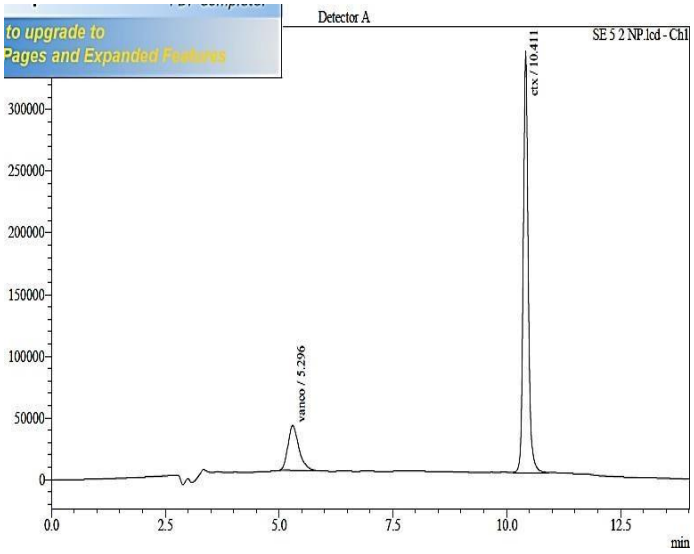

Detector A
SE 3 1 NP.lcd - Ch1
vanco / 5.076
etx / 10.299
min

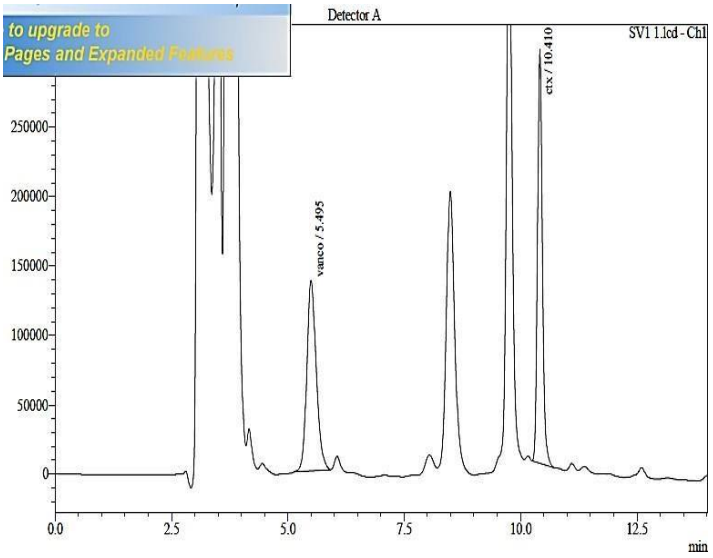

Detector A
SE 3 2 NP.lcd - Ch1
vanco / 5.316
etx / 10.386
min

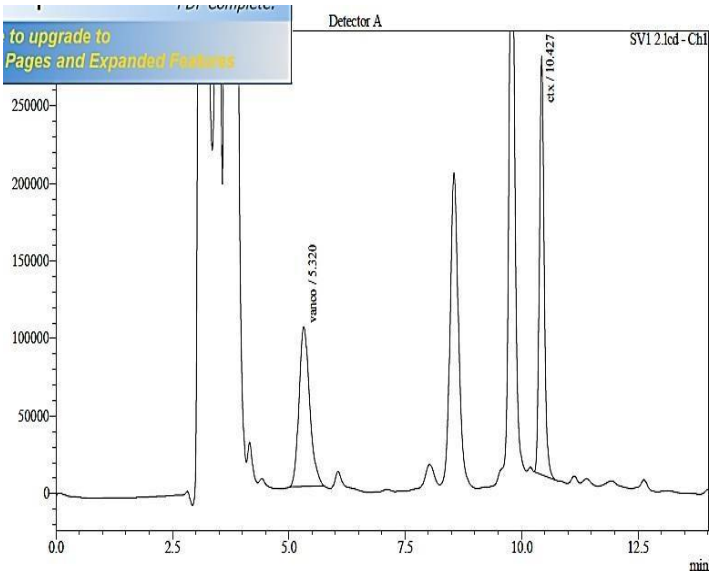

Detector A
SE 4 1 NP.lcd - Ch1
vanco / 5.288
etx / 10.384
min

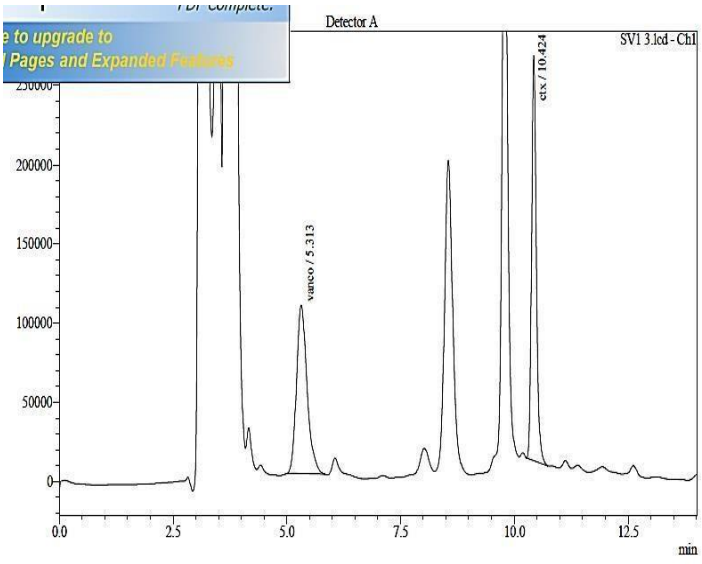

Detector A
SE 4 2 NP.lcd - Ch1
ctx / 10.388
vanco / 5.301
min

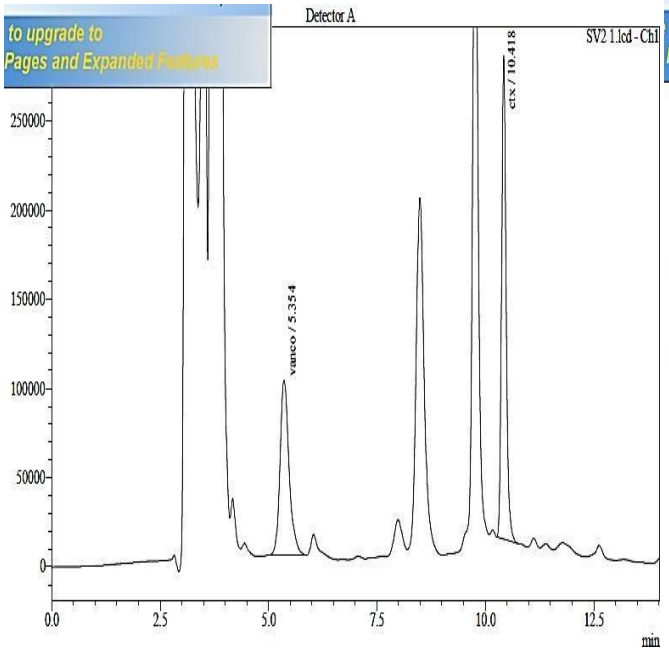

Detector A
SE 5 1 NP.lcd - Ch1
ctx / 10.402
vanco / 5.298
min

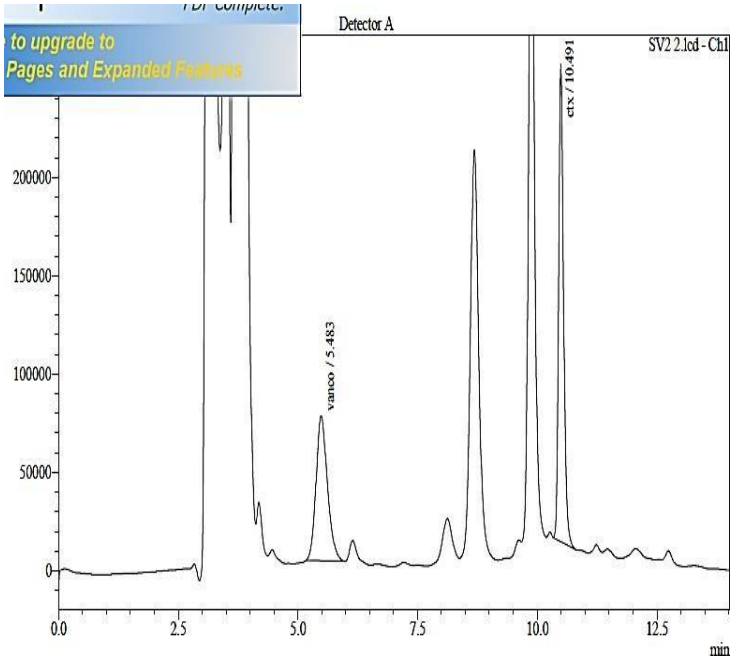

Detector A
SE 5 2 NP.lcd - Ch1
ctx / 10.411
vanco / 5.296
min

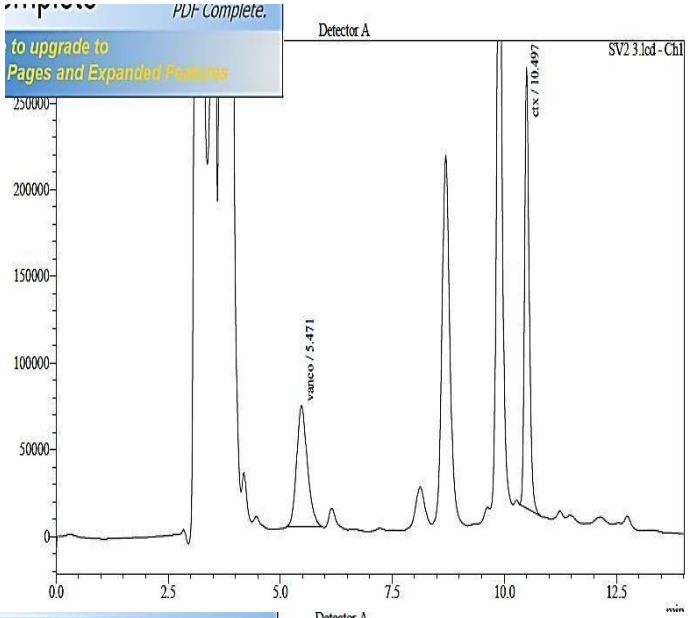

Detector A
SV1 1.lcd - Ch1
ctx / 10.410
vanco / 5.495
min

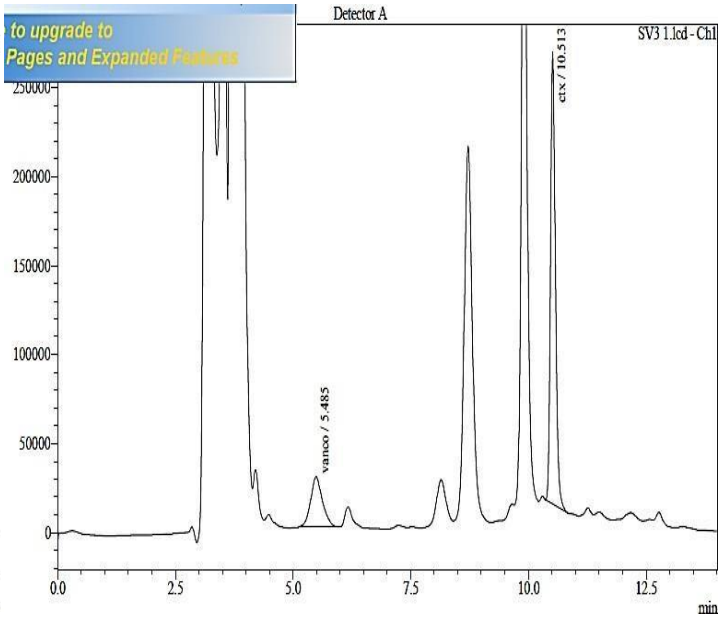

Detector A
SV1 2.lcd - Ch1
ctx / 10.427
vanco / 5.320
min

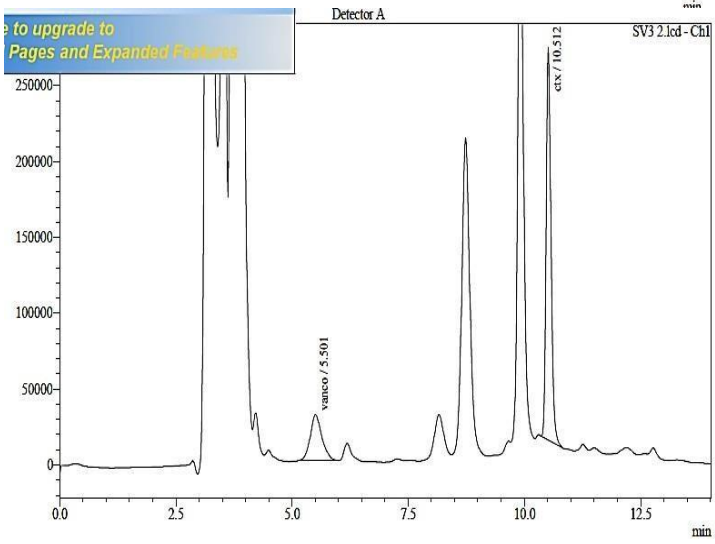

Detector A
SV1 3.lcd - Ch1
ctx / 10.424
vanco / 5.313
min

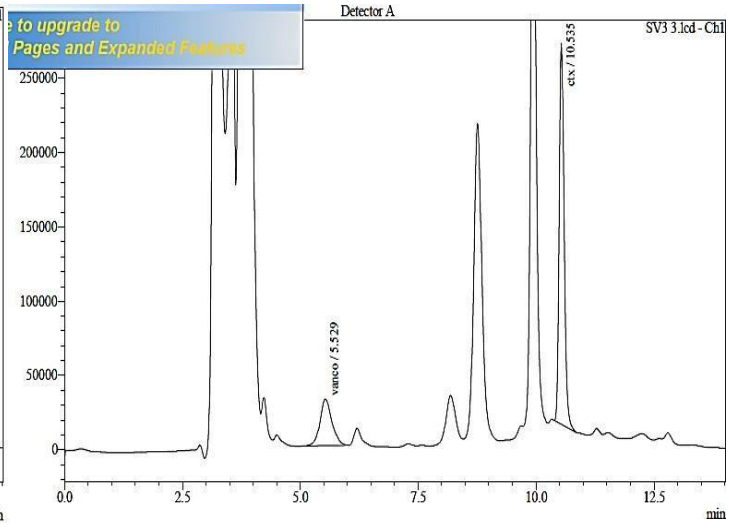

to upgrade to
Pages and Expanded Features
Detector A
SV2 1.1cd - Ch1
vanco / 5.354
ctx / 10.418
min

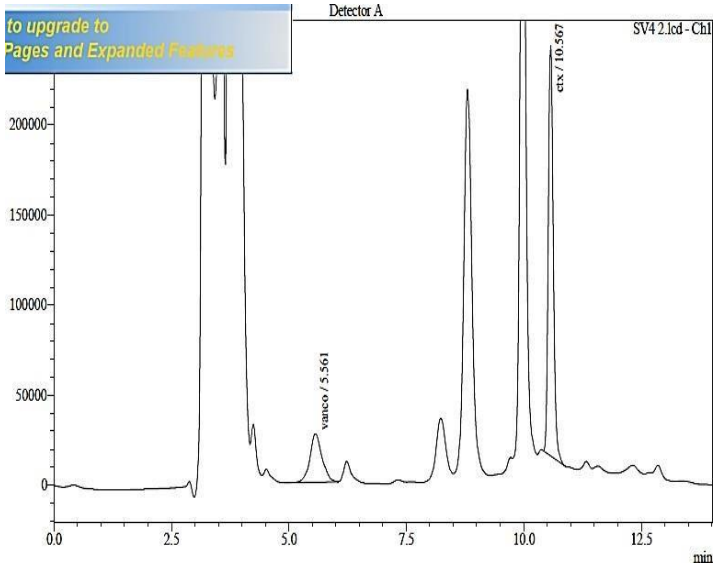

to upgrade to
Pages and Expanded Features
Detector A
SV2 2.1cd - Ch1
vanco / 5.483
ctx / 10.491
min

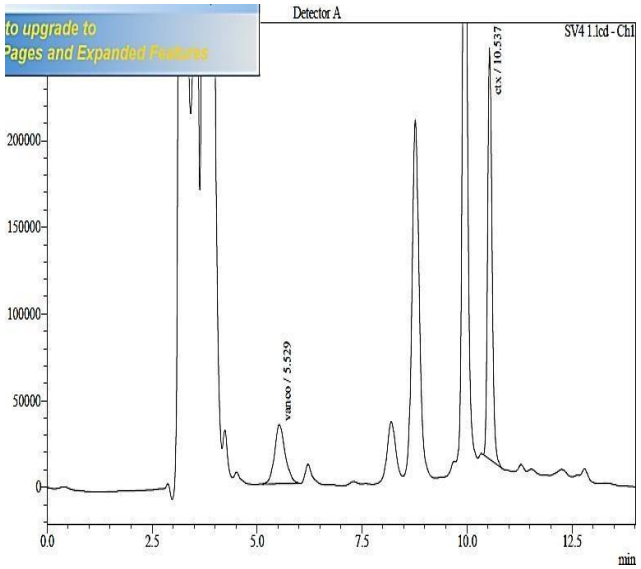

PDF Complete.
to upgrade to
Pages and Expanded Features
Detector A
SV2 3.1cd - Ch1
vanco / 5.471
ctx / 10.497
min

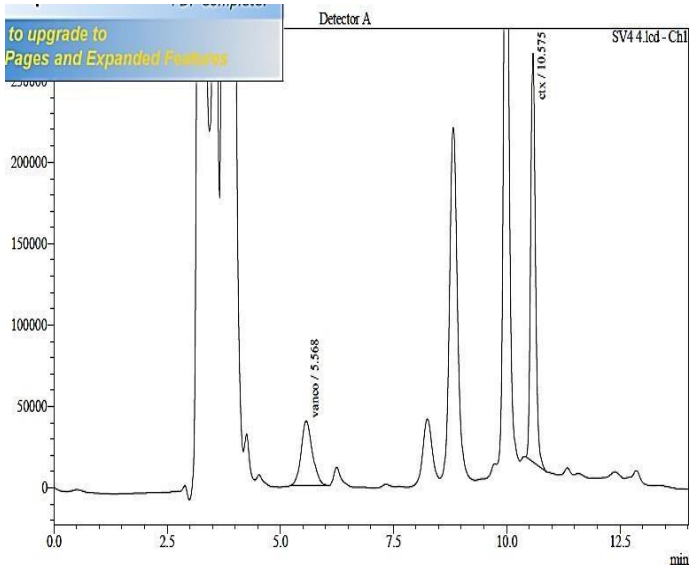

to upgrade to
Pages and Expanded Features
Detector A
SV3 1.1cd - Ch1
vanco / 5.485
ctx / 10.513
min

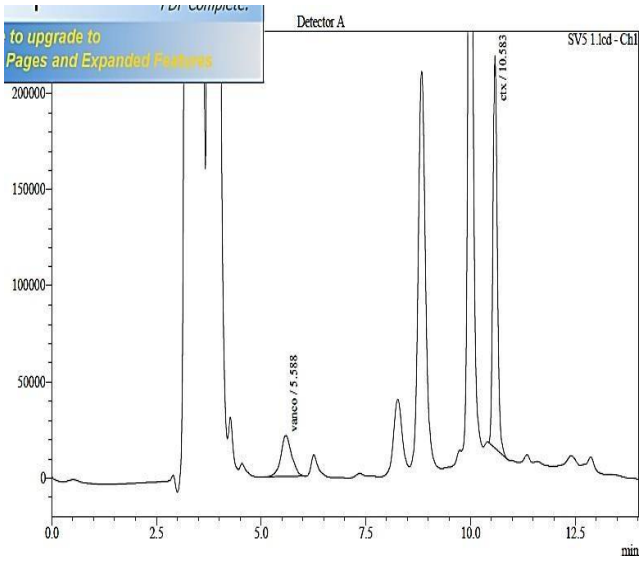

to upgrade to
Pages and Expanded Features
Detector A
SV3 2.1cd - Ch1
vanco / 5.501
ctx / 10.512
min


to upgrade to
Pages and Expanded Features
Detector A
SV3 3.1cd - Ch1
vanco / 5.529
ctx / 10.535
min









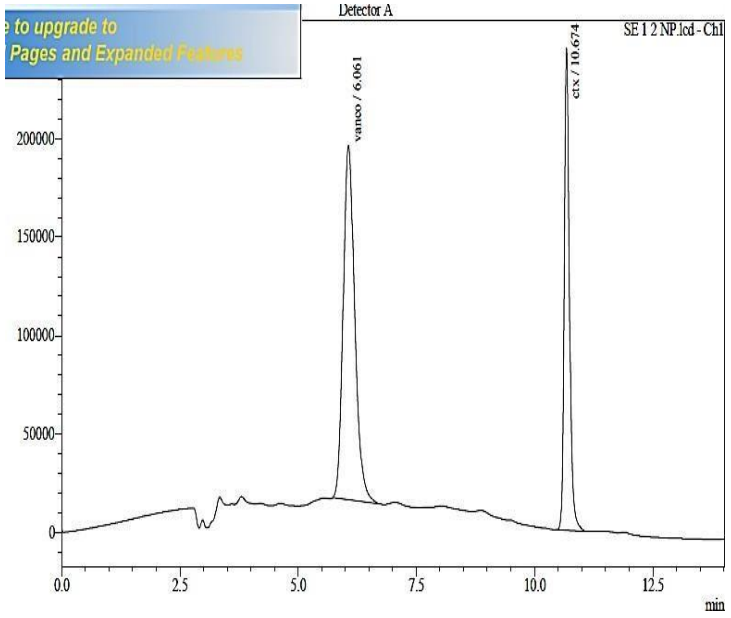
<< Detector A >>

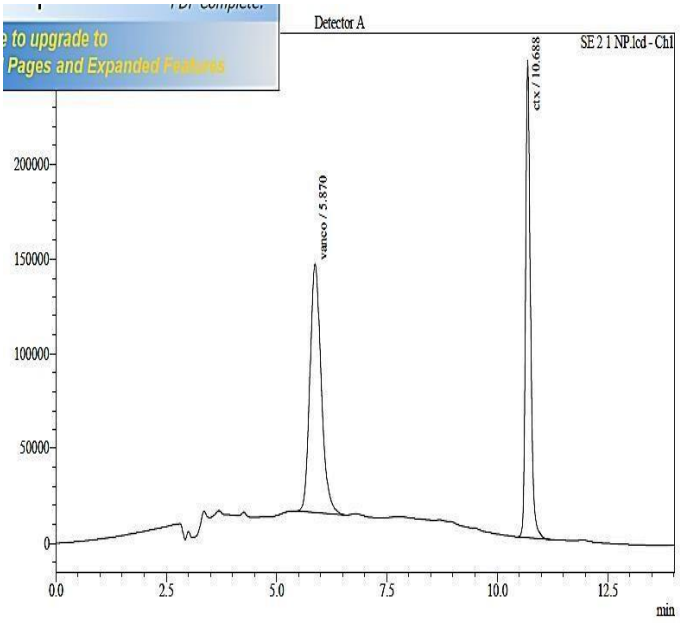
Title	Sample Name	Sample ID	vanco	ctx
SE 1 1 NP.lcd	SE1 1	STD	2498132	2373720
SE 1 2 NP.lcd	SE1 2	STD	2882244	2354844
SE 2 1 NP.lcd	SE2 1	STD	1915556	2443064
SE 2 2 NP.lcd	SE2 2	STD	2098511	2571820
SE 3 1 NP.lcd	SE3 1	STD	824954	2469242
SE 3 2 NP.lcd	SE3 2	STD	1077474	2424127
SE 4 1 NP.lcd	SE4 1	STD	745901	2508711
SE 4 2 NP.lcd	SE4 2	STD	804462	2426291
SE 5 1 NP.lcd	SE5 1	STD	571551	2519176
SE 5 2 NP.lcd	SE5 2	STD	605179	2569710
SV1 1.lcd	SV1 1	ECH	1939809	2162123

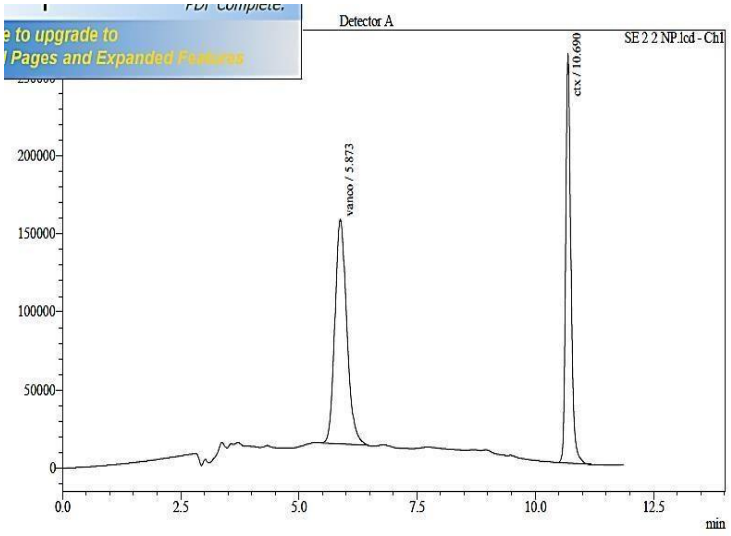
ere to upgrade to
ed Pages and Expanded Features

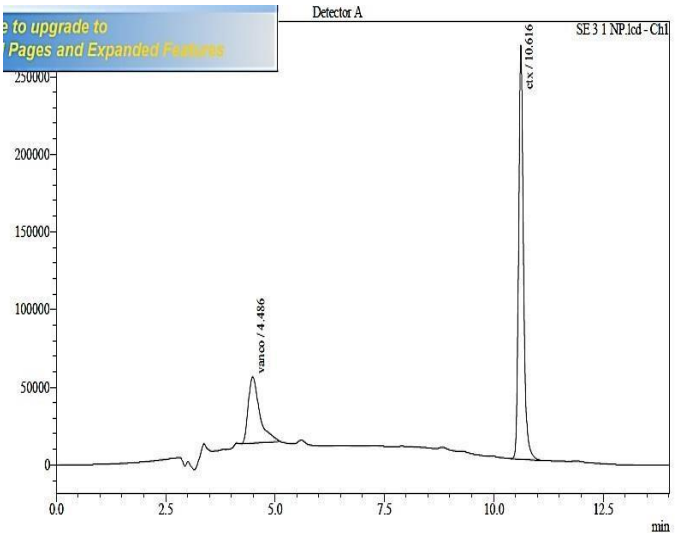
		Sample ID	vanco	ctx
		ECH	1642061	1945312
		ECH	1718993	1855725
		ECH	1412192	1973348
SV2 2.lcd	SV2 2	ECH	1221400	1752264
SV2 3.lcd	SV2 3	ECH	1173702	1829469
SV3 1.lcd	SV3 1	ECH	492941	1827234
SV3 2.lcd	SV3 2	ECH	530512	1863305
SV3 3.lcd	SV3 3	ECH	546160	1842948
SV4 1.lcd	SV4 1	ECH	596350	1699670
SV4 2.lcd	SV4 2	ECH	475389	1641414
SV4 4.lcd	SV4 3	ECH	687900	1811692
SV5 1.lcd	SV5 1	ECH	382228	1466853
SV5 2.lcd	SV5 2	ECH	387420	
Average			1134626	2101394
%RSD			63.432	16.794
Maximum			2882244	2571820
Minimum			382228	1466853
Standard Deviation			719710	352913

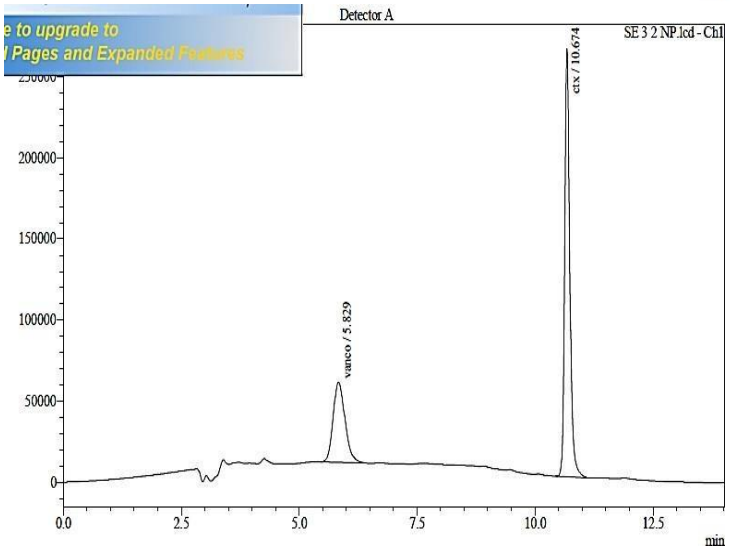
- **Série 3 :**

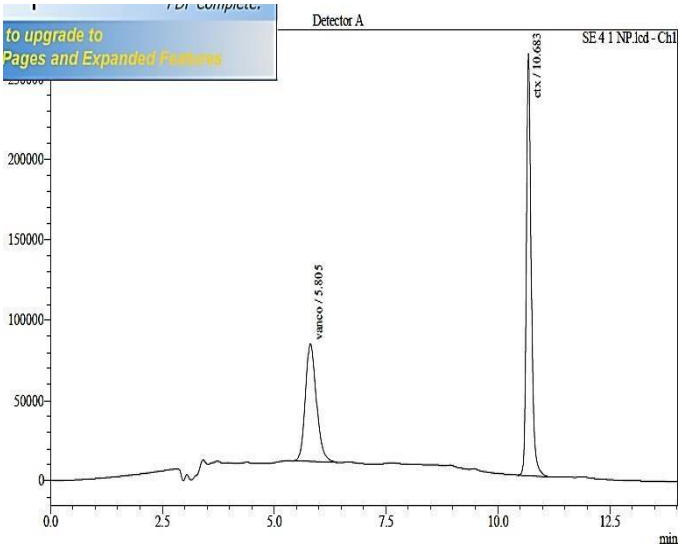

Detector A
SE 1 2 NP.lcd - Ch1
vanco / 6.061
ctx / 10.674
min

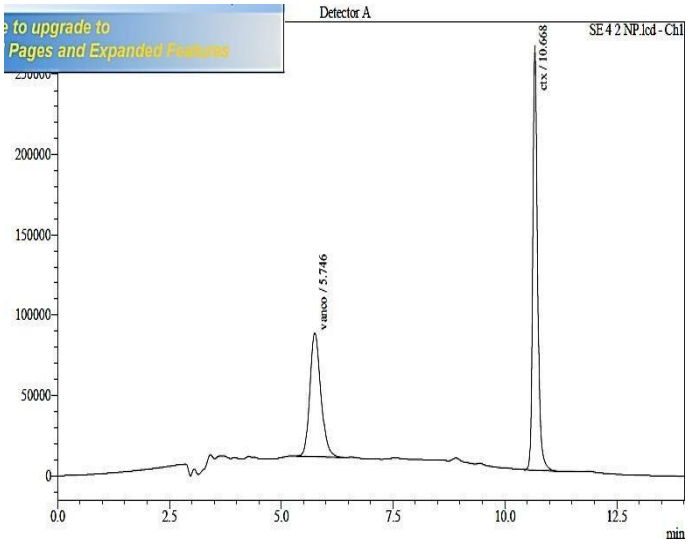

Detector A
SE 2 1 NP.lcd - Ch1
vanco / 5.870
ctx / 10.688
min

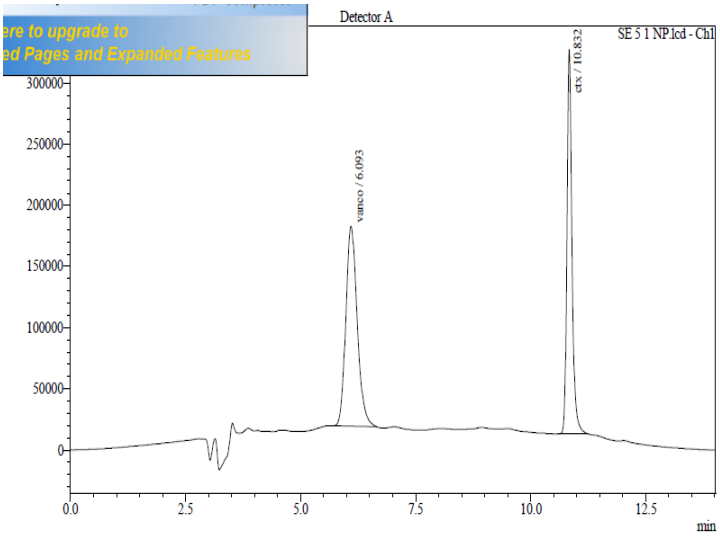

Detector A
SE 2 2 NP.lcd - Ch1
vanco / 5.873
ctx / 10.690
min

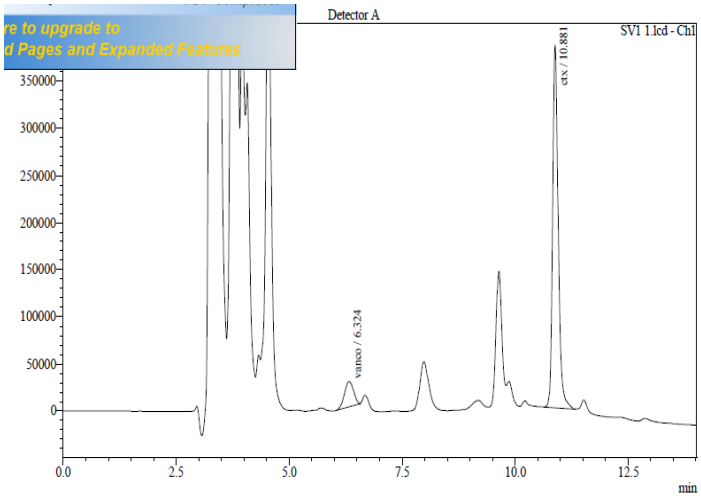

Detector A
SE 3 1 NP.lcd - Ch1
vanco / 4.486
ctx / 10.616
min

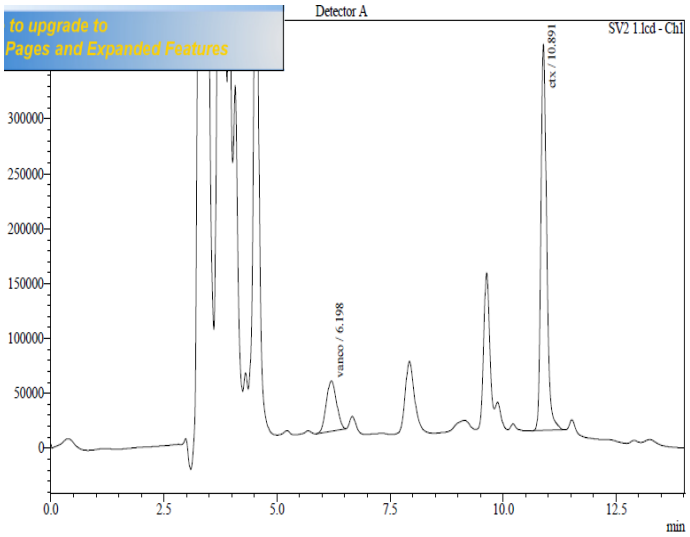

Detector A
SE 3 2 NP.lcd - Ch1
vanco / 5.829
ctx / 10.674
min

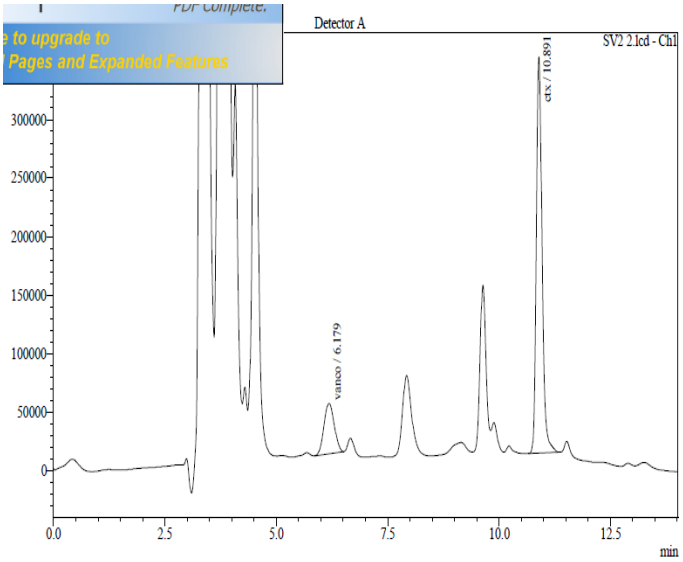

Detector A
SE 4 1 NP.lcd - Ch1
vanco / 5.805
ctx / 10.683
min

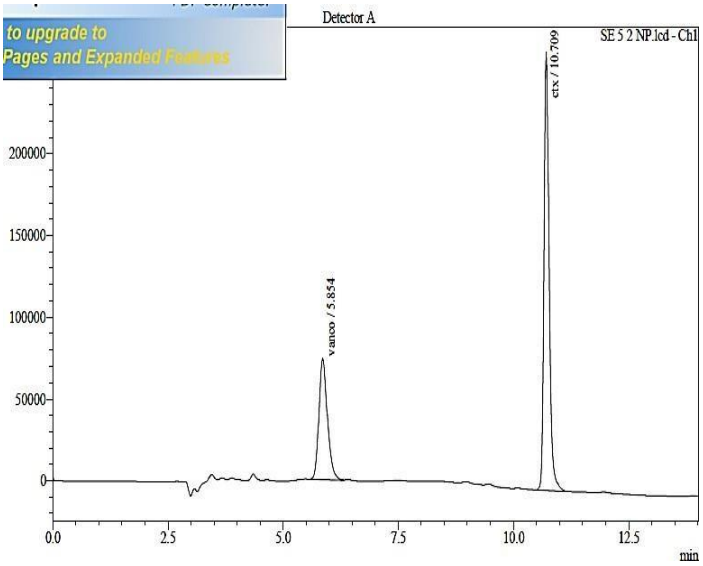

Detector A
SE 4 2 NP.lcd - Ch1
vanco / 5.746
ctx / 10.668
min

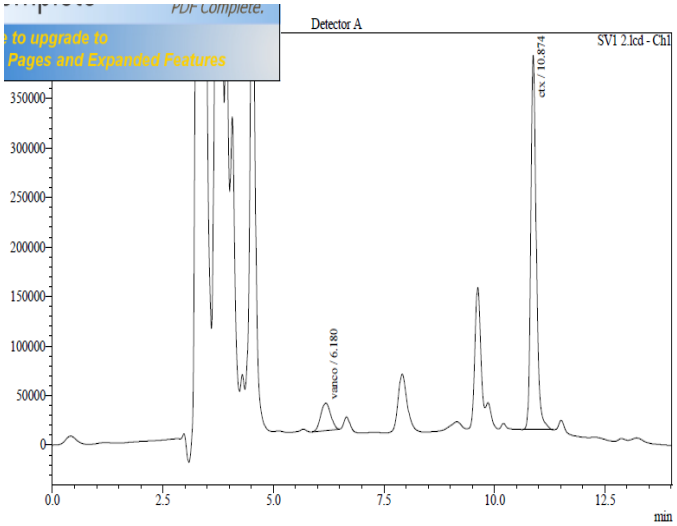

Detector A
SE 5 1 NP.lcd - Ch1
vanco / 6.093
ctx / 10.832
min

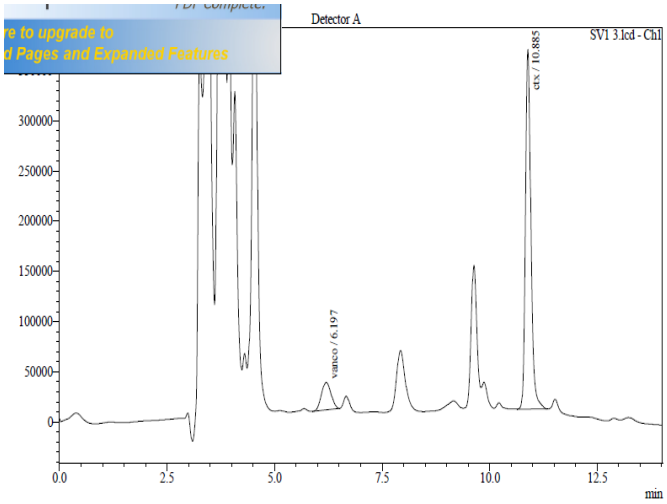

Detector A
SV1 1.lcd - Ch1
vanco / 6.324
ctx / 10.881
min

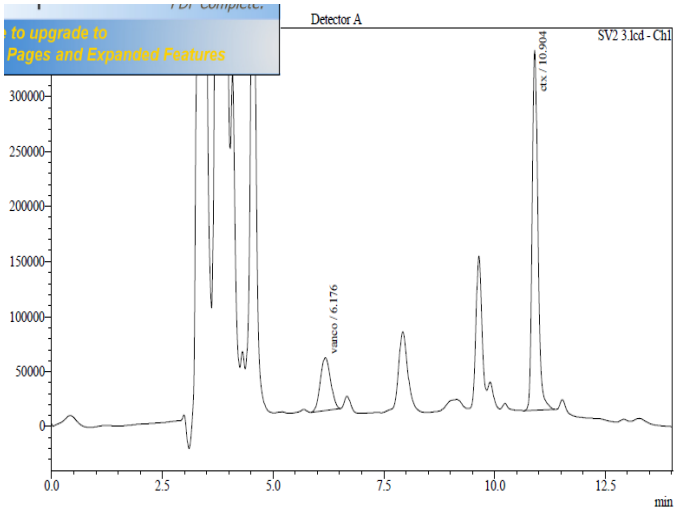

Detector A
SV2 1.lcd - Ch1
vanco / 6.198
ctx / 10.891
min

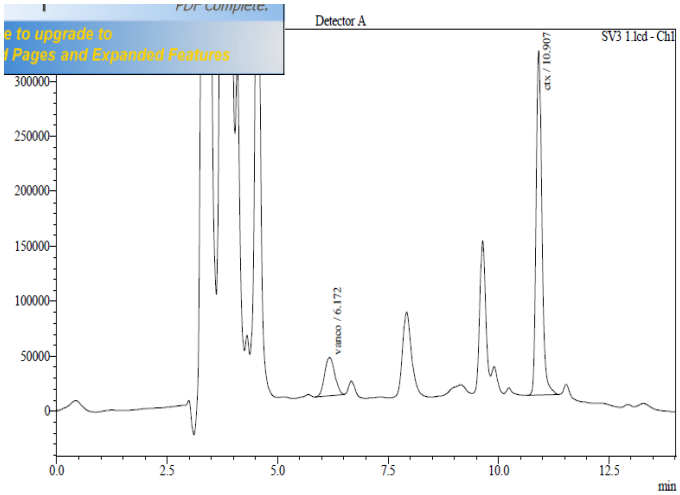

Detector A
SV2 2.lcd - Ch1
vanco / 6.179
ctx / 10.891
min

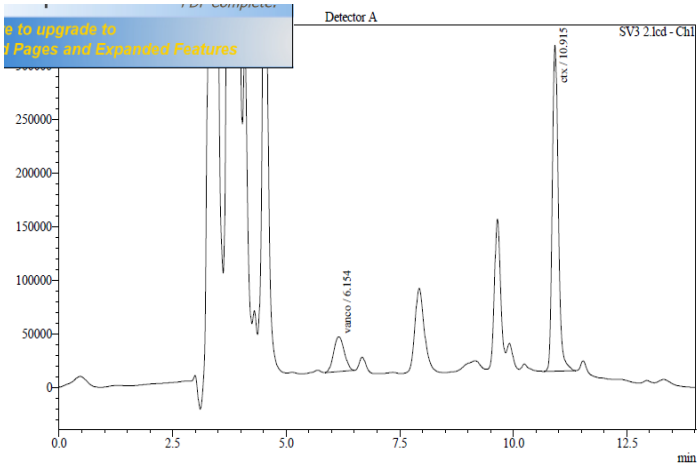

Detector A
SE 5 2 NP.lcd - Ch1
vanco / 5.854
ctx / 10.709
min

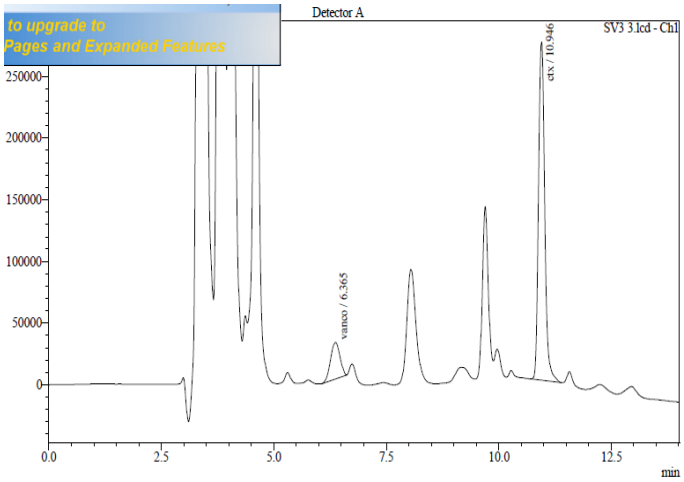




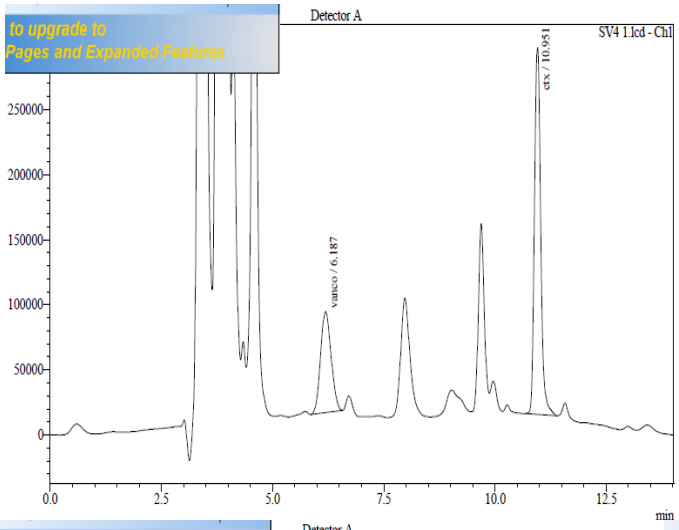


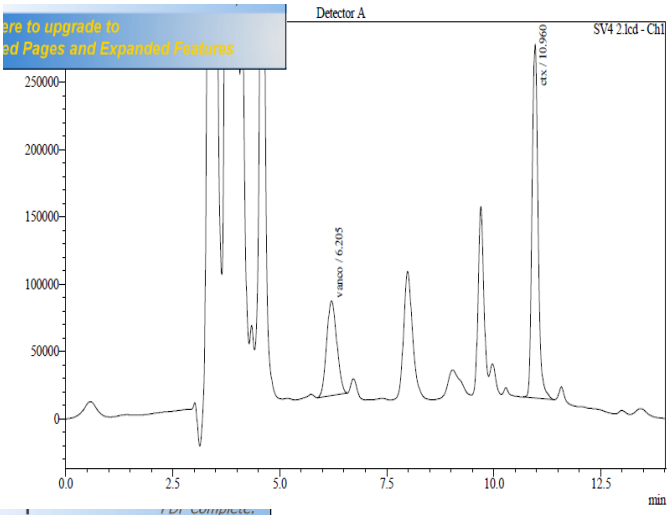


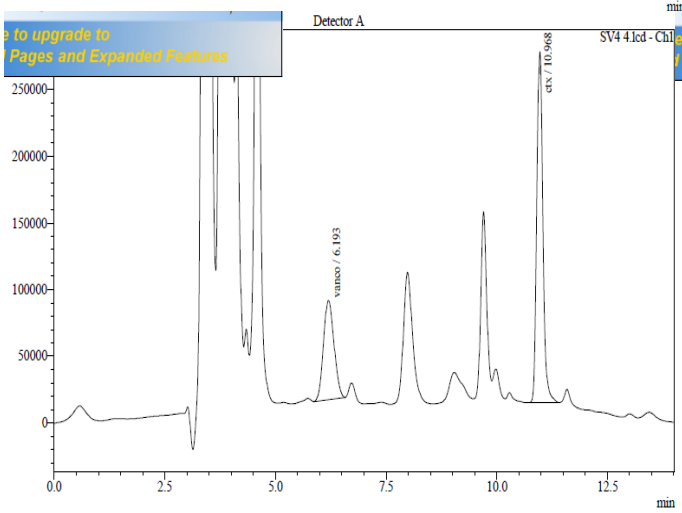


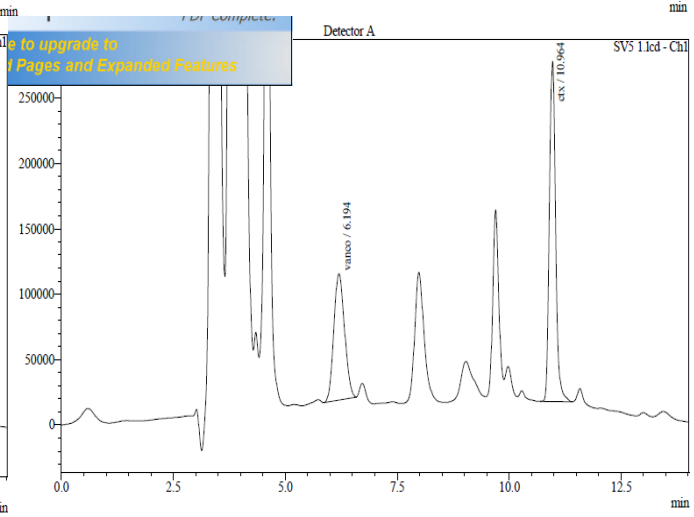


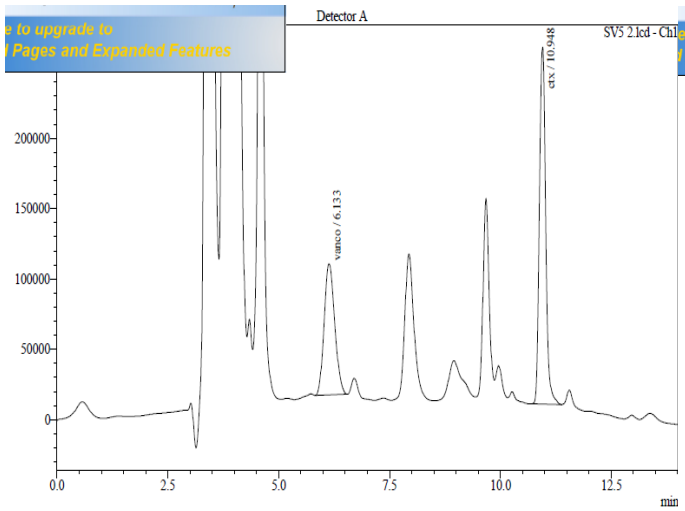
		Sample ID	vanco	ctx
		ECH	434148	3310738
		ECH	428470	3180498
		ECH	725326	3141958
SV2 2.lcd	SV2 2	ECH	691117	3063208
SV2 3.lcd	SV2 3	ECH	775720	2960793
SV3 1.lcd	SV3 1	ECH	558803	2849607
SV3 2.lcd	SV3 2	ECH	528288	2804159
SV3 3.lcd	SV3 3	ECH	429783	2603892
SV4 1.lcd	SV4 1	ECH	1287242	2731756
SV4 2.lcd	SV4 2	ECH	1165231	2547932
SV4 4.lcd	SV4 3	ECH	1239245	2528705
SV5 1.lcd	SV5 1	ECH	1615812	2522280
SV5 2.lcd	SV5 2	ECH	1547838	2476387
SV5 3.lcd	SV5 3	ECH	1642762	2426806
Average			1202183	2706638
%RSD			62.386	11.354
Maximum			3020540	3319804
Minimum			375367	2347903
Standard Deviation			749993	307308

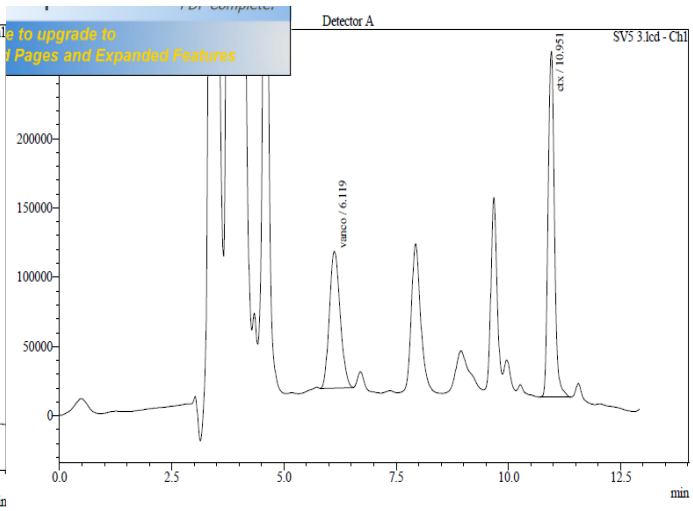












<< Detector A >>

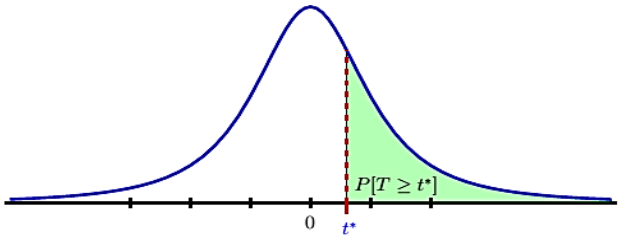
Title	Sample Name	Sample ID	vanco	ctx
SE 1 1 NP.lcd	SE1 1	STD	1170000	2967417
SE 1 2 NP.lcd	SE1 2	STD	640073	2557088
SE 2 1 NP.lcd	SE2 1	STD	1213209	2681620
SE 2 2 NP.lcd	SE2 2	STD	1154171	2417575
SE 3 1 NP.lcd	SE3 1	STD	949015	2347903
SE 3 2 NP.lcd	SE3 2	STD	951004	2500918
SE 4 1 NP.lcd	SE4 1	STD	2437142	2409289
SE 4 2 NP.lcd	SE4 2	STD	2258292	2501469
SE 5 1 NP.lcd	SE5 1	STD	2815972	2429245
SE 5 2 NP.lcd	SE5 2	STD	3020540	2384913
SV1 1.lcd	SV1 1	ECH	375367	3319804

ANNEXE IV
TABLE DE STUDENT

ANNEXE IV : TABLE DE STUDENT

Tableau T

Tableau de t^* tel qu'une variable de Student à dl degrés de liberté ait probabilité p d'être supérieure à t^*



	$P[T \geq t^*] = p$											
dl	0.25	0.2	0.15	0.1	0.05	0.025	0.02	0.01	0.005	0.0025	0.001	0.0005
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	15.89	31.82	63.66	127.3	318.3	636.6
2	.8165	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	4.849	6.965	9.925	14.09	22.33	31.60
3	.7649	.9785	1.250	1.638	2.353	3.182	3.482	4.541	5.841	7.453	10.21	12.92
4	.7407	.9410	1.190	1.533	2.132	2.776	2.999	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	.7267	.9195	1.156	1.476	2.015	2.571	2.757	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	.7176	.9057	1.134	1.440	1.943	2.447	2.612	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	.7111	.8960	1.119	1.415	1.895	2.365	2.517	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	.7064	.8889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.449	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	.7027	.8834	1.100	1.383	1.833	2.262	2.398	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	.6998	.8791	1.093	1.372	1.812	2.228	2.359	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	.6974	.8755	1.088	1.363	1.796	2.201	2.328	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	.6955	.8726	1.083	1.356	1.782	2.179	2.303	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	.6938	.8702	1.079	1.350	1.771	2.160	2.282	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	.6924	.8681	1.076	1.345	1.761	2.145	2.264	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	.6912	.8662	1.074	1.341	1.753	2.131	2.249	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	.6901	.8647	1.071	1.337	1.746	2.120	2.235	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	.6892	.8633	1.069	1.333	1.740	2.110	2.224	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	.6884	.8620	1.067	1.330	1.734	2.101	2.214	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	.6876	.8610	1.066	1.328	1.729	2.093	2.205	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	.6870	.8600	1.064	1.325	1.725	2.086	2.197	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	.6864	.8591	1.063	1.323	1.721	2.080	2.189	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	.6858	.8583	1.061	1.321	1.717	2.074	2.183	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	.6853	.8575	1.060	1.319	1.714	2.069	2.177	2.500	2.807	3.104	3.485	3.768
24	.6848	.8569	1.059	1.318	1.711	2.064	2.172	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	.6844	.8562	1.058	1.316	1.708	2.060	2.167	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	.6840	.8557	1.058	1.315	1.706	2.056	2.162	2.479	2.779	3.067	3.435	3.707
27	.6837	.8551	1.057	1.314	1.703	2.052	2.158	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
28	.6834	.8546	1.056	1.313	1.701	2.048	2.154	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	.6830	.8542	1.055	1.311	1.699	2.045	2.150	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
30	.6828	.8538	1.055	1.310	1.697	2.042	2.147	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
40	.6807	.8507	1.050	1.303	1.684	2.021	2.123	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
50	.6794	.8489	1.047	1.299	1.676	2.009	2.109	2.403	2.678	2.937	3.261	3.496
60	.6786	.8477	1.045	1.296	1.671	2.000	2.099	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
80	.6776	.8461	1.043	1.292	1.664	1.990	2.088	2.374	2.639	2.887	3.195	3.416
100	.6770	.8452	1.042	1.290	1.660	1.984	2.081	2.364	2.626	2.871	3.174	3.390
1000	.6747	.8420	1.037	1.282	1.646	1.962	2.056	2.330	2.581	2.813	3.098	3.300
z^*	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.054	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291
	0.25	0.2	0.15	0.1	0.05	0.025	0.02	0.01	0.005	0.0025	0.001	0.0005

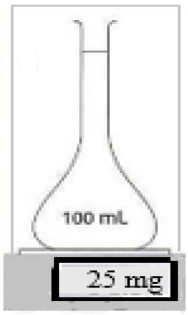
Fabrice Larribe. 2007–2014 © Table construite avec SAS, TikZ et ConTEX

ANNEXE V

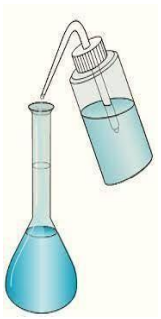
MODE OPERATOIRE DE VALIDATION

ANNEXE V : MODE OPERATOIRE DE VALIDATION

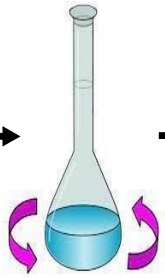
Peser 25 mg de Vancomycine et 25 mg de Céfotaxime (EI).



Ajouter un petit volume d'eau purifiée.

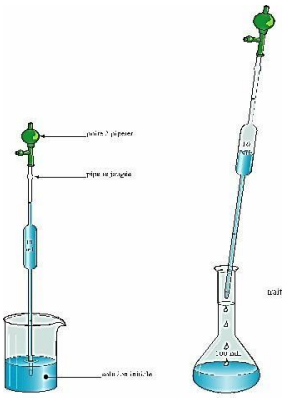


Mélanger par retournement.

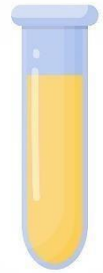


Compléter au trait de jauge avec le même diluant.

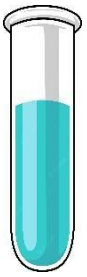
Faire des dilutions sur les solutions mères préparées.



Charger le plasma avec les solutions préparées de Vancomycine et Cfx.



Charger le diluant avec les solutions préparées de Vancomycine et EI.



Ajouter 500 µL d'acide perchlorique en deux fois puis vortexer 1min.

Centrifuger 20 min à 40000 tr/min deux fois.

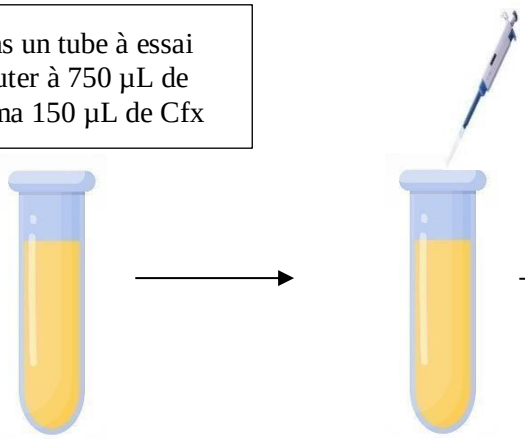
Remplir les vials.

Injecter.

ANNEXE VI
PROTOCOLE EXPERIMENTAL D'ANALYSE

ANNEXE VI : PROTOCOLE EXPERIMENTAL D'ANALYSE

Dans un tube à essai ajouter à 750 µL de plasma 150 µL de Cfx

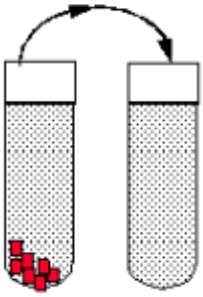


Ajouter 500 µL d'acide perchlorique

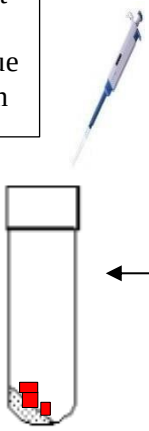
Vortexer le mélange pendant 1 min

Faire une 1ère Centrifugation pendant 20 min à 40000 tr/min

Récupérer le surnageant dans un tube à essai propre



Solubiliser le culot avec 500 µL d'acide perchlorique puis vortexer 1min



Faire une 2ème centrifugation comme précédemment

Additionner le deuxième surnageant obtenu au premier

Remplir la Vial

Injecter

Calculs

La concentration de la Vancomycine C_v est obtenue par étalonnage interne, en utilisant l'équation de la droite suivante :

$A_V/A_{Cfx} = a\ C_V/C_{Cfx} + b$

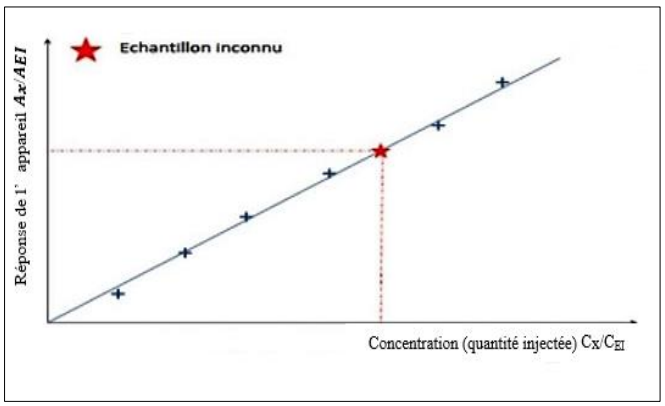
$C_V = ((A_V/A_{Cfx} - b)/a)\ C_{Cfx}$

Avec :

a et b, la pente et l'ordonné à l'origine respectivement.

C_{Cfx} : la concentration du Céfotaxime.

A_v, $A_{Cfx\ les}$ aires des pics de la Vancomycine et du Céfotaxime respectivement.



Droite d'étalonnage $(A_V/A_{Cfx}) = f(C_V/C_{Cfx})$

ANNEXE VII
LES AIRS DE PIC D'ETALONNAGE ET DE VALIDATION DE LA VANCOMYCINE ET DU CEFOTAXIME(EI)

SERIES D'ETALONNAGE

SERIE 1		SERIE 2		SERIE 3	
Vanco	EI	Vanco	EI	Vanco	EI
2415246	2318533	2498132	2373720	2515972	2429245
2577931	2388375	2882244	2354844	2420540	2384913
1491314	2561991	1405556	2443064	1407142	2409289
1401397	2379164	1458511	2571820	1408292	2501469
890128	2725016	824954	2469242	682639	2072783
876783	2505406	817474	2424127	687040	2020123
618421	2344555	655901	2508711	703209	2681620
618285	2395616	644462	2426291	644171	2417575
541150	2514901	571551	2519176	650000	2967417
518024	2509950	605179	2569710	560073	2557088

SERIES DE VALIDATION

SERIE 1		SERIE 2		SERIE 3	
Vanco	EI	Vanco	EI	Vanco	EI
2051489	2113150	1939809	2162123	1615812	2522280
2260248	2217759	1642061	1945312	1547838	2476387
2312720	2121864	1718993	1855725	1642762	2426806
1498877	2222391	1352192	1973348	1787242	2731756
1414634	2094979	1201400	1752264	1665231	2547932
1826680	2795908	1253702	1829469	1639245	2528705
722317	2141988	596350	1699670	1105367	3319804
720759	2150111	475389	1641414	1104148	3310738
738551	2137667	587900	1811692	1108470	3180498
577454	2144793	492941	1827234	815326	3041958
563939	2136227	530512	1863305	821117	3063208
564887	2137112	546160	1842948	775720	2960793
462659	2223992	382228	1866853	558803	2849607
447978	2258444	388002	1865744	528288	2804159
525176	2206810	387420	1866853	429783	2603892

RÉSUMÉ

RÉSUMÉ

Prérequis : La Vancomycine est un antibiotique glycopeptidique, son usage est réservé aux hôpitaux pour la prise en charge des infections dus à des germes multirésistants pour lesquels il représente le dernier rempart thérapeutique. Son efficacité pourrait toutefois s'accompagner d'une toxicité rénale et auditive. C'est pourquoi, chez les patients à risque, son suivi thérapeutique pharmacologique est fortement recommandé.
Afin de garantir une prise en charge optimale du patient, la fiabilité des résultats obtenus est capitale, celle-ci est conditionnée par une validation préalable de la méthode bio-analytique qui sera utilisée, et cela, en se basant sur des tests statistiques bien définis.

But : L'objectif de ce présent travail est de mettre au point, d'optimiser et de valider une nouvelle méthode de dosage de la Vancomycine dans le plasma humain par Chromatographie Liquide à Haute Performance, en utilisant la démarche harmonisée basée sur le profil d'exactitude comme outil décisionnel, publié par la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) dans la revue STP pharma pratique 2006.

Méthode : Une nouvelle technique de dosage plasmatique de la Vancomycine par CLHP, en utilisant l'étalonnage interne, a été développée aux laboratoires de Chimie Analytique et de Biochimie du département de pharmacie de Tizi Ouzou pour une future utilisation en routine. Les conditions opératoires optimisées de cette méthode, dont la température, le débit d'élution, la composition de la phase mobile, son pH et les modalités de précipitation ont été décrites.
Après déprotéinisation par l'acide perchlorique, la séparation chromatographique est faite sur une colonne C18 à 30 °C, avec une phase mobile composée d'un tampon phosphate de sodium monobasique et du méthanol, élués selon un mode gradient. Le Céfotaxime est utilisé comme étalon interne (EI). La détection est assurée par spectrophotométrie UV-Visible à une longueur d'onde de 220 nm. Le temps d'analyse obtenu est de 14 minutes.

Résultats : Les limites de quantification basse et haute sont respectivement 13,22 et 50 mg/L, la régression entre les concentrations introduites et prédites est linéaire dans les limites de quantifications avec un coefficient de détermination linéaire de 96,47 %. Les biais relatifssont largement inférieurs à $\pm$ 10 %, la répétabilité et la reproductibilité sont inférieures à $\pm$5 % et l'erreur totale ne dépasse pas les limites d'acceptabilité prédéfinies [-15%, +15%] dans l'intervalle de dosage accepté.

La méthode de dosage élaborée s'est avérée simple, sensible, facile à mettre en œuvre, rapide, spécifique, fidèle, juste, exacte et linéaire dans l'intervalle [13,22-50] mg/L, avec un risque d'avoir un maximum de 15 % des futures mesures en dehors des limites d'acceptation fixées.

Conclusion : En conclusion, la méthode conçue est validée et apte à être utilisée en routine pour le dosage de la Vancomycine dans plasma chez les patients traités par cet antibiotique et nécessitant un suivi thérapeutique pour un éventuel ajustement posologique.

Mots clés : Vancomycine, Validation, Profil d'exactitude, HPLC, Suivi Thérapeutique Pharmacologique.

ABSTRACT

Prerequisites : Vancomycin is a glycopeptide antibiotic, strictly for the hospital use for the medical care of infections due to multiresistant germs for which it represents the last therapeutic rampart. The effectiveness of this antibacterial on these germs could however be accompanied by renal and auditory toxicity. Whitch is why in patients at risk pharmacological therapeutic monitoring by bio-analysis is strongly recommended.
In order to guarantee the best care for the patient, the reliability of the results obtained is crucial, this is conditioned by prior validation of the bioanalytical method that will be used. The concept of validation is based on well-defined experimental protocols and statistical tests correlated with acceptance criteria to achieve the set objectives.

Goal : The objective of this present work is to develop, optimize and validate a new method for the determination of vancomycin in human plasma by High Performance Liquid Chromatography, using the harmonized approach based on the profile of accuracy as a decision-making tool, published by the French Society of Pharmaceutical Sciences and Techniques (SFSTP) in the journal STP pharma pratique 2006.

Method : A new technique for the plasmatic dosage of Vancomycin by HPLC, using internal calibration as a quantification method, has been developed at the Analytical Chemistry and Biochemistry laboratories of the Tizi Ouzou pharmacy department for future routine use. Operating conditions optimisation of this assay technique, including the temperature and the elution rate, the composition of the mobile phase, its pH and the extraction methods have been described. After deproteinization with perchloric acid, the chromatographic separation is carried out on a C18 reverse phase column at 30°C, with a mobile phase composed of a monobasic sodium phosphate buffer and methanol, whose Elution is carried out according to a gradient mode. Cefotaxime is used as an internal standard (IS). Detection is ensured by UV-Visible spectrophotometry at a wavelength of 220 nm. Under these conditions, the analysis time is 14 minutes.

Results: The low and high quantification limits are respectively 13.22 and 50 mg/L, the calibration is linear within the quantification limits with a linear determination coefficient of 96.47 %. Relative biases are well below ±10 %, repeatability and reproducibility are below ±5 %, and total error does not exceed predefined limits of acceptability [-15%, +15%] within the accepted assay range.

The assay method developed then proved to be simple, sensitive, easy to implement, rapid, specific, faithful, accurate, exact and linear in the interval [13.22-50] mg/L, with a risk of have a maximum of 15% of future measurements outside the acceptance limits.

Conclusion : In conclusion, the method designed is validated and provides the ability to be used routinely for the determination of vancomycin in plasma in patients treated with this antibiotic and requiring therapeutic monitoring for possible dosage adjustment.

Keywords : Vancomycin, Validation, HPLC, Accuracy profil, Acceptance limits, Therapeutic Pharmacological Monitoring.

1. Rouessac F, Rouessac A, Cruché D. ANALYSE CHIMIQUE.Méthodes et techniques instrumentales modernes. 6 ed: Dunod; 2004.
2. Véronique JACOB. La chromatographie Liquide haute performances (hplc). 22-08-2010 [Available from: https://docplayer.fr/8331861-La-chromatographie-performance-hplc-salle-de-tp-de-genie-analytique-presentation-theorique-de-la-hplc-type-de-document-dt.html.
3. Chimie Analytique. Chromatographie Liquide Haute Performance HPLC [Available from: https://chimieanalytique.com/chromatographie-liquide-haute-performance-hplc/.