

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

جامعة مولود معمري تيزي وزو

Université de Mouloud MAMMERRI

كلية الطب

Faculté de MEDECINE

قسم الصيدلة

Département de pharmacie



## Mémoire de fin d'études

*Mise au point et validation d'une méthode de dosage du métronidazole dans le plasma par HPLC*

Présenté et soutenu publiquement

Le 25 juillet 2022

En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

Réalisé par :

HAMEG Samia

IDAHMANENE Nassima

KARA Nesrine

Composition de jury :

Dr H.BEN SI SAID

MAHU UMMTO

Président

Dr A. BELAICH

MAHU UMMTO

Examinatrice

Pr M.MAMOU

MCAHU UMMTO

Promoteur

Dr A.ABDENNOURI

RCA UMMTO

Co promoteur

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2021/2022

## *Dédicaces*

*Je dédie ce projet de fin d'études :*

*A mes très chers parents*

Je dis merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui, aucune dédicace ne pourra exprimer mes respects, considération et ma grande admiration pour vous. Puisse mon travail vous témoigner mon affection et mon profond amour.

*A mes Sœurs Djidji, Doudouche, Lila*

A vous mes meilleures amies, je ne saurais exprimer l'attachement et l'affection que j'ai pour vous. Aucun mot ne pourra décrire la gratitude et l'amour que je vous porte. Je vous souhaite une vie pleine de bonheur de joie et de réussites.

*A mon petit frère Hcicene*

Qui est la source de joie et de bonheur de toute notre famille.

*A mes grands parents*

Pour vos prières et vos encouragements

*Aux deux familles Hameg et Chabane*

Un grand merci à mes tantes et oncles, cousins et cousines pour leur soutien et encouragements.

*A mes chères amies Dalina, Iman, Yasmine, Ania*

Je vous remercie pour les moments inoubliables que nous avons partagé, votre précieuse collaboration et votre soutien amical m'ont été source d'inspirations et d'encouragements

*A mes trinômes Yasmine, Nesrine,*

*Sans qui je n'aurais pu mener à bien ce travail*

*Samia*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce mémoire de fin d'étude*

*À mes très chers parents,*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Je tiens à vous témoigner ma reconnaissance et mon éternelle gratitude pour les sacrifices et tous les efforts consentis pour mon éducation et ma formation. Sans vos prières, vos conseils, je n'aurais pu surmonter le stress de ces années d'études.*

*Puisse Dieu, vous accorde santé, bonheur, et longue vie.*

*A ma sœur **Dihia**, à mon frère **Massi***

*Pour leur appui, encouragements et soutien.*

*Aux deux familles **IDAHMANENE** et **AHMANACHE**.*

*A mes amies et sœurs de cœur **Samia, Dihia, Chahinez, Thilelli, Djidji***

*A mes trinômes **Samia, Nesrine**, ensemble nous avons pu mener ce travail à terme.*

*A tous ceux qui me sont chers.*

*Je remercie **Allah Le Tout Puissant**, qui m'a permis de réaliser ce travail, et de voir ce jour tant attendu.*

***Nassima***

## ***Dédicace***

*Je dédie ce modeste travail*

*A ma maman chérie, source inépuisable de tendresse de patience et de sacrifice. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un très grand secours tout au long de ma vie. Quoique je puisse dire et écrire je ne pourrais exprimer ma très grande affection et ma profonde reconnaissance. J'espère ne jamais te décevoir ni trahir ta confiance et tes sacrifices,*

*Je t'aime tout simplement ;*

*A mon cher papa sans qui je n'aurais surement pas été je ce que je suis aujourd'hui, je me rends compte que dire merci n'est en aucun cas suffisant. Quoi qu'il en soit ; je dis pourtant merci ;*

*A mon grand frère Sidali , mon pilier ; merci pour ton soutien, ta patience et ta grande générosité ;*

*A mon adorable petite sœur Nouha , qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille, merci pour tout*

*A ma grand-mère Fatma et mes grands-parents Saïd et Tassadit, je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour votre éternel amour .*

*A mes tentes et mes oncles maternels, merci pour votre présence et votre soutien tout au long de cette période ;*

*A mes deux tantes Farida et Fatiha , merci d'être là pour moi, j'apprécie grandement votre générosité, je suis reconnaissante d'avoir toujours pu compter sur vous ;*

*A ma meilleure amie Sarah , je ne te remercierai jamais assez d'avoir toujours été là pour moi dans toutes les étapes de ma vie de m'avoir soutenue ,réconforter, encourager*

*A mes trinômes, Yasmine et Samia , merci pour votre soutien , patience et compréhension sans vous ce travail n'aurait jamais pu être accompli ;*

*A toute ma famille, mes proches, mes amis et à toutes les personnes qui sont chères à mes yeux*

***Nesrine***

## **Remerciements**

*Au terme de ce travail, nous tenons à remercier très sincèrement notre promoteur le **Professeur Marzouk MAMOU**, Responsable de Laboratoire de Chimie Analytique et Chef de Département de Pharmacie de la faculté de Médecine de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, d'avoir suggéré le thème de cette recherche et d'avoir bien voulu nous encadrer, suivre, conseiller et aider durant ce mémoire de fin d'étude.*

*Nous désirons adresser nos remerciements les plus chaleureux à notre Co-promoteur **Dr. ABDENNOURI Abdelhamid** pour sa disponibilité, ses conseils précieux tout au long de ce travail ainsi que pour sa grande patience, nous avons eu la chance de travailler avec vous et de bénéficier de vos connaissances et votre compétence. Sans votre aide et votre orientation ce travail n'aurait pas pu être mené à bien.*

*Nous remercions également **Dr. CHEKROUN Tassadit** résidente en chimie analytique au niveau du CHU Tizi Ouzou/UMMTO pour ces encouragements et son incontestable contribution à l'accomplissement de ce travail.*

*Nous ne manquons pas de remercier le laboratoire **BIOPHARM** de nous avoir fournis gracieusement la matière première, et toute l'équipe du laboratoire de chimie analytique.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury,*

**Dr H.BEN SI SAID, Dr BELAICH**

*Pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre étude et l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'évaluer et examiner notre travail*

# TABLE DES MATIERES

• Table des matières .....	I
• Liste des figures .....	VIII
• Liste des tableaux .....	IX
• Liste des abréviations .....	XI
• Introduction .....	01
• Objectifs .....	03

## PARTIE THEORIQUE

### Chapitre I : Métronidazole

Introduction .....	1
1. Définition.....	4
2. Propriétés physico-chimiques.....	5
2.1 Aspect organoleptique.....	5
3. Propriétés pharmacologique .....	5
3.1 Propriétés pharmacocinétique.....	5
3.1.1 Absorption.....	5
3.1.2 Distribution .....	5
3.1.3 Métabolisme .....	6
3.1.4 Elimination.....	6
3.2. Propriétés pharmacodynamiques et mécanisme d'action .....	6
4. Indications.....	7
5. Effets indésirables.....	8
6. Toxicité.....	8
6.1 Toxicité aigüe.....	8
6.2 Toxicité chronique.....	8
7. Contre indications et situations à risque ou déconseillées :.....	9
8. Interactions médicamenteuses.....	9
9. Suivi thérapeutique pharmacologique .....	9

### Chapitre II: Analyse en milieux biologiques

1. Différents types de milieux biologiques.....	11
1.1 Le sang et les urines .....	11
1.2 Les phanères et autres types de matrices .....	11

2. Méthode d'analyse.....	12
3. Choix de la méthode d'analyse.....	12
4. Les différents modes de prétraitement des échantillons .....	13
4.1. Ultrafiltration et ultracentrifugation.....	13
4.2. Précipitation des protéines.....	13
4.3. L'extraction .....	14
5. HPLC et matrice biologique.....	14

### Chapitre III : Validation des méthodes analytiques

1. Définitions.....	15
2. But de la validation.....	15
3. Procédures analytiques à valider .....	16
4. Aspect réglementaire et normatif.....	16
4.1 Documents ISO 17025.....	16
4.2 Documents ICH.....	16
4.3 Documents de la FDA (guidance of industry) .....	16
4.4 Documents des commissions de la SFSTP .....	16
5. Critères de la validation analytique .....	17
5.1 Spécificité-Sélectivité.....	17
5.2 Exactitude.....	18
5.3. Linéarité .....	18
5.4. Fidélité .....	18
5.6. Sensibilité.....	19
5.7. Limite de détection.....	19
5.8. Limite de quantification.....	20
5.9. Robustesse .....	20
5.10. Stabilité des solutions .....	20
5.11. Carry-over .....	20
5. 12. Intégrité de dilution.....	20
6.Étape de la validation analytique :.....	21
7.Étude statistique de la validation analytique.....	21
7.1 Spécificité /Sélectivité.....	21
7.2 Fonction de réponse .....	24
7.2.1 Protocole.....	24

7.2.2 Etude statistique .....	24
<b>7.3. Alignement des observations.....</b>	<b>25</b>
7.3.1 Protocole .....	25
7.3.2 Etude statistique .....	25
<b>7.4. Prédiction inverses.....</b>	<b>26</b>
<b>7.5. Justesse .....</b>	<b>27</b>
7.5.1. Protocole.....	27
7.5.2. Etude statistique .....	27
<b>7.6. Fidélité .....</b>	<b>27</b>
7.6.1 Protocole .....	27
7.6.2 Etude statistique .....	27
<b>7.7. Linéarité .....</b>	<b>29</b>
7.7.1 Étude statistique .....	29
<b>7.8. Robustesse .....</b>	<b>30</b>
7.8.1. Étapes du test de robustesse .....	30
7.8.2. Étude statistique .....	30
<b>7.9. Carry-Over .....</b>	<b>30</b>
7.9.1. Protocole.....	30
7.9.2. Étude .....	31
<b>7.10. Intégrité de dilution.....</b>	<b>31</b>
7.10.1. Protocole.....	31
7.10.2. Étude statistique.....	31
<b>8. Les différentes approches de la validation analytique .....</b>	<b>31</b>
8.1. Approche descriptive .....	31
8.2. Approche globale.....	32

#### **Chapitre IV : Profil d'exactitude**

<b>1. Concept d'erreur totale .....</b>	<b>35</b>
1.1. Définition .....	35
1.2. Types d'erreurs .....	36
1.3. Calcul de l'erreur totale .....	37
<b>2. Définition du profil d'exactitude.....</b>	<b>37</b>
<b>3. l'intervalle de tolérance .....</b>	<b>39</b>
3.1. Définition de l'intervalle de tolérance .....	39

3.2. Relation entre l'intervalle de tolérance et l'erreur totale .....	40
4. Calcul et construction du profil d'exactitude .....	41
5. Interprétation du profil d'exactitude.....	41
5.1 les limites d'acceptabilité $\pm\lambda$ .....	42
5.2. La proportion $\beta$ .....	42
5.3. Les limites de quantification .....	42
6. Choix de la fonction de réponses .....	43

## **PARTIE PRATIQUE**

1. Matériels et méthodes.....	44
1.1 Matériel .....	44
1.1.1 Matières premières .....	44
1.1.2. Réactifs.....	44
1.1.3 Appareillage et équipements .....	45
1.1.4 Verreries et autres : .....	46
1.2 Méthodes.....	46
1.2.1 Optimisation de la méthode analytique .....	46
1.2.1.1 Choix de l'étalon interne .....	46
1.2.1.2 Etapes de prétraitement .....	46
1.2.1.3 Conditions chromatographiques.....	47
1.2.2 Méthodologie de la validation analytique .....	48
1.2.2.1. Choix des paramètres de validation.....	48
1.2.2.2 Estimation du rendement d'extraction.....	48
1.2.2.3 Choix du protocole de validation .....	48
1.2.2.4 Choix du diluant :.....	49
1.2.3 Préparation des solutions .....	49
1.2.3.1 Diluant .....	49
1.2.3.2 Précipitant .....	49
1.2.3.3 Préparation des solutions standards .....	49
1.2.4 Etude de la robustesse .....	51
1.2.5 Etude de l'intégrité de dilution.....	53
1.2.6 Etude de l'effet carry over.....	53
1.3 Analyse des données brutes.....	54

<b>2. Résultats</b> .....	<b>55</b>
<b>2.1 Estimation du rendement d'extraction</b> .....	<b>55</b>
<b>2.2 Données brutes</b> .....	<b>56</b>
<b>2.3. Spécificité</b> .....	<b>58</b>
<b>2.4. Modèle <math>Y = ax + b</math></b> .....	<b>59</b>
<b>2.4.1 Fonction de réponse</b> .....	<b>59</b>
<b>2.4.2 Alignement des observations</b> .....	<b>60</b>
<b>2.4.3 Prédiction inverses</b> .....	<b>61</b>
<b>2.4.4 Fidélité</b> .....	<b>62</b>
<b>2.4.5 Justesse</b> .....	<b>62</b>
<b>2.4.6 Erreur totale</b> .....	<b>62</b>
<b>2.4.7 Intervalle de tolérance</b> .....	<b>63</b>
<b>2.5 Modèle <math>Y = ax</math></b> .....	<b>64</b>
<b>2.5.1 Fonction de réponse</b> .....	<b>64</b>
<b>2.5.2 Alignement des observations</b> .....	<b>65</b>
<b>2.5.3 Prédiction inverses</b> .....	<b>66</b>
<b>2.5.4 Fidélité</b> .....	<b>66</b>
<b>2.5.5 Justesse</b> .....	<b>67</b>
<b>2.5.6 Erreur totale</b> .....	<b>67</b>
<b>2.5.7 Intervalle de tolérance</b> .....	<b>68</b>
<b>2.5.8 Profil d'exactitude</b> .....	<b>68</b>
<b>2.6. Modèle <math>y = ax + b</math></b> .....	<b>69</b>
<b>2.6.1 Fonction de réponse</b> .....	<b>69</b>
<b>2.6.2 Alignement des observations</b> .....	<b>71</b>
<b>2.6.3 Prédiction inverses</b> .....	<b>72</b>
<b>2.6.4 Fidélité</b> .....	<b>73</b>
<b>2.6.5 Justesse</b> .....	<b>73</b>
<b>2.6.6 Erreur totale</b> .....	<b>74</b>
<b>2.6.7 Intervalle de tolérance</b> .....	<b>74</b>
<b>2.6.8 Profil d'exactitude</b> .....	<b>75</b>
<b>2.7. Modèle <math>\ln y = a \ln x + b</math></b> .....	<b>76</b>
<b>2.7.1 Fonction de réponse</b> .....	<b>76</b>
<b>2.7.2 Alignement des observations</b> .....	<b>78</b>

2.7.3 Prédiction inverses .....	79
2.7.4 Fidélité.....	80
2.7.5 Justesse .....	81
2.7.6 Erreur totale .....	81
2.7.7 Intervalle de tolérance: .....	81
2.7.8 Profil d'exactitude .....	82
2.8 Etude de linéarité .....	83
2.9 Robustesse .....	84
2.10 Etude de l'intégrité de dilution :.....	85
2.11 Etude de l'effet carry over .....	87
3. Discussion : .....	89
3.1. Rendement extraction .....	89
3.2. Sélectivité.....	89
3.3. Fonction de réponse .....	89
3.4. Fidélité .....	90
3.5. Justesse .....	90
3.6. Profil d'exactitude.....	91
3.7. Choix de la fonction de réponse .....	92
3.8. Linéarité .....	93
3.9. Robustesse .....	93
3.10. Intégrité de dilution.....	94
3.11. Carry over .....	94
Conclusion et Recommandations .....	96

### Annexe I: Chromatographie

1. Introduction .....	97
2. Historique .....	97
3. Principe .....	97
4. Appareillage .....	98
4.1 Pompe et gradients d'élution .....	99
4.1.1 Pompe pour éluant.....	99
4.1.2 Le réservoir de la phase mobile.....	99
4.2 Injecteur .....	100
4.3 Colonnes .....	100

4.4 Le détecteur .....	101
4.5 Le dégazeur .....	102
4.6 L'enregistreur .....	102
<b>5. Polarité et chromatographie</b>	
5.1 Phase mobile .....	102
5.2 Phases stationnaires .....	102
5.2.1 Phase stationnaire normale .....	103
5.2.2 Phase stationnaire inversée .....	103
5.3 Polarité des solvants .....	104
<b>6. Spécifications techniques.....</b>	<b>104</b>
<b>7. Avantages.....</b>	<b>104</b>
<b>8. Inconvénients.....</b>	<b>105</b>
<b>9. L'utilisation de l'HPLC en biologie et dans l'industrie pharmaceutique.....</b>	<b>105</b>
<b>10. Renseignements apportés par la réponse instrumentale de l'HPLC .....</b>	<b>106</b>
10.1. Grandeurs de rétention .....	106
10.1.1. Coefficient de partage $K$ .....	106
10.1.3 Le temps mort $t_m$ .....	106
10.1.4 Le volume de rétention $V_r$ .....	106
10.1.5 Le volume mort $V_m$ .....	106
10.1.6 Le facteur de rétention $k'$ .....	107
10.2. Evaluation de l'efficacité d'une colonne .....	107
10.3. La sélectivité .....	108
10.4. La résolution.....	108
10.5. Analyse quantitative.....	108
<b>Annexe II : Chromatogrammes.....</b>	<b>109</b>
<b>Annexe III : Fiche technique.....</b>	<b>117</b>
<b>Annexe IV : Table de Student.....</b>	<b>121</b>
<b>Résumé</b>	

## Liste des figures

Figure 1: Structure chimique du Métronidazole .....	4
Figure 2 Mécanisme d'action du Métronidazole .....	7
Figure 3 Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation .....	23
Figure 4: L'erreur totale pour la validation des méthodes. ....	36
Figure 5: Illustration du profil d'exactitude comme outil de décision .....	38
Figure 6: Profil d'exactitude exprimé par le taux de recouvrement .....	41
Figure 7: Chromatogramme du standard d'étalonnage .....	58
Figure 8: Chromatogramme du standard de validation .....	58
Figure 9: Chromatogramme du placebo .....	59
Figure 10: Courbe d'étalonnage obtenu avec la fonction $y = ax + b$ pour la série 1 .....	59
Figure 11: Courbe d'étalonnage obtenu avec la fonction $y = ax + b$ pour la série 2 .....	60
Figure 12: Courbe d'étalonnage obtenu avec la fonction $y = ax + b$ pour la série 3 .....	60
Figure 13: Profil d'exactitude obtenue avec la fonction $y = ax + b$ .....	64
Figure 14: Courbe d'étalonnage obtenu avec la fonction $y = ax$ pour la série 1 .....	64
Figure 15: Courbe d'étalonnage obtenu avec la fonction $y = ax$ pour la série 2 .....	65
Figure 16: Courbe d'étalonnage obtenu avec la fonction $y = ax$ pour la série 3 .....	65
Figure 17: Profil d'exactitude obtenu avec la fonction $y = ax$ .....	68
Figure 18: Courbe d'étalonnage obtenu avec la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x} + b$ pour la série 1 .....	70
Figure 19: Courbe d'étalonnage obtenu avec la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x} + b$ pour la série 2 .....	71
Figure 20: Courbe d'étalonnage obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x} + b$ pour la série 3 .....	71
Figure 21: Profil d'exactitude obtenu avec la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x} + b$ .....	75
Figure 22: Courbe d'étalonnage obtenue avec la fonction $\ln y = a \ln x + b$ pour la série 1 .....	77
Figure 23: Courbe d'étalonnage obtenue avec la fonction $\ln y = a \ln x + b$ pour la série 2 .....	78
Figure 24: Courbe d'étalonnage obtenue avec la fonction $\ln y = a \ln x + b$ pour la série 3 .....	78
Figure 25: Profil d'exactitude obtenu avec la fonction $\ln y = a \ln x + b$ .....	82
Figure 26: Courbe de linéarité obtenue avec la fonction $y = ax + b$ .....	83
Figure 27: Courbe d'étalonnage pour l'étude de l'intégrité de dilution .....	86
Figure 28: Chromatogramme du niveau de concentration le plus élevé .....	87
Figure 29: Chromatogramme du blanc après injection du niveau de concentration le plus élevé .....	87
Figure 30: Principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC .....	98
Figure 31: Module de l'HPLC .....	99
Figure 32: Modèle d'injection avec une boucle .....	100
Figure 33: Représentation d'une colonne standard et d'une précolonne d'HPLC .....	101
Figure 34: Représentation du gel de silice pour chromatographie .....	103
Figure 35: Représentation du sens d'évolution de la polarité des solvants .....	104

## Liste des tableaux

<b>Tableau I : Tableau représentant le nombre total d'essai à réaliser selon le protocole choisi pour valider la procédure analytique .....</b>	<b>23</b>
<b>Tableau II : Exemple de fonction de réponse .....</b>	<b>25</b>
<b>Tableau III : Règle d'alignement pour différentes fonctions de réponses .....</b>	<b>26</b>
<b>Tableau IV Calcul des prédictions inverse pour différentes fonctions de réponses .....</b>	<b>26</b>
<b>Tableau V: Matières premières utilisées .....</b>	<b>44</b>
<b>Tableau VI : Réactifs utilisés .....</b>	<b>44</b>
<b>Tableau VII : Appareils HPLC SCHIMADZU (LC20) .....</b>	<b>45</b>
<b>Tableau VIII : Autres appareils utilisés .....</b>	<b>45</b>
<b>Tableau IX : Verreries utilisés .....</b>	<b>46</b>
<b>Tableau X: Propriété physico chimique du Métronidazole et du fluconazole (11,55) .....</b>	<b>46</b>
<b>Tableau XI Colonne et conditions chromatographique .....</b>	<b>47</b>
<b>Tableau XII : Tableau présentant le protocole de préparation des solutions de travail .....</b>	<b>49</b>
<b>Tableau XIII : Tableau présentant le protocole de préparation des solutions des standards d'étalonnages .....</b>	<b>50</b>
<b>Tableau XIV: Tableau présentant le protocole de préparations des solutions des standards de validation .....</b>	<b>51</b>
<b>Tableau XV: Plan d'expérience de la robustesse pour le métronidazole.....</b>	<b>51</b>
<b>Tableau XVI: Plan d'expérience de la robustesse pour le fluconazole .....</b>	<b>52</b>
<b>Tableau XVII: Protocole d'étude de l'intégrité de dilutions.....</b>	<b>53</b>
<b>Tableau XVIII: Calcul du pourcentage de rendement d'extraction... Error! Bookmark not defined.</b>	
<b>Tableau XIX: Données brute des standards d'étalonnages .....</b>	<b>56</b>
<b>Tableau XX: Données brutes es standards de validation.....</b>	<b>57</b>
<b>Tableau XXI: Alignement des observations obtenues avec les SV des trois séries .....</b>	<b>61</b>
<b>Tableau XXII: Prédiction inverse obtenus avec les SV des trois séries .....</b>	<b>61</b>
<b>Tableau XXIII: Calcul des écarts type, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire .....</b>	<b>62</b>
<b>Tableau XXIV: Calcul de la justesse pour chaque niveau de concentration des SV .....</b>	<b>62</b>
<b>Tableau XXV: Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des SV.....</b>	<b>63</b>
<b>Tableau XXVI: Calcul de l'intervalle de tolérance .....</b>	<b>63</b>
<b>Tableau XXVII: Alignement des observations obtenus avec les SV des trois séries .....</b>	<b>65</b>
<b>Tableau XXVIII: Prédiction inverse obtenus avec les SV des trois séries.....</b>	<b>66</b>
<b>Tableau XXIX: Calcul des écarts type, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire .....</b>	<b>67</b>
<b>Tableau XXX: Calcul de la justesse pour chaque niveau de concentrations des SV .....</b>	<b>67</b>
<b>Tableau XXXI : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des SV</b>	<b>67</b>
<b>Tableau XXXII: Calcul de l'intervalle de tolérance.....</b>	<b>68</b>

<b>Tableau XXXIII: Résultats obtenus sur la gamme SV pour la réponse <math>\sqrt{y}=a\sqrt{x+b}</math> .....</b>	<b>69</b>
<b>Tableau XXXIV: Résultats obtenus sur la gamme SE pour la réponse <math>\sqrt{y}=a\sqrt{x+b}</math> .....</b>	<b>70</b>
<b>Tableau XXXV: Alignement des observations obtenus avec les SV des trois séries .....</b>	<b>72</b>
<b>Tableau XXXVI: Prédiction inverses obtenus avec les SV des trois séries .....</b>	<b>72</b>
<b>Tableau XXXVII: Calcul des écarts type, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire .....</b>	<b>73</b>
<b>Tableau XXXVIII: Calcul de la justesse pour chaque niveau de concentration des SV..</b>	<b>74</b>
<b>Tableau XXXIX: Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des SV .....</b>	<b>74</b>
<b>Tableau XL: Calcul de l'intervalle de tolérance.....</b>	<b>75</b>
<b>Tableau XLI: Résultats obtenus sur la gamme SV pour la réponse <math>\ln y=a \ln x+b</math> .....</b>	<b>76</b>
<b>Tableau XLII: Résultats obtenus sur la gamme SE pour la réponse <math>\ln y=a \ln x+b</math> .....</b>	<b>77</b>
<b>Tableau XLIII: Alignement des observations obtenus avec les SV des trois séries .....</b>	<b>79</b>
<b>Tableau XLIV: Prédiction inverses obtenus avec les SV des trois séries.....</b>	<b>79</b>
<b>Tableau XLV: Calcul des écarts type, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire .....</b>	<b>80</b>
<b>Tableau XLVI: Calcul de la justesse pour chaque niveau de concentration des SV.....</b>	<b>81</b>
<b>Tableau XLVII: Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des SV</b>	<b>81</b>
<b>Tableau XLVIII: Calcul de l'intervalle de tolérance .....</b>	<b>82</b>
<b>Tableau XLIX : Concentrations prédites en fonction des concentrations introduites pour les trois séries .....</b>	<b>83</b>
<b>Tableau L: Test statistique pour l'étude de la linéarité .....</b>	<b>84</b>
<b>Tableau LI: Etude de la robustesse pour le métronidazole .....</b>	<b>84</b>
<b>Tableau LII: Etude de la robustesse pour le fluconazole .....</b>	<b>84</b>
<b>Tableau LIII: Tableau de l'interprétation de la robustesse du métronidazole et du fluconazole .....</b>	<b>85</b>
<b>Tableau LIV: Résultats des SE .....</b>	<b>85</b>
<b>Tableau LV: Résultats de la dilution à 1/2 .....</b>	<b>86</b>
<b>Tableau LVI: Résultats de la dilution à 1/4 .....</b>	<b>86</b>

## Liste des abréviations

ADN : acide Désoxyribo Nucléique  
ARN : Acide Ribo Nucléique  
BPL : Bonne Pratique de Laboratoire  
CAS : Chemical Abstract Service  
CCM : Chromatographie sur couche mince  
CHU : Centre Hospitalo-Universitaire  
C<sub>max</sub> : Concentration Maximale  
CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse  
CPL : Chromatographie Phase Liquide  
CTS : Centre de Transfusion sanguine  
CV : Coefficient de variation  
ELSD : Evaporative Light Scattering Detector  
EPA : Environmental Protection Agency (Agence de Protection de l'Environnement)  
ET : Erreur Totale  
ETA : Erreur Total Acceptable  
FDA: Food and Drug Administration  
FTIR : Spectroscopie infra rouge a transformée de Fourier  
HCL : Acide chlorhydrique  
HPLC: Chromatographie Liquide Haute Performance  
ICH: International Conference on Harmonization (Conférence internationale sur l'harmonisation)  
ISO: International Organization For Standardization(Organisation internationale de standardisation)  
IV : intraveineux  
LD: Limite de Détection  
LIQ L : Limite inferieur de quantification Lower  
LIT L : Limite inferieur de tolérance Lower  
LQ: Limite de Quantification  
LSQ U : Limite supérieur de quantification Uper  
LST U : Limite supérieur de tolérance Uper  
MTZ : Métronidazole  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PM : Phase Mobile  
SE : Standard d'Étalonnage  
SFSTP : Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques  
SNC : Système Nerveux Central  
STP : Suivi thérapeutique pharmacologique  
SV : Standard de Validation  
TCA : Acide trichloroacétique  
UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography

# **Introduction**

### Introduction

Les médicaments sont des substances chimiques ou naturelles, utilisés pour le traitement ou la prévention des maladies. Chaque médicament renferme plusieurs composants dont, les principes actifs responsables de l'effet thérapeutique (1), qui n'est obtenu que lorsque la concentration plasmatique du principe actif se situe dans une zone thérapeutique bien définie. En d'autres termes, des concentrations du principe actif se situant en dehors de la marge thérapeutique peuvent entraîner un échec thérapeutique pour des concentrations inférieures à la marge ou, une toxicité ou des effets indésirables importants pour des concentrations supérieures à la marge(2).

De nombreux médicaments sont utilisés sans que leurs concentrations sanguines soient surveillées, le plus souvent, parce que celles-ci peuvent varier de façon importante sans affecter l'effet clinique attendu. Cependant, pour un groupe restreint de substances, qui nécessitent un suivi thérapeutique pharmacologique précis, l'absence de contrôle n'est pas sans conséquence(3).

Pour certaines classes médicamenteuses, il est en effet nécessaire d'effectuer un suivi thérapeutique pharmacologique afin d'assurer que la concentration du principe actif dans le sang ou le plasma soit situer dans la zone thérapeutique définie. Parmi ces classes médicamenteuses nous retrouvons la classe des antibiotiques (4).

Le métronidazole est un antiparasitaire et un antibiotique de la famille des nitroimidazoles, il fait partie de la liste des médicaments essentiels de l'OMS, et, est souvent prescrit pour le traitement de plusieurs types d'infections, bactériennes et parasitaires. Il est bien toléré par la majorité des patients, à l'exception de certaines catégories de malades, pour lesquelles un suivi thérapeutique est préconisé (5).

Le recours à un suivi thérapeutique pharmacologique d'un médicament par dosage sanguin nécessite de nombreuses connaissances, principalement dans le domaine analytique. En effet chacune des méthodes de dosages utilisées devra faire l'objet d'une validation au préalable(6).

La validation n'étant pas uniquement une exigence des autorités réglementaires (ICH) ou un moyen d'accéder à l'accréditation (ISO 17025), elle est aussi la phase ultime avant l'utilisation de toutes les méthodes en routine. La validation de la méthode analytique doit apporter la confiance pour les laboratoires dans les résultats qui seront trouvés et qui sont

## Introduction

utilisés pour prendre des décisions critiques, l'objectif d'une méthode analytique quantitative est de quantifier la valeur de l'échantillon avec une exactitude connue et acceptable (7).

La validation peut se faire selon plusieurs approches. L'approche descriptive examine deux critères statistiques inhérents à la performance de la méthode analytique qui sont mesurés séparément : le biais ou « justesse » et la précision de la méthode. Cette approche suppose que si la méthode est bonne, alors les mesures qu'elle fournit seront aussi bonnes (7).

L'approche globale combine les erreurs systématiques et aléatoires dans le concept d'erreur totale définie par l'ISO 5725. La SFSTP en s'appuyant sur ce concept, a proposé une démarche harmonisée avec comme outil de décision le profil d'exactitude. Ce dernier intègre de façon statistiquement correcte, l'ensemble des éléments essentiels de la validation, à savoir le biais, la fidélité, et les limites de quantification, il est aussi applicable pour les dosages pharmaceutiques et biologiques(8).

Le présent travail a pour but de valider une méthode de dosage du métronidazole dans le plasma par Chromatographie Liquide à Haute Performance HPLC en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision de validation ; démarche harmonisée proposée par une commission SFSTP publiée en 2006 dans la revue pharmaceutique STP Pharma Pratique.

Afin de répondre à notre problématique qui est de développer une méthode pour le suivi des concentrations plasmatiques du métronidazole chez les sujets à risque par HPLC en utilisant comme outil de validation l'approche erreur totale, notre manuscrit s'articule en deux (02) parties, la première partie, théorique ou revue de littérature, est subdivisée en quatre (04) chapitres :

- Chapitre I : Métronidazole ;
- Chapitre II : Analyse en milieux biologiques ;
- Chapitre III : Validation analytique ;
- Chapitre IV : profil d'exactitude.

La seconde partie de ce travail est consacrée à la partie expérimentale. Nous présenterons d'abord le matériel et les méthodes utilisées avant d'exposer les résultats et leurs discussions. Suivie d'une conclusion qui fera la synthèse sur la validité de la méthode de dosage du métronidazole dans le plasma par HPLC.

# Objectifs

## Objectifs

L'objectif principal de notre étude est de mettre au point et de valider une méthode de dosage du Métronidazole dans le plasma par HPLC pour le suivi thérapeutique, en utilisant comme outil de décision le profil d'exactitude, qui repose sur l'estimation de l'erreur totale.

Outre cet objectif principal, les objectifs secondaires de ce travail sont :

- Établir un protocole de validation, en prenant en compte les caractéristiques du principe actif utilisé, de l'étalon interne et de la matrice ;
- Maitrise des différents outils statistiques utilisés en validation des méthodes analytiques ;
- Réalisation et interprétation d'un profil d'exactitude.

# **PARTIE THEORIQUE**

# **Chapitre I**

## **Métronidazole**

## 1. Définition

Le Métronidazole (**1-[2-hydroxyéthyl] -2-méthyl-5-nitroimidazole**) est un antibiotique antibactérien antiparasitaire appartenant à la famille des nitro-5- imidazolés (MTZ). Il est actif contre une variété de bactéries anaérobies, ainsi que contre les bactéries microaérophiles (9).

Le MTZ est également efficace dans le traitement de nombreuses maladies parasitaires, notamment la trichomonose, l'amibiase, la giardiase, la schistosomiase et la strongyloïdose (10).

C'est un médicament largement utilisé en raison de sa tolérance, de sa biodisponibilité orale élevée et de sa capacité à bien pénétrer dans les tissus, y compris dans le système nerveux central (9).

- **Nom propre** : Métronidazole
- **Formule développée** :

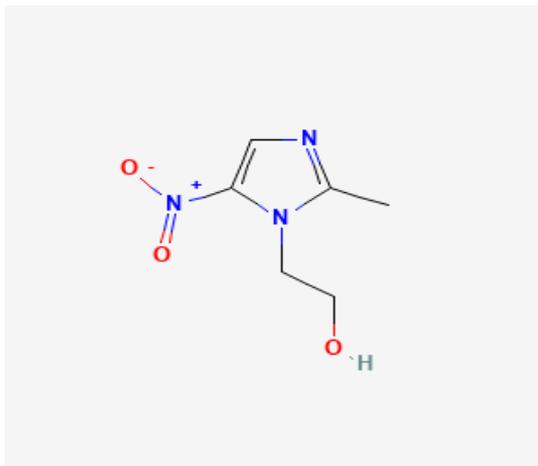


Figure 1: Structure chimique du Métronidazole(11).

- **Formule brute** :  $C_6H_9N_3O_3$
- **Masse molaire** : 171,16 g/mol
- **Classe thérapeutique** : Antibiotique
- **pKa** : 2.57
- **T° fusion** : de 157 à 160 °C
- **Numéro CAS** : 443-48-1
- **Médicaments contenant du Métronidazole** : Flagyl®, Metrolag, Rozagel, Périlox, Collazole(11).

## 2. Propriétés physico-chimiques

### 2.1 Aspect organoleptique

Poudre cristalline blanche légèrement jaunâtre (12).

### 2.2 Solubilité

Légèrement soluble dans l'eau, soluble dans l'alcool, le chloroforme et l'éther (12).

## 3. Propriétés pharmacologique

### 3.1 Propriétés pharmacocinétique

#### 3.1.1 Absorption

Le métronidazole oral est rapidement et presque totalement absorbé, avec une biodisponibilité proche de 100 %. L'administration du métronidazole oral avec de la nourriture est encouragée pour minimiser les effets indésirables gastro-intestinaux et n'affecte pas l'absorption et la biodisponibilité mais peut retarder le moment où les concentrations sériques maximales sont atteintes. Les concentrations sériques maximales (C<sub>max</sub>) varient autour de 13 µg/ml et surviennent 1 à 2 heures après l'administration orale de 500 mg.

À la posologie de 500 mg administrés trois fois par jour par voie i.v, l'état d'équilibre est atteint après environ trois jours. Les moyennes des concentrations maximales et minimales établies à ce moment-là étaient respectivement de 26 et de 12 mg/L.

. Lorsqu'il est administré par voie rectale, le métronidazole est également bien absorbé avec une biodisponibilité rapportée de 59 % à 94 %. La C<sub>max</sub> est atteinte environ 3 heures après l'administration rectale.

Le métronidazole topique et vaginal atteint des concentrations systémiques détectables avec une biodisponibilité allant de 2 % à 25% (12, 14).

#### 3.1.2 Distribution

Le métronidazole est une molécule lipophile qui se lie peu aux protéines et dont le volume de distribution est modéré à important (0,55 l/kg), ce qui permet une distribution étendue dans divers tissus. Moins de 20 % du métronidazole en circulation se fixe aux protéines plasmatiques. La pénétration dans le liquide céphalorachidien enflammé, le liquide de revêtement épithélial, la salive et la bile est excellente et les concentrations sont similaires à celles du sérum. De plus, la pénétration dans les abcès, les tissus de l'appendice, le liquide péritonéal et les tissus pancréatiques est très bonne, allant de 2,3 à 7,2 µg/ml. Le métronidazole traverse la barrière placentaire et pénètre dans le lait maternel et peut être tératogène au cours du premier trimestre (13,14).

### 3.1.3 Métabolisme

Le métronidazole est métabolisé dans le foie par hydroxylation, oxydation et glucuronidation. Le principe actif est le métabolite hydroxylé.

La bioactivité du métabolite hydroxylé varie de 30 à 65 % celle de la molécule mère, de plus il a une demi-vie d'élimination plus importante, de 06 à 10 heures.

Sont détectés dans les urines, le métronidazole sous forme inaltéré, ainsi qu'une variété de résidus. Issue principalement de l'oxydation des chaînes latérales. Les molécules conduisant à des dérivés oxydatifs sont les composés de l'acide hydroxy et de l'acide acétique. Le métronidazole ainsi que son métabolite hydroxylé exercent une action antimicrobienne in vitro contre de nombreux pathogènes bactériens anaérobies (15).

### 3.1.4 Elimination

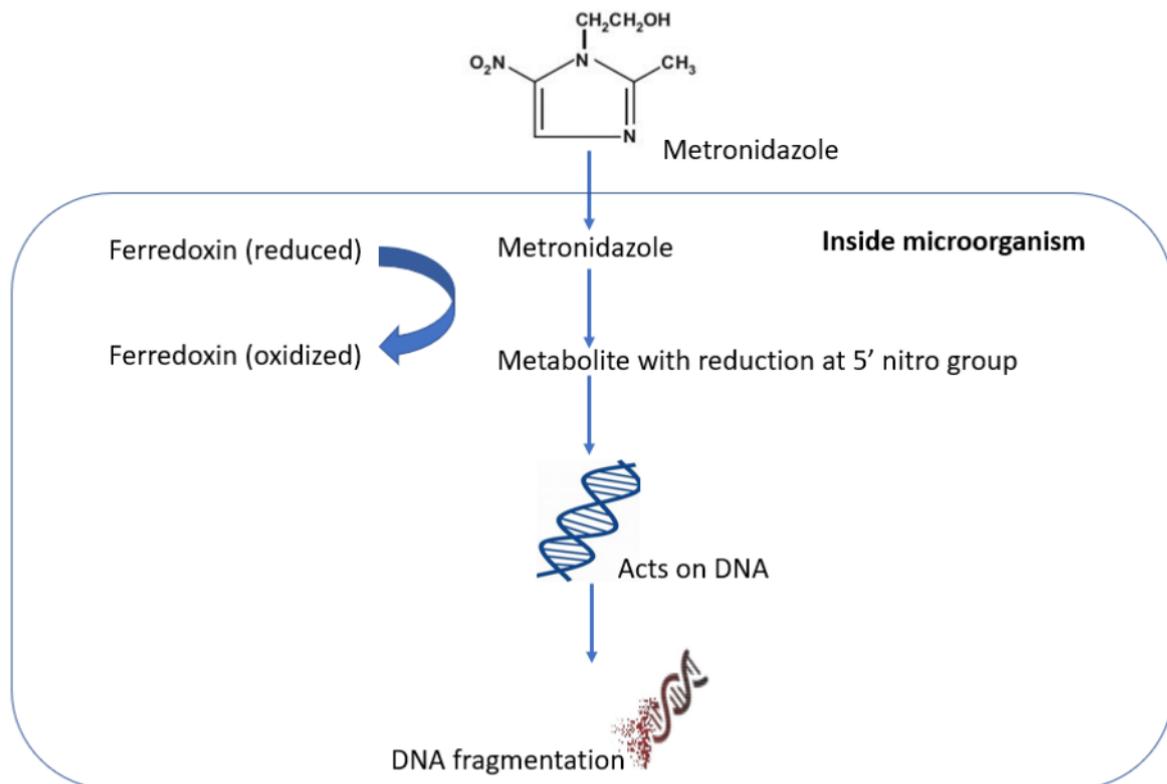
Seulement 12 % du métronidazole est excrété sous forme inchangée, 60 à 80% du métronidazole, ainsi que ses dérivés, sont éliminés dans les urines, et seulement 6 à 15 % dans les selles.

La demi-vie d'élimination du métronidazole est estimée à 8 heures dans les cas équilibrés. En revanche, chez les enfants, la  $\frac{1}{2}$  vie biologique est de 23 heures pendant leurs deux premiers mois, et dans le cas des enfants prématurés, elle peut atteindre une centaine d'heures. La clairance rénale du métronidazole est supposée être de 10mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (15).

## 3.2. Propriétés pharmacodynamiques et mécanisme d'action

Le mécanisme d'action du métronidazole n'a pas été entièrement élucidé. Il est toute fois identique à celui des nitroimidazolés qui partagent une structure hétérocyclique constituée d'un noyau imidazole avec un groupement nitro (NO<sub>2</sub>) en position 5. La réduction de son groupe nitro par les organismes anaérobies semble être responsable de ses effets cytotoxiques et antimicrobiens. Le métronidazole traverse la membrane de la cellule cible par diffusion passive, son groupe nitro est ensuite réduit en radical nitroso, de courte durée et cytotoxique, par la ferrédoxine ou la flavodoxine qui sont eux même réduites par le pyruvate ferrédoxine oxydoréductase, ce processus ne se produit que dans des conditions fortement réductrices. Les produits de réduction interagissent ensuite avec l'ADN formant des adduits d'ADN ou entraînant des cassures simples et doubles brins, le complexe résultant ne peut plus fonctionner comme une amorce efficace pour les ADN et ARN polymérase. Bloquant de ce fait la transcription et la réplication de l'ADN et provoquent la mort cellulaire ( résultat du manque de protéines de transport d'électrons nécessaires qui sont la ferrédoxine et la flavodoxine chez les bactéries aérobies) , le MTZ n'est actif que sur les bactéries

anaérobies qui sont pourvus de celles-ci expliquant de ce fait sa sélectivité pour ce type de bactéries (9)(16).



**Figure 2 Mécanisme d'action du Métroimidazole(15).**

#### 4. Indications

Le métronidazole est indiqué dans le traitement des trichomonas confirmés, causés par *Trichomonas vaginalis* (sauf pendant le premier trimestre de la grossesse), de la vaginose bactérienne, de certains types d'amibiase et de diverses infections anaérobies (17)

Le métronidazole est prescrit en première intention pour le traitement des infections intestinales à *Clustidium difficile* ainsi que les infections à trichomonas et les amibiases (18).

Il est aussi utilisé en association avec d'autres antibiotiques, la cefazoline, en prévention de certaines infections intestinales, ainsi que la céfotaxime pour le traitement des péritonites, abcès péritonéaux, et fasciites nécrosantes (18).

Le métronidazole est aussi utilisé en seconde intention et en association avec la ciprofloxacine pour le traitement des péritonites et abcès péritonéaux modérés à sévères (18).

Il est également utilisé dans le traitement de la maladie de Crohn et de la rosacée, comme agent prophylactique après une intervention chirurgicale et dans le traitement des infections à *Helicobacter pylori* (19).

### 5. Effets indésirables

Les effets indésirables parfois observés avec le métronidazole sont : nausées, vomissements, mal d'estomac, perte d'appétit, sécheresse de la bouche, goût métallique, coloration brune des urines.

- Le métronidazole peut aussi causer : maux de tête, étourdissements, somnolence, confusion.
- Ce médicament peut rarement causer : des hallucinations, des convulsions et une sensation de picotement ou d'engourdissement dans les mains, les jambes et les pieds (neuropathie périphérique).
- Dans de rares cas, une réaction allergique accompagnée d'une rougeur (éruption) sur la peau, d'urticaire ou de fièvre peut survenir.
- Le métronidazole peut causer une neutropénie ainsi qu'une augmentation des enzymes hépatique, mais très rarement une hépatotoxicité (17,20).

### 6. Toxicité

#### 6.1 Toxicité aiguë

Des doses orales uniques de métronidazole, à hauteur de 12 g, ont été rapportées dans des surdoses accidentelles. Les seuls symptômes étaient les vomissements, l'ataxie et une légère perte du sens de l'orientation. Des effets neurotoxiques, notamment des convulsions et une neuropathie périphérique, ont été signalés après 5 à 7 jours d'un traitement oral administré à raison de 6 à 10,4 g tous les deux jours(12).

Il n'existe pas d'antidote spécifique. Un traitement symptomatique et de soutien doit être employé en plus d'un lavage gastrique ou l'administration de charbon actif pour éliminer une quantité importante du médicament non absorbé du tractus gastro-intestinal(17).

La DL50 orale du métronidazole chez le rat est de 5000 mg/kg(15).

#### 6.2 Toxicité chronique

-La neurotoxicité du MTZ même si elle est rare est rapportée chez l'homme depuis les années 80 avec une atteinte des nerfs périphériques, du nerf optique, des encéphalopathies, des atteintes de l'oreille interne et du cervelet. L'utilisation des doses supérieures à 40g/jour sont à risque (21).

-Le métronidazole figure donc sur la liste des agents cancérigènes possibles de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (22).

- La mutagénicité du métronidazole a été mise en évidence dans certains systèmes bactériens. Un effet mutagène serait théoriquement possible chez les patients présentant un défaut de réparation de l'ADN.

-Malgré des tests d'embryotoxicité et de tératogénicité négatifs, il est toujours sage d'éviter le métronidazole pendant le premier trimestre de la grossesse (10).

### 7. Contre indicationset situations à risque ou déconseillées :

Le métronidazole est contre-indiqué chez les sujets ayant déjà manifesté une hypersensibilité au métronidazole ou à d'autres dérivés du nitroimidazole.

Le métronidazole ne doit pas être administré aux patients présentant des troubles neurologiques actifs ou des antécédents de dyscrasie sanguine, d'hypothyroïdie ou d'insuffisance surrénalienne. Des troubles neurologiques graves (épisodes convulsifs ou neuropathie périphérique) ont été rapportés chez certains patients traités par le métronidazole. De telles réactions n'ont été observées que très rarement (21).

### 8. Interactions médicamenteuses

-La prise d'**alcool** ou de **disulfirame** chez les patients sous métronidazole peut provoquer un effet antabuse.

-L'association du métronidazole avec les **antibiotiques** entraîne une augmentation de leurs concentrations plasmatiques. Avec la **gentamicine** il y a une potentialisation de l'ototoxicité, avec les **céphalosporines** à forte doses risque d'encéphalopathie.

-Il a été signalé que le métronidazole potentialise l'effet anticoagulant de la **warfarine**, ce qui entraîne une prolongation du temps de prothrombine.

-Le métronidazole augmente la toxicité de la **Carbamazépine** et de la **phénytoïne**.

-On signale que l'emploi du métronidazole réduit la clairance du **5-fluorouracile** et du **lithium** augmentant la toxicité de ces derniers.

-Dans certain cas, le métronidazole entraîne un risque de surdosage avec la **ciclosporine** et **tacrolimus** en augmentant leurs concentrations plasmatiques (deux fois la normal) (10,12).

### 9. Suivi thérapeutique pharmacologique

Le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) est l'activité qui consiste à adapter la posologie d'un médicament pour que sa concentration dans le sang ou le plasma soit située dans une zone considérée comme cible. Cette zone cible représente une plage de

concentration correspondant à la plus forte probabilité d'efficacité associée à la plus faible probabilité possible d'effets indésirables.

La détermination de ces concentrations cibles repose sur la connaissance des relations concentration/effet ou pharmacocinétique/pharmacodynamie (PK/PD) des molécules (4).

L'objectif du suivi thérapeutique pharmacologique des antibiotiques est d'optimiser l'utilisation du médicament. Il peut augmenter la probabilité de succès thérapeutique, prévenir la survenue d'une toxicité reliée à une concentration excessive. ou encore prévenir l'émergence de résistances (2).

Une adaptation posologique du métronidazole est recommandée chez les insuffisants rénaux en fonction du degré d'altération de la fonction rénale et cela par réduction des doses d'entretien par rapport aux doses de charges (23).

Chez les insuffisants hépatiques sous métronidazole une augmentation de la demi-vie d'élimination et une diminution de la clairance hépatique sont observées, ce qui entraîne une accumulation de métronidazole et de ses métabolites (24). En conséquence, des doses inférieures à celles habituellement recommandées doivent être administrées et avec prudence.

Des simulations pharmacocinétiques indiquent que la posologie du métronidazole dans le traitement de l'amibiase doit être réduite de 50 % et que l'intervalle posologique pour le traitement des trichomonase doit être augmenté, passant d'une fois toutes les 12 heures à une fois toutes les 24 heures, chez les patients atteints d'insuffisance hépatique (23). Par conséquent, une surveillance étroite des taux sanguins métronidazole et de l'apparition de signes de toxicité chez les patients est nécessaire (25).

Une attention particulière doit également être accordée au traitement des patients âgés, car la pharmacocinétique du métronidazole peut être altérée. Chez les patients gériatriques, un suivi thérapeutique pharmacologique du métronidazole est recommandé (26).

# **Chapitre II**

## **Analyse en milieux biologiques**

Au cours des études de pharmacocinétique, en toxicologie clinique ou dans le cadre du suivi thérapeutique, il est nécessaire de quantifier les médicaments et leurs métabolites éventuels dans des milieux biologiques complexes. Ces matrices contiennent une multitude de substances endogènes (protéines dans le plasma ou acides gras dans les urines) en quantités bien supérieures à celles des composés et de leurs métabolites à quantifier. Nombreux sont les composés endogènes présentant des groupements fonctionnels réactifs pouvant interférer avec l'analyse chromatographique des composés d'intérêt. Le prétraitement des échantillons est donc une étape fondamentale pour ce type d'analyse (27).

### 1. Différents types de milieux biologiques

Les matrices biologiques sont des milieux très variés et très complexes (sang, urines, liquide gastrique, viscères, cheveux. ...). Plus la matrice est complexe, plus il y aura de molécules interférentes. Elles sont d'origine endogène ou exogène, organique ou minérale (protéines, lipides, phospholipides, acides biliaires, ions ou autres médicaments)(28).

#### 1.1 Le sang et les urines

Pour des raisons évidentes de praticabilité, d'intégrité et de standardisation, les prélèvements sanguins et urinaires représentent la majorité des analyses. Pour s'assurer de la qualité du prélèvement sanguin, différentes règles sont à respecter. Il existe un risque réel de contamination lors du prélèvement. Il est donc nécessaire de prendre des précautions particulières lors la désinfection cutanée, lors de l'utilisation du matériel de prélèvement et lors du choix des types de tubes de prélèvements.

Pour les urines, des flacons en polystyrène transparent munis d'un bouchon à vis en polypropylène sont généralement utilisés. En raison des variations nyctémérales, il est parfois recommandé de recueillir les urines sur 24 heures.

Il est souvent utile de rappeler qu'une mauvaise conservation peut modifier la composition du milieu et donc l'interprétation d'un résultat (29).

#### 1.2 Les phanères et autres types de matrices

Le liquide céphalorachidien représente un milieu liquide aisément accessible en contact étroit avec le tissu nerveux. Il reste peu utilisé vu le prélèvement invasif.

La salive et la sueur représentent des milieux facilement accessibles, relativement peu étudiés et limités à quelques études. En général, le protocole de recueil est simple et rapide.

Par rapport aux autres types de prélèvements biologiques, les cheveux présentent des avantages indiscutables parmi lesquels peuvent être cités les facilités de recueil, de stockage et de conservation.

Les ongles constituent également une matrice intéressante surtout pour le suivi des métaux et métalloïdes.

Les os peuvent être analysés ainsi que les dents (29).

### 2. Méthode d'analyse

Les méthodes les plus couramment utilisées sont la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et en phase liquide (HPLC) avec détection par spectrométrie de masse (SM). Mais en raison du caractère non volatil de la plupart des médicaments, l'analyse par CPG nécessite une dérivation préalable du composé. Par contre, l'HPLC est particulièrement bien adaptée à l'analyse des substances non volatiles et à leurs métabolites plus polaires(27).

### 3. Choix de la méthode d'analyse

Le choix de la méthode d'analyse et surtout le prétraitement de l'échantillon biologique sont des étapes clés qui précèdent le dosage proprement dit. En effet, les matrices biologiques contiennent une multitude de composés endogènes souvent en concentrations bien plus fortes que les analytes ou leurs métabolites qui peuvent interférer avec les composés à doser. Le développement d'une méthode de dosage comprendra :

- Le choix du solvant dans lequel l'analyte sera solubilisé et stabilisé. Il faudra vérifier le risque d'interaction contenant/analyte.
- Le choix de la matrice. La méthode devra être validée dans chaque matrice dans laquelle le composé sera dosé. Il faudra ensuite s'assurer que les prélèvements soient conservés dans de bonnes conditions. De même, il faudra s'assurer que l'anticoagulant choisi n'a pas d'influence sur les performances de la méthode analytique utilisée pour quantifier le composé.
- Le choix de l'étalon interne. Généralement, l'étalon interne est un composé de même série chimique que l'analyte. L'étalon interne doit s'extraire dans les mêmes conditions et doit avoir un temps de rétention différent de l'analyte.
- Le choix des conditions de pré-traitement de l'échantillon à partir de la matrice choisie. Il peut s'agir d'extractions solide-liquide, liquide-liquide ou d'une simple précipitation.
- Le choix du système d'analyse CLHP ou CPG.

- Le choix du système de détection (SM, UV, fluorescence...) et du temps d'analyse (30).

### 4. Les différents modes de prétraitement des échantillons

Les éléments importants à considérer lors de la mise au point du traitement d'un échantillon biologique sont :

- les propriétés physico-chimiques de l'analyte,
- la nature de la matrice,
- le recueil de l'échantillon avant l'étape de pré-traitement,
- la stabilité de l'analyte pendant les différentes étapes du pré-traitement,
- le solvant utilisé lors de l'étape finale, qui doit être compatible avec le système chromatographique utilisé,
- le rendement de l'extraction qui doit être le plus élevé et reproductible possible,
- enfin la reproductibilité, la justesse et l'exactitude de ce traitement (27).

#### 4.1. Ultrafiltration et ultracentrifugation

L'ultrafiltration permet une élimination des protéines par filtration du plasma à travers une membrane semi-perméable. Un certain nombre de kits sont commercialisés à cet usage. Seules les petites molécules passent, les protéines sont retenues à la surface du filtre. D'emploi simple et rapide, ils permettent d'éliminer 99 % des protéines.

La séparation des composés libres peut également être réalisée par ultracentrifugation. Le plasma est centrifugé à grande vitesse (100 000 g, 24 h). Cela permet d'obtenir les protéines et la forme liée de la molécule dans le culot et un surnageant contenant la forme libre (27).

#### 4.2. Précipitation des protéines

La précipitation des protéines peut être obtenue par modification de la force ionique par utilisation d'une solution saline saturée de sulfate d'ammonium, du pH par ajout en petite quantité d'une solution d'acides forts : acide perchlorique ou trichloracétique essentiellement, ou ajout d'une solution basique toujours en faible volume : sulfate de zinc/hydroxyde de sodium ou sulfate de zinc/hydroxyde de baryum, ou de la constante diélectrique en ajoutant d'acétonitrile, méthanol, éthanol ou acétone. Cette méthode présente de nombreux avantages qui sont sa rapidité, sa simplicité et son utilisation pour l'analyse de molécules très hydrosolubles et donc difficilement extractibles. Elle est particulièrement bien adaptée au suivi thérapeutique et à la toxicologie (27).

### 4.3. L'extraction

L'extraction consiste à extraire en une seule étape le maximum de soluté initialement présent dans la matrice en utilisant un solvant, il sera choisi en fonction de son pouvoir dissolvant vis-à-vis du soluté. En pratique, la matrice et le solvant sont mis en contact dans un tube, puis une agitation énergique est pratiquée pendant un temps nécessaire à l'établissement d'un équilibre de concentration entre les deux phases. L'agitation peut être manuelle ou aidée d'un vortex ou mécanique (portoir rotatif). Dans une matrice biologique, l'extraction idéale du médicament sera réalisée grâce à un solvant organique qui permettra d'extraire que le soluté et de laisser dans la matrice toutes les autres substances(28).

### 5. HPLC et matrice biologique

Les techniques de chromatographie liquide haute performance HPLC sont devenues un outil analytique puissant. Ces techniques sont sensibles et spécifiques et permettent l'analyse de traces dans des mélanges complexes. Le but du prétraitement des échantillons biologiques est l'élimination des composés endogènes de la matrice qui peuvent soit interférer avec les composés à doser soit être à l'origine d'effet matrice, défini comme, l'effet de substances résiduelles de la matrice, sur le dosage de l'analyte d'intérêt.

L'élimination des composants endogènes dus à la matrice est particulièrement importante car ces derniers provoquent une détérioration rapide des performances de la colonne analytique (baisse du nombre de plateaux théoriques, perte de sélectivité, élargissement des pics) et du détecteur (saturation, augmentation du bruit de fond). En effet, ces composés peuvent s'adsorber irréversiblement sur la phase stationnaire comme les lipides (perte de sélectivité) ou précipiter dans la colonne comme les protéines (augmentation de la pression en tête de colonne). L'utilisation de pré-colonnes placées juste avant la colonne analytique permet de limiter partiellement ces problèmes (24,27).

# **Chapitre III Validation des méthodes analytiques**

La validation d'une méthode d'analyse est le processus par lequel il est établi, par la réalisation d'études de laboratoire, que les caractéristiques de performance de la méthode répondent aux exigences des applications analytiques prévues. La validation est donc une étape importante dans la détermination de la fiabilité et de la reproductibilité de la méthode analytique, car elle permet de confirmer que la méthode prévue est adaptée à un système particulier(31).

La nécessité de la validation dans les laboratoires d'analyse découle des réglementations telles que les Bonnes Pratiques de laboratoire (BPL). D'autres exigences réglementaires se trouvent dans les normes de qualité et d'accréditation telles que la série 9000 de l'Organisation internationale de normalisation (ISO), la norme ISO 17025, la norme européenne EN 45001, la pharmacopée américaine (USP), la Food and Drug Administration (FDA) et l'Agence de protection de l'environnement (EPA). La fiabilité des données analytiques dépend essentiellement de trois facteurs, à savoir la fiabilité des instruments, la validité des méthodes et la formation adéquate des analystes(32).

### 1. Définitions

- ISO / CEI 17025 définit la validation comme « La confirmation par examen et la fourniture de preuves objectives que les exigences particulières pour l'usage spécifique prévu sont remplies » (33).
- La FDA la définit comme étant «la collection et l'évaluation de données, de l'étape de conception du procédé jusqu'à l'étape de production, qui établit la preuve scientifique que le procédé est capable de délivrer des produits de qualité »(34).
- L'ICH 2QA\_ « L'objectif de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle est appropriée à l'usage auquel elle est destinée »(35).
- Agence Européenne des Médicaments« La validation du procédé de fabrication correspond à l'assurance et la preuve documentée qu'un procédé est capable de produire de manière reproductible un produit fini de qualité requise »(36).

### 2. But de la validation

- Donner aux laboratoires et aux autorités des garanties suffisantes que chacune de ces mesures qui seront réalisés en routines avec cette méthode sera suffisamment proche de la « vraie valeur » inconnu de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable.
- Minimiser le risque associé à l'utilisation de la méthode analytique validée tant au niveau de producteur que du nouveau consommateur(31).

### 3. Procédures analytiques à valider

Les méthodes doivent être validées ou revalidées

- Avant leur utilisation en routine ;
- Chaque fois que les conditions pour lesquelles la méthode a été validée changent ;
- Pour démontrer l'équivalence entre deux méthodes (par exemple, une nouvelle méthode et une méthode standard) ;
- Les monographies de la pharmacopée européenne doivent être considérées comme validées, leurs conditions d'application peuvent faire l'objet si besoin d'une étude de validation(31).

### 4. Aspect réglementaire et normatif

Les procédures de validations analytiques sont décrites dans principaux référentiels suivants :

#### 4.1 Documents ISO 17025

Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais ;ISO 5725 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure.

#### 4.2 Documents ICH

- ICH Q2A: text on validation of analytical procedures “definitions and terminology”1995.
- ICH Q2B: text on validation of analytical procedures “methodology”1997.
- ICH Q2(R1): validation of analytical procedures text and methodology (2005).
- ICH M 10: BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION.

#### 4.3 Documents de la FDA (guidance of industry)

- Validation of chromatographic methods. FDA – November 1994.
- Validation of Bioanalytical Method (2001).
- Analytical Procedures and Methods Validation. Guidance for Industry (Draftguidance). July 2015.
- Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. GuidanceFor Industry July 2015.

#### 4.4 Documents des commissions de la SFSTP

- SFSTP « guide de validation, rapport d'une commission SFSTP »
- Méthodologie (1992).
- Exemples d'application (1992).

- SFSTP « dosage dans les milieux biologiques par des méthodes chromatographiques »(1997).
- SFSTP « 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
    - + Parus dans Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis en 2008
- SFSTP « analyse des performances d'une méthode analytique Evaluation des risques lors d'une utilisation en routine » (2011).

### 5. Critères de la validation analytique

Un ensemble de critères de validation sont couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse et dont la nécessité de l'étude a fait l'objet d'un large consensus.

Selon le tableau 3 du guide de la validation de la SFSTP (démarche harmonisée), les critères de la validation sont définis comme(38):

#### 5.1 Spécificité-Sélectivité

Une procédure d'analyse est dite « spécifique » lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser ou qu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physicochimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substance(s) dans l'échantillon.

Très souvent, la spécificité/sélectivité se fonde sur une absence d'interférences. Elle peut être démontrée par différents moyens. C'est ainsi qu'elle peut être inhérente à la technique (par exemple : identification par spectrométrie infrarouge ou spectrométrie de masse), elle peut être obtenue par séparation préalable (par exemple : chromatographie)(38).

- Selon l'ICH M10 : La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Ces dernières peuvent inclure des impuretés, des produits de dégradation, la matrice, etc.

Si une méthode d'analyse est insuffisamment spécifique, cette déficience peut être compensée par la spécificité de l'une ou de plusieurs des autres analyses complémentaires.

Cette définition renvoie à plusieurs aspects :

- Identification : Il s'agit de vérifier l'identité de la substance analysée.

- Pureté : Il s'agit de vérifier si les analyses permettent de déterminer avec exactitude la teneur en impuretés de la substance analysée (recherche des substances apparentées, métaux lourds, résidus de solvants, etc.)
  - Dosage : Il s'agit d'obtenir un résultat indiquant exactement la concentration ou l'activité de la substance analysée (teneur).
- Selon ISO 17025: 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 composés(39).

### 5.2 Exactitude

- Selon l'ICH M10: « L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention. L'exactitude est confondue avec la justesse »(40).
- Selon la norme ISO17025 : 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(33).

### 5.3. Linéarité

- Selon l'ICH M 10: « La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité de donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon »(40).
- Selon la norme ISO17025 : « Capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans l'échantillon pour laboratoire »(33).

### 5.4. Fidélité

-Selon la norme ISO 17025 et L'ICH M10 : Correspond au degré d'accord (degré de dispersion) entre les résultats des mesures obtenues par l'analyse individuelle de plusieurs prélèvements à partir d'un même échantillon homogène, prélevés dans des conditions prescrites.

- **Répétabilité**

-Selon La norme ISO 17025 et l'ICH M10 : 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 La répétabilité est aussi désignée « précision intra-analyse ».

- **Fidélité intermédiaire**

-Selon la norme ISO 17025 et l'ICH M10 : 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.

- **Reproductibilité**

- Selon la norme ISO 17025 et l'ICH M10 : La reproductibilité correspond à la concordance entre laboratoires ; conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents.

### 5.5. Justesse (biais)

- Selon l'ICH :confondu avec l'exactitude(40).
- Selon L'ISO 17025 :\_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. La mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de recouvrement et de biais absolu ou relatif.

### 5.6. Sensibilité

- Selon l'ICH M 10 : non définit.
- Selon la norme ISO 17025 : 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

### 5.7. Limite de détection

- Selon l'ICH M 10 : La limite de détection d'une méthode d'analyse individuelle correspond à la plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de détecter, sans nécessairement fournir la valeur exacte
- La norme ISO 17025 : « Limite de Détection, correspond à la plus petite concentration de la substance pouvant être détectée, mais non quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. Autrement dit, il s'agit de la limite en-dessous de laquelle l'analyte est considéré comme « non détecté ».

### 5.8. Limite de quantification

- Selon l'ICH M 10 : « est la concentration la plus basse quantifiable. Les seuils seront déterminés en analysant la substance à des concentrations de plus en plus faibles jusqu'à ses limites ».
- Selon la norme ISO 17025 : « Limite de Quantification, correspond à la plus petite concentration de la substance pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode ».

### 5.9. Robustesse

- Selon la norme ISO 17025 : qualité d'une méthode capable de donner des résultats d'une exactitude et d'une précision acceptables dans des conditions diverses.
- Selon l'ICH M 10: La robustesse d'une procédure analytique est une mesure de sa capacité à donner des résultats fiables des paramètres de la méthode et sa capacité à ne pas être affectée par les faibles variations(40).

### 5.10. Stabilité des solutions

- Selon l'ICH M 10 : les essais de stabilité fournissent des données sur la manière dont la qualité d'un produit pharmaceutique varie en fonction du temps et sous l'effet de divers facteurs environnementaux (la température et l'humidité). Ceci permet de définir, les conditions de conservations et de déterminer la durée de validité des produits.

Les études de stabilité doivent être menées sur toutes les dimensions et types de conditionnements prévus pour la mise sur le marché du produit.

- Selon l'ISO 17025 : non définit.

### 5.11. Carry-over

- Selon l'ICH M10 : Le Carry-over est une altération de la concentration mesurée due à une analyse résiduelle d'un échantillon précédent qui reste dans l'instrument d'analyse. Il doit être évalué et réduit au minimum pendant le développement de la méthode(40).

- Selon L'ISO 17025 : non définit

### 5. 12. Intégrité de dilution

- Selon l'ICH M 10 : L'intégrité de la dilution est l'évaluation de la procédure de dilution de l'échantillon, lorsque cela est nécessaire, pour confirmer qu'elle n'a pas d'incidence sur l'exactitude et la précision de la concentration mesurée de l'analyte. La même matrice provenant de la même espèce que celle utilisée pour la préparation de l'échantillon doit être utilisée pour la dilution(33).

### 6.Étape de la validation analytique :

La validation nécessite des conditions préalables :

- Des équipements qualifiés dont les performances ont été vérifiées (suitability of instrument) ;
- Des substances de références / des réactifs fiables (suitability of materials) ;
- Des opérateurs formés, qualifiés et habilités (suitability of analyst) ;
- Des procédures analytiques et un protocole approuvé ;
- Un échantillon représentatif(41).

Une fois les conditions ont été établis il est nécessaire de déterminer une gamme de concentration ainsi qu'un seuil d'acceptabilité consensuelle, ensuite sélectionner des standards de validation avec une valeur de référence établie et choisir un plan d'expérience de validation. En cas de méthode indirect il serait nécessaire de planifier une expérience d'étalonnage ; les résultats de la méthode seront calculés par étalonnage inverse.

### 7.Étude statistique de la validation analytique

La validation de techniques analytiques repose sur l'étude et la validation de plusieurs critères qui sont : spécificité, linéarité, exactitude, fidélité, limite de quantification et de détection. Cette méthodologie est basée sur les critères décrits dans le guide élaboré par la SFSTP et ICH Q2(R1). Les critères de la SFSTP reposent sur l'utilisation du profil d'exactitude, qui intègre de façon statistiquement correcte dans un seul graphique l'ensemble des éléments essentiels de la validation. Cette démarche permet de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation(42).

#### 7.1 Spécificité /Sélectivité

L'étude de la spécificité par l'approche empirique nécessite la préparation et l'analyse des solutions suivantes :

- Le diluant ;
- Une solution placebo ;
- Une solution standard à 100% (par rapport à la concentration théorique) ;
- Une solution échantillon (ou forme reconstituée ou placebo chargé) à 100% (par rapport à la concentration théorique).

Les résultats obtenus doivent être comme suit : en comparant les chromatogrammes obtenus à partir des quatre solutions précédemment préparées : les chromatogrammes obtenus

à partir de la solution standard 100% et l'échantillon 100% doivent renfermer des pics au même temps de rétention et avec des surfaces comparables et les chromatogrammes obtenus à partir du diluant et de la solution placebo ne doivent pas présenter un pic au même temps de rétention.

Après avoir vérifié la spécificité de la méthode d'analyse on opère sur deux ensembles d'échantillons :

- **Standards d'étalonnage (SE)** : peuvent être réalisés sans la matrice (si on a démontré l'absence d'effet matrice) ou avec la matrice, utilisés pour évaluer les différentes fonctions de réponse  $y = f(x)$  afin d'effectuer les prédictions inverses.
- **Standards de validation (SV)** : doivent toujours être réalisés avec la matrice, utilisés dans le but de déterminer l'erreur totale à chaque niveau de concentration, calculer l'intervalle de tolérance et tracer le profil d'exactitude et déterminer les limites inférieure et supérieure de quantification (intervalle de dosage)

En ce qui concerne la préparation des SE et SV, celle-ci dépend du protocole de validation choisi. Le logigramme de la figure suivante, présente la démarche proposée dans le guide SFSTP 2003 pour sélectionner un protocole expérimental de validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve.(42)

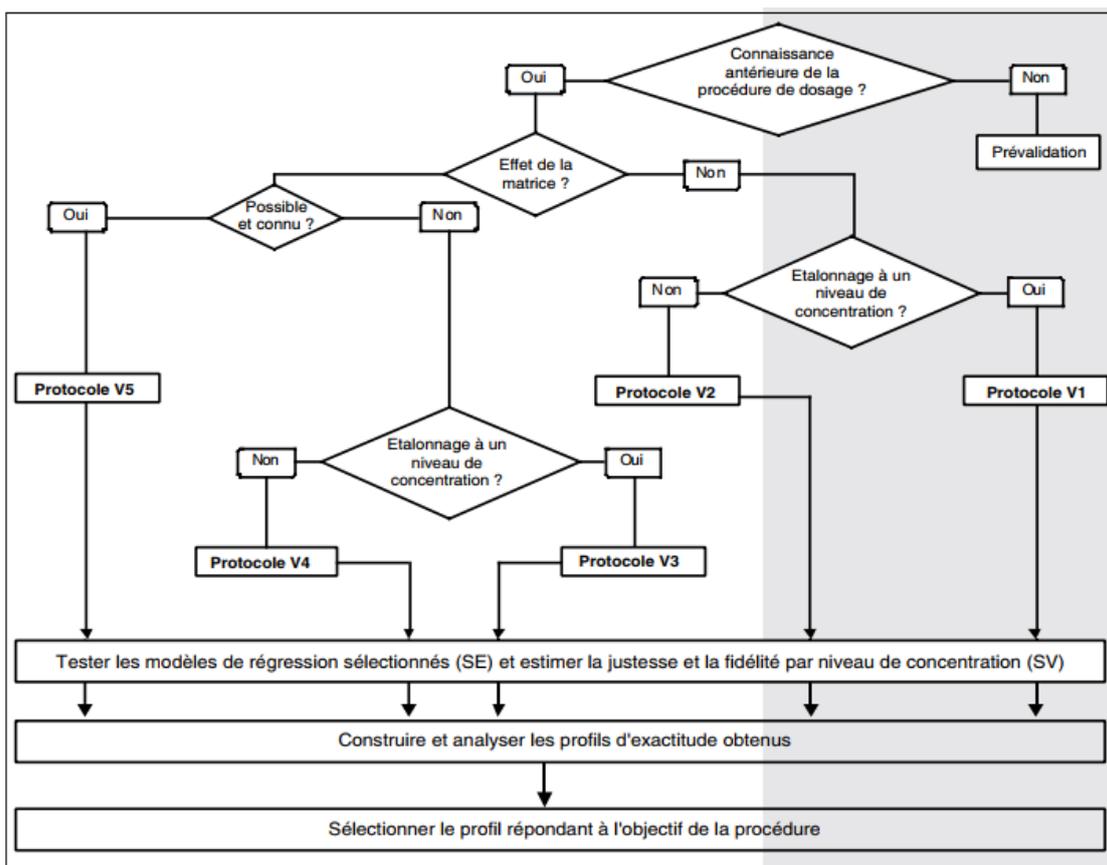


Figure 3 Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation

SE : standard d'étalonnage.

SV : standard de validation

Tableau I : Tableau représentant le nombre total d'essais à réaliser selon le protocole choisi pour valider la procédure analytique

Standards	Niveau de concentration	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE. Etalonnage Sans la matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	2 <sup>(2)</sup>	2	2 <sup>(2)</sup>	
	Haut	2 <sup>(1)</sup>	2	2 <sup>(1)</sup>	2	
SE. Etalonnage Avec la matrice	Bas				2	2
	Médian			2	2 <sup>(2)</sup>	2 <sup>(2)</sup>
	Haut			2 <sup>(1)</sup>	2	2
	Additif					2 <sup>(3)</sup>
SV. Validation Avec la matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nombre minimum de séries		3	3	3	3	3
Nombre total d'essais		33	45	39	63	45

1 : Sélection d'un niveau de concentration supérieur à la concentration cible pour l'étalonnage (Exemple : 120 % de la concentration cible).

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 (exemple : modèle plus simple comme le modèle mathématique des moindres carrés). Dans ce cas, le nombre total de 39 essais pour les protocoles V2 (sans matrice) et V5 (avec la matrice). Le nombre d'essais est de 51 pour le protocole V4.

3 : Addition d'un niveau de concentration supplémentaire pour une fonction de réponse nécessitant un modèle plus complexe (exemple : fonction logistique à quatre paramètres)

### 7.2 Fonction de réponse

#### 7.2.1 Protocole

Une fois les expériences réalisées et les données collectées, il convient tout d'abord de déterminer, sur la base des standards d'étalonnage (SE), la relation entre la réponse (signal ou réponse de l'instrument) Y et la quantité (concentration) de l'analyte X. Cette relation se caractérise à l'aide d'une fonction f qui doit être strictement monotone (strictement croissante ou décroissante) sur l'intervalle de dosage envisagé.

#### 7.2.2 Etude statistique

La relation entre les réponses expérimentales et les concentrations est définie par une fonction f qui doit être strictement monotone soit strictement croissante ou bien strictement décroissante sur l'intervalle de dosage déterminé.

$$Y = f(\mathbf{X}) + \varepsilon$$

$\varepsilon$  : l'erreur associée à la fonction de réponse dénommé erreur résiduelle.

L'évaluation des paramètres du modèle se fera dans le but de réduire l'erreur résiduelle en ajustant la fonction de réponse. Les fonctions de réponse utilisées pour la validation d'une méthode de dosage sont diverses et chacune est employée pour un type de méthode particulier. La plupart des méthodes physicochimiques auront recours à la droite (passant ou non par 0). Si c'est une méthode physicochimique le choix se portera régulièrement sur une fonction linéaire, par conséquent sa représentation sera une droite passant par l'origine ou non. Si c'est une méthode bioanalytique la fonction quadratique pourra être envisagée dans certains cas. Quant aux immuno-dosages, le choix se portera sur les fonctions logistiques à 4 ou 5 paramètres.

Tableau II : Exemple de fonction de réponse

Type	Equation	Paramètres	Linéaire
Droite passant par l'origine	$Y = \beta X$	Pente $\beta$	Oui
Fonction linéaire	$Y = \alpha + \beta X$	Ordonnée à l'origine $\alpha$ Pente $\beta$	Oui
Fonction quadratique	$Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$	$\alpha, \beta, \gamma$	Oui
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left(\frac{X}{\gamma}\right)^\beta}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$	Non
Fonction logistique à 5 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left[\left(\frac{X}{\gamma}\right)^{\beta\Psi}\right]}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \Psi$	Non

### 7.3. Alignement des observations

#### 7.3.1 Protocole

L'alignement consiste à transformer les réponses observées afin de les situer sur la réponse moyenne. Cette étape est nécessaire pour tenir compte de l'indépendance de la pesée, car pour un certain niveau de concentration la quantité introduite n'est pas la même pour toutes les séries.

Cette méthode est requise pour le calcul de la variance (évaluation de la répétabilité et de la précision intermédiaire).

#### 7.3.2 Etude statistique

Si, pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries (souvent pour de raisons de pesées qui doivent être indépendantes), il est indispensable de 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 à transformer les réponses observées ( $y_{ijk} \rightarrow y_{ijk,c}$ ) 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. En validation, l'alignement s'applique aux réponses obtenues avec les échantillons de validation en utilisant les équations ou fonction 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 :

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

$\bar{x}_{ij}$  : Moyenne des concentrations introduites du niveau j de la série i.

$x_{ijk}$  : Concentration introduite du niveau j de la série i répétition k. En résumé, pour les différentes fonctions de réponse

**Tableau III : Règle d'alignement pour différentes fonctions de réponses**

Fonction de réponse	Règle d'alignement
Droite (passant ou pas par 0)	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}]$
Fonction quadratique	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}] + \hat{\gamma}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}]^2$
Fonction logistique	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + (\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i) \left[ \frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{\bar{x}_{ij}}\right)^{\hat{\beta}_i}} - \frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{x_{ijk}}\right)^{\hat{\beta}_i}} \right]$

#### 7.4. Prédiction inverses

Avant d'effectuer les prédictions inverses, c'est-à-dire calculer des concentrations en retour avec la fonction de réponse, il est préférable de s'assurer qu'au sein d'un niveau de concentration, les concentrations sont toutes identiques. Si ce n'est pas le cas, il vaut alors mieux les aligner.

Les prédictions inverses pour les différents modèles de régression s'obtiennent comme suit :

**Tableau IV Calcul des prédictions inverse pour différentes fonctions de réponses**

Type de la fonction de réponse	Equation
Droite passant par 0	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$
Droite (ne passant pas par 0)	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}$
Fonction quadratique	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^2 - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{2\hat{\gamma}_i}$
Fonction logistique à 4 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left( \frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$
Fonction logistique à 5 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left( \left( \frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}} \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

-Si les observations ont été alignées, il faut remplacer les  $y_{ijk}$  par  $y_{ijk,c}$  dans le tableau précédent.

-Si une transformation a été utilisée il ne faut pas oublier d'effectuer la transformation inverse après calcul en retour.

### 7.5. Justesse

#### 7.5.1. Protocole

L'estimation de la justesse s'effectue avec les concentrations calculées provenant des standards de validation en phase de validation ou des standards d'étalonnage en phase de pré-validation.

#### 7.5.2. Etude statistique

La justesse (ou le biais) de la méthode au niveau de concentration est obtenue en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées. Le biais peut s'exprimer en termes absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites comme suit :

$$\mathbf{biais}_j = \hat{u}_j - \bar{x}_j$$

$$\mathbf{biais}(\%)_j = 100 \times \frac{\hat{u}_j - \bar{x}_j}{\bar{x}_j}$$

$$\mathbf{Recouvrement}(\%)_j = 100 \times \frac{\hat{u}_j}{\bar{x}_j}$$

$\hat{u}_j$ : Moyenne des concentrations calculées du niveau j.

$\bar{x}_j$ : Moyenne des concentrations introduites du niveau j.

### 7.6. Fidélité

#### 7.6.1 Protocole

L'estimation de la fidélité se fait aussi à partir des standards de validations qui doivent toujours être réalisés avec la matrice.

#### 7.6.2 Etude statistique

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité tandis que la somme des estimations des variances intra et inter-série donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire.

$$\mathbf{Répétabilité: } \hat{\sigma}_{Re,j}^2 = \hat{\sigma}_{w,j}^2$$

$$CV_{\text{répétabilité}} = 100 \frac{\hat{\sigma}_{w,j}}{\bar{x}_{j,calc}}$$

$$\text{Fidélité intermédiaire: } \hat{\sigma}_{IP,j}^2 = \hat{\sigma}_{w,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2$$

$$CV_{\text{fidélité intermédiaire}} = 100 \frac{\hat{\sigma}_{IP}}{\bar{x}_{j,calc}}$$

$\hat{\sigma}_{w,j}^2$  : Variance intra-série

$\hat{\sigma}_{B,j}^2$  : Variance inter-série

On note qu'à chaque niveau de concentration J, niveau prit en considération, une estimation statistique est réalisée :

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

Où :  $X_{ijk}$  est la k-ième concentration calculée du niveau j de la i-ème série,  $\mu_j$  est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration j,

$\alpha_{ij}$  est au niveau j l'écart entre la moyenne de la i-ème série et la moyenne  $\mu_j$ ;  $\varepsilon_{ijk}$  est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance  $\sigma^2_{r,j}$ ,  $\varepsilon_{ijk}$  est l'erreur expérimentale, considérée comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance. L'erreur expérimentale est supposée indépendante de la série. Les variances  $\sigma^2_{B,j}$  et  $\sigma^2_{w,j}$ ; représentent les variances inter-série et intra-série, respectivement. La méthode ANOVA est utilisée pour estimer à chaque niveau de concentration j les paramètres  $\mu_j$ ,  $\sigma^2_{B,j}$  et  $\sigma^2_{w,j}$  du modèle.

$$\hat{\mu}_j = \frac{1}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^{n_{ij}} x_{ijk,calc}$$

$$MSM_j = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p n_{ij} (\bar{x}_{ij,calc} - \bar{x}_{j,calc})^2$$

$$MSE_j = \frac{1}{\sum_{i=1}^p n_{ij} - p} \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^{n_{ij}} (x_{ijk,calc} - \bar{x}_{ij,calc})^2$$

$\bar{x}_{ij}$ , calc : Moyenne des concentrations calculées au niveau j

$\bar{x}_j$ , calc : Moyenne des concentrations calculées au niveau j

$X_{ij}$ , calc : Concentrations calculées au niveau j de la série i répétition k

n : Nombre de répétition

p : Nombre de séries.

Dans le cas d'un schéma équilibré (le nombre de répétitions est identique pour tout niveau de concentration dans chaque série), les composantes de la variance du niveau sont estimées comme suit (n étant le nombre de répétition dans chaque série) :

Si  $MSE_j < MSM_j$  alors :

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

$$\hat{\sigma}_{B,j}^2 = \frac{MSM_j - MSE_j}{n}$$

Sinon :

$$\hat{\sigma}_{W,j}^2 = \frac{1}{pn-1} \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^k (x_{ijk,calc} - \bar{x}_{.j,calc})^2$$

$$\hat{\sigma}_{B,j}^2 = 0$$

### 7.7. Linéarité

#### 7.7.1 Étude statistique

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité à obtenir des résultats proportionnels à la quantité (par exemple, la concentration) de l'analyte dans l'échantillon sur un certain intervalle de dosage. L'exigence de linéarité s'applique au résultat (concentration calculée = f concentration introduite), pas à la réponse (signal = f(concentration introduite)). C'est une condition préalable à l'estimation de la justesse. Inversement, une relation linéaire entre les concentrations estimées et introduites n'implique pas que la méthode est correcte(42).

### 7.8. Robustesse

#### 7.8.1. Étapes du test de robustesse

- Sélection et identification des facteurs opérationnels ou environnementaux facteurs à étudier
- Sélection des niveaux des facteurs à examiner. Dans un essai de robustesse 2 ou 3 niveaux pour chaque facteur sont normalement considérés. La robustesse des facteurs dans les intervalles entre les niveaux des facteurs est alors étudiée.
- Sélection de la conception expérimentale ;
- Réalisation des expériences décrites dans un plan. Il s'agit de la partie expérimentale de l'essai de robustesse ;
- Calcul de l'effet des facteurs sur la (les) réponse(s) de la méthode, afin de déterminer quels facteurs peuvent avoir des effets expérimentaux ;
- Analyse statistique des résultats. Dans cette partie du test, les effets statistiquement les effets statistiquement significatifs sont identifiés ;
- Tirer des conclusions chimiquement pertinentes ;
- Si nécessaire, donner des conseils pour améliorer la performance de la méthode et définir des critères de pertinence. la méthode et la définition de critères d'adéquation(43).

#### 7.8.2. Étude statistique

Il est possible d'utiliser un logiciel statistique classique pour estimer chaque effet par un ajustement multi régressif d'une fonction mathématique avec multi régression qui va relier chaque effet du facteur sur la variation de la réponse(44).

### 7.9. Carry-Over

#### 7.9.1. Protocole

Lors de la validation, le carry-over doit être évalué en analysant des échantillons à blanc après le standard d'étalonnage à la limite supérieure de quantification (ULOQ).

Le Carry-over dans les échantillons à blanc étant passés après le standard d'étalonnage le plus élevé ne doit pas dépasser 20 % de la réponse de l'analyse à la limite inférieure de quantification et 5 % de la réponse pour l'étalon interne. Si le carry-over semble inévitable, les échantillons de l'étude ne doivent pas être randomisés. Des mesures spécifiques doivent être envisagées, testées pendant la validation et appliquées pendant l'analyse des échantillons de l'étude, afin que le carry-over n'affecte pas l'exactitude. Ces mesures peuvent inclure l'injection d'un ou plusieurs échantillons à blanc après les échantillons dont on s'attend à une concentration élevée, avant l'échantillon d'étude suivant(40).

### 7.9.2. Étude

Si la plateforme d'analyse est sujette au carry-over, le potentiel de carry-over doit être étudié en plaçant des échantillons à blanc après le standard d'étalonnage à la limite de quantification supérieur. La réponse des échantillons à blanc doit être inférieure à la limite de quantification inférieur(40).

### 7.10. Intégrité de dilution

#### 7.10.1. Protocole

L'intégrité de la dilution est l'évaluation de la procédure de dilution de l'échantillon, lorsque cela est nécessaire, pour confirmer qu'elle n'a pas d'incidence sur l'exactitude et la précision de la concentration mesurée de l'analyte. La même matrice provenant de la même espèce que celle utilisée pour la préparation des échantillons doit être utilisée pour la dilution. Les échantillons de dilution doivent être préparés avec des concentrations d'analyte dans la matrice qui sont supérieures à l'ULOQ (limite supérieure de quantification) , puis dilués avec une matrice vierge(40).

#### 7.10.2. Étude statistique

Au moins 5 répliques par facteur de dilution doivent être testées en une seule fois pour déterminer si les concentrations sont mesurées avec exactitude et précision dans la gamme d'étalonnage. Le ou les rapports de dilution appliqués pendant l'analyse de l'échantillon d'étude doivent se situer dans la plage des rapports de dilution évalués pendant la validation. L'exactitude moyenne des échantillons de dilution doit se situer à  $\pm 15\%$  de la concentration nominale et la précision (%CV) ne doit pas dépasser 15 %. Dans le cas de matrices rares, l'utilisation d'une matrice de substitution pour la dilution peut être acceptable, pour autant qu'il ait été démontré que cela n'affecte pas la précision et l'exactitude(40).

## 8. Les différentes approches de la validation analytique

### 8.1. Approche descriptive

L'approche descriptive repose sur la définition des critères qui servent à valider le dosage, estimer ces critères et comparer ces estimations aux limites fixées. C'est le type le plus communément utilisé. Il existe différentes façons de valider une méthode analytique par ses critères de performance. Deux critères reviennent automatiquement, ce sont la fidélité et la justesse. La fidélité se mesure soit par un écart type, soit par un coefficient de variation. Plus l'écart type ou plus le coefficient de variation est élevé et moins la méthode de dosage est

fidèle. La justesse se mesure par le biais. Plus le biais est élevé et moins la méthode de dosage est juste(45).

L'approche descriptive a pour avantage principal d'être facile à appliquer lors d'une procédure. En contrepartie, elle ne permet aucune gestion du risque si elle est utilisée seule. Des méthodes peu performantes peuvent en effet passer les critères d'acceptation sans assurer une réelle validité de la méthode(42).

### **8.2. Approche globale**

L'approche globale se base sur des critères décisionnels objectifs, comme par exemple, l'estimation des limites dans lesquelles se trouve le résultat par rapport à la vraie valeur, ou bien, les limites dans lesquelles se trouve la vraie valeur par rapport au résultat. La confrontation de ces limites aux limites imposées en routine, permet de valider ou de rejeter la méthode de dosage. A partir de 2003, La SFSTP propose une alternative à la méthode descriptive de validation de méthodes de dosage(43). De nouvelles approches doivent être recherchées, comme par exemple, la validation de la méthode de dosage en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision(44).

Une bonne méthode de dosage doit pouvoir quantifier, les quantités inconnues de la substance que le laboratoire aura à déterminer, le plus exactement possible. D'une autre façon, que la différence entre le résultat rendu et la vraie valeur non connue de l'échantillon soit le plus petit possible, et au moins inférieur à une limite d'acceptation fixée par l'analyste en fonction de la finalité de la méthode telle qu'elle sera utilisée en routine(42).

# **Chapitre IV**

## **Profil d'exactitude**

Pour s'assurer que les résultats obtenus avec les méthodes de dosages sont fiables, les laboratoires pharmaceutiques doivent valider ces méthodes. L'objectif de la validation est de démontrer que les résultats obtenus grâce à une méthode analytique développée sont fiables dans des limites bien définies. Une pratique courante au niveau des laboratoires d'analyses est d'utiliser à cette fin des critères d'acceptation uniquement basés sur des estimateurs ponctuels des paramètres de la méthode de dosage sans tenir compte des erreurs associées. Dans ces conditions, le risque d'accepter erronément une méthode comme valide et/ou d'en rejeter une qui est réellement valide reste inconnu et incontrôlé. En revanche, l'utilisation du profil d'exactitude permet de contrôler ces risques(46).

La méthode de validation utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision a été développée par une commission de la SFSTP (SFSTP 2003 et 2006), pour pallier aux faiblesses des guides de validation précédents. Cette commission est repartie des objectifs fondamentaux de la validation analytique pour proposer un outil de décision permettant de prévoir qu'une proportion donnée des résultats futurs sera comprise dans les limites d'acceptabilité. Ceci permet de mieux intégrer les besoins de l'utilisateur final de la méthode analytique aux objectifs de la validation(38).

## 1. Concept d'erreur totale

### 1.1. Définition

L'Erreur Totale (ET) représente l'erreur globale ou totale qui peut survenir dans le résultat d'une mesure (test) en raison à la fois de problèmes de fidélité (erreur aléatoire) et de justesse (erreur systématique) de la procédure de mesure. Elle est communément définie comme

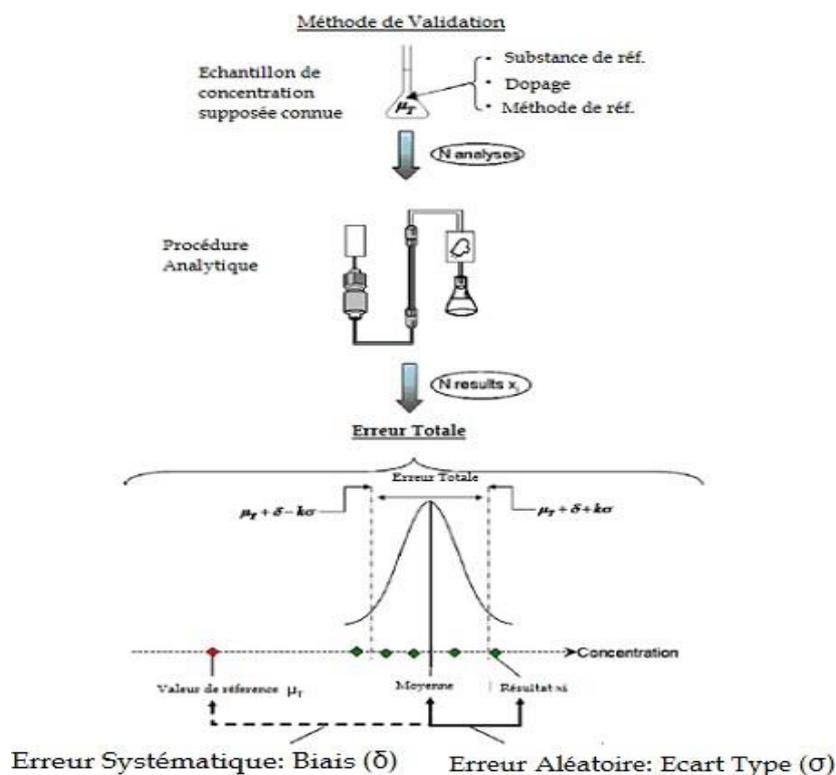
$$ET = \text{Biais} + Z * SD,$$

*Où le biais est l'estimation de l'erreur systématique, SD (écart type) est l'estimation de l'erreur aléatoire, et Z est un multiplicateur qui représente le niveau de confiance souhaité.*

L'objectif de l'utilisation de l'erreur totale est d'estimer (décrire) l'erreur maximale qui pourrait se produire dans un résultat d'analyse obtenu à partir d'une procédure de mesure. Dans la validation analytique d'une méthode, l'erreur totale mesure la qualité d'une mesure qui peut être comparée à une qualité attendue de cette même mesure et, qui peut être exprimée en terme d'erreur totale acceptable (ETA) ou de limite d'acceptation nommée souvent  $\lambda$ (8).

## 1.2. Types d'erreurs

En règle générale, trois types d'erreur sont reconnus en chimie analytique : l'erreur systématique, l'erreur aléatoire, et l'erreur grotesque. La Figure 4 montre les deux premiers types d'erreurs. Pour estimer l'erreur aléatoire, les variances, les écarts types ou les coefficients de variation sont calculés sur la base des mesures répétées du même échantillon. Pour estimer l'erreur systématique, la première étape consiste à calculer la moyenne de plusieurs répétitions de mesures du même échantillon, puis l'écart à une valeur de référence est calculé afin d'estimer le biais(8).



\* La concentration de l'échantillon n'est jamais connue parfaitement, c'est, en général, la valeur de référence ou valeur vraie par convention qui est utilisée\*

**Figure 4: L'erreur totale pour la validation des méthodes(8).**

Ces deux composantes d'erreur sont faciles à estimer lorsque plusieurs répétitions d'un échantillon avec une concentration de référence ou une valeur conventionnellement vraie sont analysées. Cependant, quand seulement une seule mesure est effectuée, comme lors de l'analyse en routine, il est impossible de différencier ces deux types d'erreur, une seule mesure est soumise à l'ensemble des erreurs d'analyse, c'est-à-dire de la combinaison simultanée des composantes systématiques et aléatoires de l'erreur.

Donc, l'erreur totale est une mesure de la distance entre tout résultat individuel et la valeur de référence de la concentration de l'analyte présent dans l'échantillon. L'erreur d'analyse totale ou l'erreur totale est donc la combinaison simultanée des parties systématiques et aléatoires de l'erreur.

Enfin, certains auteurs ont proposé de subdiviser ces deux grandes catégories d'erreurs afin de diagnostiquer les sources les plus importantes d'erreurs. La détermination de la quantité relative de chaque source est essentielle, si l'on vise à améliorer les performances analytiques d'une méthode (par exemple, en réduisant le biais dont l'origine est due à des facteurs contrôlables, tels que les opérateurs ou les équipements)(8).

### 1.3. Calcul de l'erreur totale

Chaque mesure obtenue est le reflet de la vraie valeur, du biais de la méthode et de sa fidélité, ce qui s'exprime comme suit :

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

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

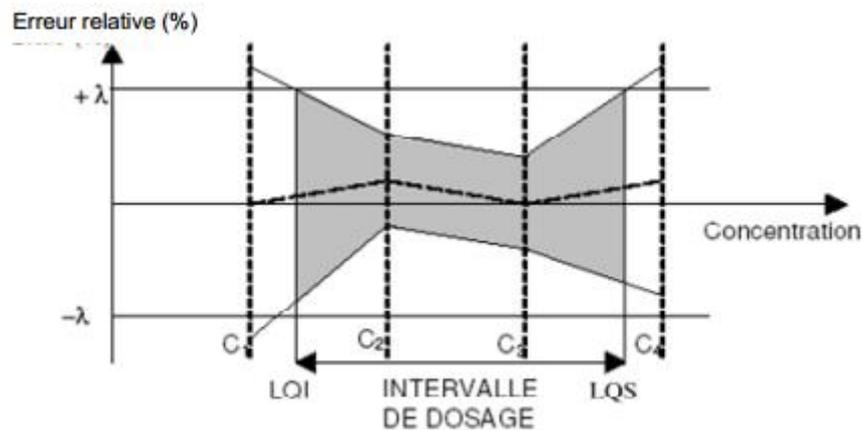
$$X - \mu = \text{Erreur Totale}_{\text{procédure}}$$

L'Erreur Totale d'une procédure analytique évalue son aptitude à produire des résultats exacts. Donc l'estimation de l'erreur totale d'une procédure est fondamentale pour juger de la validité d'une méthode. Cette erreur totale, comme indiqué ci-dessus, est la somme de la justesse (biais) et de la fidélité(42).

## 2. Définition du profil d'exactitude

Le profil d'exactitude, ou approche de l'erreur totale est une approche utilisant les intervalles de tolérance statistiques et l'erreur totale de mesure comme outil de décision unique. Cette approche est une règle de décision, à la fois pratique et visuelle. Elle repose sur l'intégration du profil d'exactitude dans des limites d'acceptation ( $\pm\lambda$ ). Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles de tolérance permet donc, comme illustré dans la Figure 4, de décider de la capacité ou non d'une procédure à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. La zone en grisé montre l'intervalle de dosage dans lequel la procédure est capable de quantifier avec une exactitude connue et un risque fixé par l'analyste. C'est ainsi que dans ces conditions, si l'analyste est prêt à assumer par exemple un risque de 5%, il pourra au terme de la validation de sa procédure garantir que 95 fois sur 100 des futures mesures fournies par celle-ci seront comprises dans les limites d'acceptation fixées en

fonction des contraintes de son secteur d'activité (ex: 1% ou 2% sur les matières premières, 5% sur les spécialités pharmaceutiques, 15% en bio-analyse, environnement, etc.)(8).



*LQI*: limite de quantification inférieure;

*LQS*: limite de quantification supérieure

**Figure 5: Illustration du profil d'exactitude comme outil de décision (8).**

Comme les vraies valeurs de biais et de fidélité de la procédure sont inconnues, le profil d'exactitude par niveau de concentration ( $C_1$ ,  $C_2$ , ...) s'obtient en calculant l'intervalle de tolérance qui permet d'évaluer la probabilité d'obtenir des résultats futurs dans des limites d'acceptation et ce, à partir des estimations disponibles du biais et de la fidélité de la procédure après la phase de validation au niveau de concentration en question. A noter que les estimations du biais et de la variance sont des éléments essentiels pour calculer les intervalles de tolérance, mais la décision n'est pas faite sur la base de ces estimations de biais et de variance. Le profil d'exactitude, représenté dans la Figure 5, s'obtient en reliant les limites de tolérance basses et hautes estimées pour chaque niveau de concentration. Si, sur une partie de l'intervalle de dosage, les limites de tolérance sortent des limites d'acceptation, comme dans l'exemple de la Figure 5 pour les niveaux de concentration  $C_1$  et  $C_4$ , de nouvelles limites de quantification, et par là même un nouvel intervalle de dosage seraient définis. La Figure 10 représente ces nouvelles limites LQS (limite de quantification supérieure) et LQI (limite de quantification inférieure) qui sont en parfait accord avec la définition de ce critère, à savoir la plus petite quantité de substance à analyser qui peut être dosée avec une exactitude (justesse + fidélité) définie.

L'utilisation du profil d'exactitude, comme seul outil de décision, permet non seulement de réconcilier les objectifs de la procédure avec ceux de la validation mais aussi de visualiser rapidement la capacité de la procédure à répondre de façon fiable à son objectif analytique(8).

### 3. l'intervalle de tolérance

#### 3.1. Définition de l'intervalle de tolérance

L'intervalle de tolérance, également appelé **intervalle de prédiction**, permet de prédire où va se trouver en moyenne une proportion connue des mesures. En termes simples, l'intervalle de tolérance caractérise le comportement de l'ensemble des mesures. Il est donc très intéressant dans l'optique d'un contrôle de procédé, il est cependant moins souvent évoqué, car un peu plus délicat à définir(8).

Ce qui importe en validation, ce n'est pas la validité des résultats obtenus avec l'Erreur Totale, mais plutôt la garantie ou une représentation de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultats dans le futur, C'est le rôle de l'intervalle de Tolérance. L'estimation des paramètres  $\mu_j, \sigma^2_{B,j}$ , et  $\sigma^2_{W,j}$ , à chaque niveau de concentration  $j$ , a pour but de permettre d'estimer la proportion attendue d'observation dans les limites d'acceptation prédéfinies  $[-\lambda, \lambda]$ , c'est-à-dire(42) :

$$\bullet \quad E_{\hat{\mu}, \hat{\sigma}} \{P[|X - \mu_T| < \lambda] | \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M\} \geq \beta \text{ eq 01}$$

Cependant il n'existe pas de solution exacte pour estimer cette proportion attendue. La solution déjà proposée par plusieurs auteurs est de calculer l'intervalle de Tolérance ( $\beta$ -Expectation Tolerance Interval) :

$$\mu_j - k\sigma; \quad \mu_j + k\sigma \text{ eq 02}$$

Avec:  $\mu_j$  la moyenne des concentrations et  $\sigma$  leur écart type.

$$\text{Où: } k = Q \left[ v \frac{1+\beta}{2} \right] \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} \sigma_{F,j}}$$

$$\hat{\sigma}^2_{F.I.,j} = \hat{\sigma}^2_{W,j} + \hat{\sigma}^2_{B,j};$$

$$R_j = \frac{\hat{\sigma}^2_{B,j}}{\hat{\sigma}^2_{W,j}};$$

$$B_j = \sqrt{\frac{R_j + 1}{nR_j + 1}};$$

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

$$Q_t\left\{v; \frac{1+\beta}{2}\right\};$$

Où:  $Q$  est le quantile,  $\beta$  de la distribution t de Student à  $v$  degrés de liberté,  $p$  le nombre de répétitions  $n$  le nombre de séries,  $\hat{\sigma}_{F.I.,j}^2$  la variance de la fidélité intermédiaire,  $\hat{\sigma}_{w,j}^2$  la variance intra série,  $\hat{\sigma}_{B,j}^2$  la variance inter série.

$k$  le facteur de recouvrement est choisi afin que la proportion attendue des résultats futurs tombant dans les limites de l'intervalle soit égale à  $\beta$ . Si cet intervalle de tolérance est totalement inclus dans les limites  $[-\lambda, +\lambda]$ , c'est-à-dire si  $(\hat{\mu}_M - k\hat{\sigma}_M > -\lambda$  et  $\hat{\mu}_M + k\hat{\sigma}_M < +\lambda)$  alors la proportion attendue de résultats dans les limites d'acceptation sera supérieure à  $\beta$ . L'estimation des paramètres de justesse et fidélité  $\mu_j, \sigma_{B,j}^2$  et  $\sigma_{w,j}^2$ , et à chaque niveau de concentration  $j$ , n'est qu'une étape pour calculer la proportion attendue de résultats qui se situent dans les limites d'acceptation. L'intervalle de tolérance sera calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation comme suit : (en valeur absolue)(42).

- $E_{\hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M}\{P_X[\hat{\mu}_M - k\hat{\sigma}_M < X < \hat{\mu}_M + k\hat{\sigma}_M | \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M]\} = \beta \text{ eq } 03$

Le même intervalle Eq. 03 en échelle relative devient :

- $[\text{biais}(\%)_j - Q_t\left\{v; \frac{1+\beta}{2}\right\} \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{F.I.}}; \text{biais}(\%)_j + Q_t\left\{v; \frac{1+\beta}{2}\right\} \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{F.I.}}] \text{ eq } 04$

Deux termes sont contenus dans l'intervalle de tolérance : l'un étant la justesse et l'autre étant le coefficient de variation de fidélité intermédiaire. C'est la raison pour laquelle cet intervalle peut ainsi être considéré comme une expression de l'exactitude des résultats(42).

### 3.2. Relation entre l'intervalle de tolérance et l'erreur totale

L'intervalle de tolérance est toujours construit sur la base de la moyenne et l'écart-type d'un échantillon d'un produit, par exemple. S'il est exprimé par rapport à la cible de la production d'un médicament ou par rapport à la valeur réelle des analytes dans un échantillon, l'intervalle de tolérance combine donc simultanément les erreurs aléatoires et systématiques d'une procédure analytique. Dans ce cas, la valeur moyenne estimée est remplacée par le biais estimé de la méthode d'analyse ou du processus de production. C'est donc un moyen statistique commode d'exprimer l'erreur totale(8).

**4. Calcul et construction du profil d'exactitude**

La construction du profil d'exactitude se fait par représentation graphique des résultats en valeurs relatives par rapport à la valeur de référence du niveau est effectuée. On reporte sur l'axe horizontal les valeurs de référence moyennes, et sur l'axe vertical :

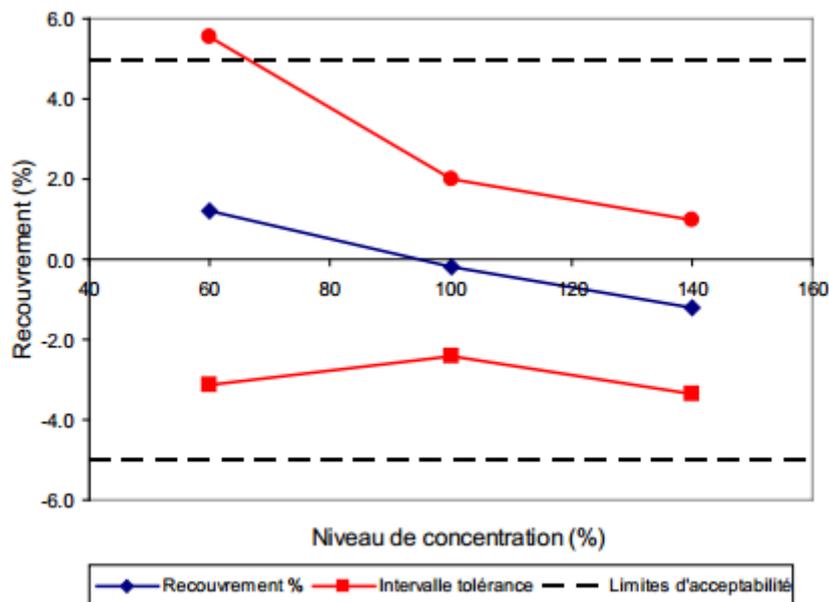
- les limites de tolérance relatives haute et basse (LTS U et LTI L);
- les taux de recouvrement moyens ;
- les limites d'acceptabilité relatives haute et basse(38).

Selon l'équation 04 les bornes de ces intervalles sont :

$$LTI L = \text{biais}(\%)_j - Q_t \left\{ v; \frac{1+\beta}{2} \right\} \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{Fij}}$$

$$LTS U = \text{biais}(\%)_j + Q_t \left\{ v; \frac{1+\beta}{2} \right\} \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{Fij}}$$

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes  $L_j$  entre elles ( $L_1 \rightarrow L_2 \rightarrow \dots \rightarrow L_m$ ) et d'autre part les bornes  $U_j$  entre elles ( $U_1 \rightarrow U_2 \rightarrow \dots \rightarrow U_m$ )(42).



**Figure 6: Profil d'exactitude exprimé par le taux de recouvrement(45).**

**5. Interprétation du profil d'exactitude**

Pour utiliser le profil d'exactitude en vue de valider une méthode, il faut avoir fixé les deux critères de décision suivants

### 5.1 les limites d'acceptabilité $\pm\lambda$

Elles servent à traduire les objectifs pratiques des utilisateurs. Elles délimitent un intervalle autour de la valeur de référence. Le plus souvent, ces limites sont réglementaires. Mais dans le cas où il n'existe pas de référence établie, il convient de prendre en compte les attentes des utilisateurs finaux, comme une LQ donnée(47);

### 5.2. La proportion $\beta$

Elle représente la proportion de futurs résultats qui seront en moyenne compris dans les intervalles de tolérance. La valeur choisie pour  $\beta$  dépend largement du champ d'application. Il est évident que plus  $\beta$  est petit, par exemple 70 %, plus la méthode risque de produire des résultats qui ne correspondent pas aux spécifications annoncées. C'est pourquoi, dans la méthode du profil d'exactitude cette proportion a été fixée au moins à 80%(47). Aussi longtemps que l'intervalle de tolérance est compris entre les limites d'acceptabilité, la probabilité que la différence entre la valeur  $Z$  trouvée par la méthode en routine et la valeur de référence  $X$  reste inférieure à la limite d'acceptabilité est supérieure à la valeur  $\beta$  choisie (en général 80%) : la méthode reste valide(38).

### 5.3. Les limites de quantification

À partir des intervalles de mesures attendus, le profil d'exactitude est construit, permettant de décider des niveaux de concentrations pour lesquels une procédure est capable de fournir des résultats dans les limites d'acceptation. Ainsi par définition, lorsque cela se produit l'intersection entre le profil d'exactitude et les limites d'acceptation définissent les limites de quantification basse (LLOQ) et haute (ULOQ) de la procédure, entre lesquelles il y a bien sûr l'intervalle de dosage. De la sorte, les limites de quantification sont bien les valeurs extrêmes qui peuvent être quantifiées avec une exactitude définie(42).

- **Limite de quantification inférieure : (LLOQ)**

la plus petite quantité d'analyte dans un échantillon qui peut être déterminée quantitativement avec une précision et une exactitude prédéfinies(40)

- **Limite de quantification supérieure : (ULOQ)**

la limite supérieure de quantification d'une méthode d'analyse individuelle est la plus grande quantité d'analyte dans un échantillon qui peut être déterminée quantitativement avec une précision et une exactitude prédéfinies(40)

Dans le cas de la **Figure 6**, on voit que la limite supérieure de l'intervalle de tolérance coupe la limite supérieure d'acceptabilité vers le niveau de concentration 70 %. Cela signifie que pour une concentration inférieure à ce niveau, l'analyste ne peut plus garantir que la méthode est capable, en routine, de produire en moyenne une probabilité  $\beta$  de résultats

acceptables.

Le domaine de validité correspond aux concentrations pour lesquelles l'intervalle de tolérance est compris dans les limites d'acceptabilité. Pour la **Figure 6**, le domaine de validité de la méthode est donc compris entre les niveaux de concentration 70 % et 140 % (38).

### **6. Choix de la fonction de réponses**

Il est possible de construire plusieurs profils d'exactitude à partir des données d'étalonnage, en utilisant différents modèles mathématique. On peut alors sélectionner le profil le plus favorable ou la procédure d'étalonnage la plus simple qui, permet d'atteindre l'objectif fixé qui est d'avoir l'intervalle de validité le plus large possible, donc qui inclus le maximum de valeurs définies dans l'intervalle de validation (48).

# **PARTIE PRATIQUE**

# **Matériel et Méthodes**

## 1. Matériels et méthodes

Le projet de notre fin d'étude est la validation d'une méthode dosage du métronidazole dans le plasma. Cette étude a pour but de valider le dosage du métronidazole dans le plasma par HPLC (High Performance Liquide Chromatographie) par l'approche erreurs totales. Ce travail a été réaliser au niveau du laboratoire d'analytique du département de pharmacie de la faculté de médecine Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou en conformité avec les protocoles de validation décrits dans les guides de validation de la Commission Française des Science Technique et Pharmaceutique (SFSTP) édition 2006 et l'ICH M10.

### 1.1 Matériel

#### 1.1.1 Matières premières

**Tableau V: Matières premières utilisées**

Matières premières	Rôles	Fournisseur
Métronidazole	Principe actif	Gracieusement fourni par Biopharm
Fluconazole	Etalon interne	
Plasma	Matrice	CTS du CHU de Tizi-Ouzou

#### 1.1.2. Réactifs

**Tableau VI : Réactifs utilisés**

Réactifs	Propriétés physicochimique	Précautions d'emplois
Méthanol	Formule brute : CH <sub>4</sub> O N ° CAS : 67-56-1 Masse molaire : 32.04 g/mol $\rho$ : 1.19 g/cm <sup>3</sup>	
Acide Trichloracétique	Formule brute : C <sub>2</sub> HCl <sub>3</sub> O <sub>2</sub> N ° CAS : 76-03-9 Masse molaire : 163,38 g/mol $\rho$ : 1,63 g/cm <sup>3</sup>	

<b>Acide Chlorhydrique</b>	Formule brute : HCl N ° CAS : 7647-01-0 Masse molaire : 36,45 g/mol $\rho$ : 1.19 g/cm <sup>3</sup>	
<b>Acétonitrile</b>	Formule brute : C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N N ° CAS : 75-05-08 Masse molaire: 41.05 g/mol $\rho$ : 0,789 8 g/cm <sup>3</sup>	
<b>Eau pure</b>	Formule brute : H <sub>2</sub> O N ° CAS : 7732-18-5 Masse molaire : 18 g/mol $\rho$ : 1 g/cm <sup>3</sup>	<b>Aucune</b>

### 1.1.3 Appareillage et équipements

Les appareils et équipements utilisés lors de la réalisation de ce travail sont cités ci-dessous :

**Tableau VII : Appareils HPLC SCHIMADZU (LC20)**

Nom	Equipements	Spécifications
<b>HPLC SCHIMADZU LC 20</b>	Pompe	LC 20 AT
	Injecteur automatique	SIL 20A
	Contrôleur	CBM-20A
	Logiciels d'exposition	LC- Solution
	Compartiment de la colonne	CTO-20A
	Détecteur	Spectrophotométrie UV-visible SPD-20AV

**Tableau VIII : Autres appareils utilisés**

Appareils	Dénomination	Usage
Etuve	Memmert	Séchage
Balance	Kern	Pesée du principe actif
Balance	OHAUS	Pesée des réactifs
Vortex	IKA	Mélange
Centrifugeuse	Hettich	Centrifugation/Précipitation

### 1.1.4 Verreries et autres :

**Tableau IX : Verreries utilisés**

Verreries
Fioles de 25ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml et 1000 ml.
Pipettes jaugées de 5 ml et 10 ml.
Béchers
Tubes secs
Micropipette réglable
Micropipette de 100 <i>ul</i>
Vials pour HPLC

D'autres matériels ont été utilisés notamment : des spatules, des embouts (de 100 *u*let 1000*ul*), des pissettes à eau, compte-gouttes, seringues et des gants.

## 1.2 Méthodes

### 1.2.1 Optimisation de la méthode analytique

#### 1.2.1.1 Choix de l'étalon interne

Le dosage du métronidazole se fait simultanément avec celui de l'étalon interne qui est le fluconazole. Notre choix s'est porté sur cette molécule, en vue de ses propriétés physico-chimiques comparables à celle du métronidazole. Son utilisation permet de minimiser les éventuelles erreurs introduites par l'injection.

**Tableau X: Propriété physico chimique du Métronidazole et du fluconazole(11,49)**

Propriétés physico-chimique	Métronidazole	Fluconazole
<b>Solubilité</b>	Soluble dans HCL 0.1 N	Soluble dans HCL 0.1 N
<b>Fixation protéique</b>	< 20 %	< 12%
<b>PKa</b>	2.57	2.27
<b>Polarité (log p)</b>	-0.02	0.5

#### 1.2.1.2 Etapes de prétraitement

La composition du plasma (présence d'éléments à haut poids moléculaire), rend impossible le dosage du métronidazole sans prétraitement, au risque d'endommager la colonne chromatographique.

Les étapes de ce prétraitement sont détaillées ci-dessous :

### a- Méthode de précipitation

La précipitation des protéines présentes dans le plasma se fait préalablement au dosage du métronidazole. Après plusieurs essais utilisant un ou plusieurs solutions de précipitations dont le méthanol seul, le TCA seul, l'acide perchlorique, l'acétone, ainsi que l'association TCA et acétone, notre choix s'est porté sur une solution d'acide trichloracétique TCA 2N. En plus d'être peu coûteux, disponible, et relativement simple à préparer cette solution offre le meilleur résultat.

### b- Méthode d'extraction

Une fois la précipitation des protéines effectuée avec le TCA, nous procédons à une extraction du principe actif et de l'étalon interne en utilisant du méthanol. D'autres essais ont été effectués, en utilisant notamment l'éthanol ou l'acétonitrile, mais la solubilité du métronidazole s'est montrée meilleure dans le méthanol.

#### 1.2.1.3 Conditions chromatographiques

Plusieurs essais ont été réalisés dans différentes conditions chromatographiques (les proportions de phases aqueuses et organiques, les volumes d'injections, les colonnes chromatographiques ainsi que le débit et les longueurs d'onde) ont été réalisés.

Les conditions chromatographiques citées ci-dessous, sont les conditions optimales qui permettent d'avoir des pics chromatographiques avec une bonne intensité et résolution, revenant à la ligne de base et éloignés des pics du plasma.

Le choix de la phase mobile ainsi que du gradient d'élution est détaillé ci-dessous :

**Tableau XI Colonne et conditions chromatographique**

<b>Colonne</b>	<b>Longueur</b>	15 cm
	<b>Diamètres</b>	5 mm
	<b>Diamètre des particules</b>	4.5 µm
	<b>Phase stationnaire</b>	C18 Gel de silice Octadécyle
<b>Volume injecté</b>	40 µl	
<b>Température</b>	Température ambiante	

<b>Débit</b>	1 ml/min
<b>Détecteur</b>	Spectrophotomètre UV-Visible : longueur d'onde $\lambda=300$ nm pour le métronidazole $\lambda = 260$ nm pour le fluconazole
<b>Phase mobile</b>	<b>Solution A</b> : Acétonitrile <b>Solution B</b> : Eau
	<b>Gradient :</b> <b>0.0-2.0</b> :90 % de solution B <b>2.0-2.5</b> : de 90% à 60% de solution B <b>2.5-4.0</b> : 60% de solution B <b>4.0-4.5</b> :de 60% à 90% de solution B <b>4.5-9.5</b> : 90% de solution B

## 1.2.2 Méthodologie de la validation analytique

### 1.2.2.1. Choix des paramètres de validation

- **Limites d'acceptabilité ( $\lambda$ )** :  $\lambda = \pm 15\%$  ;
- **Probabilité de confiance ( $\beta$ )** :  $\beta = 95\%$  ;
- **Risque d'erreur accepté ( $\alpha$ )** :  $\alpha = 5\%$ .
- **Intervalle de validation** :  $2\mu\text{g/ml}$ ,  $4\mu\text{g/ml}$ ,  $8\mu\text{g/ml}$ ,  $16\mu\text{g/ml}$ ,  $32\mu\text{g/ml}$ .

### 1.2.2.2 Estimation du rendement d'extraction

L'estimation du rendement d'extraction a été fait par l'injection de 3 répétitions des SE et SV des 3 niveaux de concentrations niveau 1 ( $2\mu\text{g/ml}$ ) ; 3 ( $8\mu\text{g/ml}$ ) ; 5 ( $32\mu\text{g/ml}$ ). Le rendement est calculé en comparant les rapports (aires des pics du MTZ sur les aires des pics du Fluconazole) des standards d'étalonnage et de validation.

### 1.2.2.3 Choix du protocole de validation

Notre protocole de validation s'est fait sur la base du logigramme proposé par la commission SFSTP 2006 et le tableau V du même guide. L'absence d'effet matrice éventuellement permis de choisir le protocole V2, pour un total de 3 séries nous avons effectué 2 répétitions pour les standards d'étalonnage et 3 répétitions pour les standards de validation pour chaque niveau de concentrations. L'étalonnage est effectué à plusieurs niveaux de concentration, en utilisant 5 niveaux de concentrations (définies dans l'intervalle de validation) pour chacun des standards d'étalonnage (SE) et de validation (SV).

#### 1.2.2.4 Choix du diluant :

Le choix du diluant s'est porté sur l'HCl 0.1N car il permet une bonne dissolution du métronidazole et du fluconazole. De plus à l'inverse d'autre diluant tel que le méthanol il est plus disponible et moins couteux.

### 1.2.3 Préparation des solutions

#### 1.2.3.1 Diluant

La préparation du diluant, une solution d'HCl 0.1 N, se fait par dilution de 8 ml d'HCL pure dans une fiole de 1000 ml, puis complétée au trait de jauge avec de l'eau pure.

#### 1.2.3.2 Précipitant

La préparation du précipitant, une solution d TCA 2 N, par dissolution de 16.33 g de TCA dans une fiole de 50 ml, puis complété au trait de jauge avec de l'eau pure.

#### 1.2.3.3 Préparation des solutions standards

##### a. Solutions stocks

- **Solutions stock de Métronidazole à 0.8mg/ml**

La solution stock de métronidazole est préparée par pesée de 80mg de métronidazole standard dans une fiole de 100 ml, à laquelle on ajoute une petite quantité du diluant. Le mélange est vortexé jusqu'à dissolution totale du métronidazole. Une fois dissous, nous complétons avec le diluant jusqu'au trait de jauge.

- **Solutions stock de Fluconazole à 1,6mg /ml**

La solution stock de fluconazole est obtenue par pesée de 80 mg de fluconazole standard dans une fiole de 50 ml, à laquelle on ajoute une petite quantité du diluant. Le mélange est vortexé jusqu'à dissolution totale du fluconazole. Une fois dissous, nous complétons avec le diluant jusqu'au trait de jauge.

##### b. Préparation des solutions de travail

A partir de la solution stock du métronidazole 0.8mg/ml, nous avons préparé 5 niveaux de dilutions détaillées ci-dessous :

**Tableau XII : Tableau présentant le protocole de préparation des solutions de travail**

Niveaux de dilutions	Protocole
<b>1 (0,02mg/ml)</b>	Pipeter 5 ml de solution stock de métronidazole avec une pipette jaugé dans une fiole de 200ml puis compléter au trait de jauge avec le diluant

<b>2 (0,04mg/ml)</b>	Pipeter 5 ml de solution stock de métronidazole avec une pipette jaugé dans une fiole de 100ml puis compléter au trait de jauge avec le diluant
<b>3 (0,08mg/ml)</b>	Pipeter 5 ml de solution stock de métronidazole avec une pipette jaugé dans une fiole de 50ml puis compléter au trait de jauge avec le diluant
<b>4 (0,16mg/ml)</b>	Pipeter 10 ml de solution stock de métronidazole avec une pipette jaugé dans une fiole de 50ml puis compléter au trait de jauge avec le diluant
<b>5 (0,32mg/ml)</b>	Pipeter 10 ml de solution stock de métronidazole avec une pipette jaugé dans une fiole de 25 ml puis compléter au trait de jauge avec le diluant

### c. Préparation des standards d'étalonnage et validation

Nous procédons à la préparation des solutions des standards d'étalonnage et de validation,

dans des tubes secs, les solutions mères sont diluées à 1/10

- Les SV avec du plasma, et les SE avec le diluant.
- 100  $\mu$ l du précipitant sont ensuite ajouté uniquement aux standards de validation suivie de 400  $\mu$ l de méthanol.
- 500  $\mu$ l du diluant sont ajouté uniquement au SE.

Les étapes suivies pour la préparation des SE et des SV sont respectivement détaillées dans les tableaux ci-joints :

**Tableau XIII : Tableau présentant le protocole de préparation des solutions des standards d'étalonnages**

<b>Niveaux</b>	<b>Concentration</b>	<b>Protocole</b>
<b>1</b>	<b>2<math>\mu</math>g/ml</b>	-Pipeter 800 $\mu$ l Du diluant dans 5 tubes secs
<b>2</b>	<b>4<math>\mu</math>g/ml</b>	- Ajouter 100 $\mu$ l de chaque niveau de concentration de métronidazole dans son tube respectif
<b>3</b>	<b>8<math>\mu</math>g/ml</b>	-Ajouter 100 $\mu$ l de la solution stock de fluconazole dans chaque tube
<b>4</b>	<b>16<math>\mu</math>g/ml</b>	-Ajouter 500 $\mu$ l de diluant
<b>5</b>	<b>32<math>\mu</math>g/ml</b>	- homogénéiser
		- Remplir les vials pour HPLC

Ces étapes sont répétées pour les 3 séries à raison de 2 répétitions par série pour chaque niveau de concentrations. Le nombre total de solutions obtenues est de 30.

**Tableau XIV: Tableau présentant le protocole de préparations des solutions des standards de validation**

Niveaux	Concentration	Protocole	
		Dilution	Précipitation et extraction
1	2µg/ml	-Pipeter 800 µl de plasma dans 5 tubes	-Ajouter 100 µl de TCA dans chaque tube
2	4µg/ml	- Ajouter 100 µl de chaque niveau de concentration de	- Vortexer 1 min
3	8µg/ml	métronidazole dans son tube respectif	- Ajouter 400 µl de méthanol
4	16µg/ml	-Ajouter 100 µl de la solution stock de fluconazole dans chaque tube sec.	- Vortexer 2 min
5	32µg/ml		-Centrifuger à 4 000 tours/minute pendant 10 minutes, puis récupérer le surnageant
			- Remplir les vials pour HPLC

Ces étapes sont répétées pour les 3 séries à raison de 3 répétitions par série pour chaque niveau de concentrations. Le nombre total de solutions obtenues est de 45.

#### 1.2.4 Etude de la robustesse

Nous appliquons la procédure d'analyse en faisant varier les paramètres suivant : Débit, longueur d'onde et concentrations avec 2 niveaux chacun, le nombre totale d'expérience est de  $2^n$  avec  $n=3$  donc 8.

Afin d'optimiser le nombre d'essais à réaliser nous utilisons un plan d'expérience factoriel. Les paramètres expérimentaux (facteurs) de l'étude de robustesse sont :

**Tableau XV: Plan d'expérience de la robustesse pour le métronidazole**

N d'essai	Facteurs					
	A Concentration		B Débit		C Longueur d'onde	
	-1	+1	-1	+1	-1	+1
	14 µg/ml	18 µg/ml	0.8 ml/min	1.2 ml/min	298nm	302 nm

<b>1</b>	---	14 µg/ml	0.8	298
<b>2</b>	+--	18 µg/ml	0.8	298
<b>3</b>	--+	14 µg/ml	1.2	298
<b>4</b>	++-	18 µg/ml	1.2	298
<b>5</b>	---+	14 µg/ml	0.8	302
<b>6</b>	+++	18 µg/ml	0.8	302
<b>7</b>	---+	14 µg/ml	1.2	302
<b>8</b>	+++	18 µg/ml	1.2	302

**Tableau XVI: Plan d'expérience de la robustesse pour le fluconazole**

N d'essai		Facteurs					
		A Concentration		B Débit		C Longueur d'onde	
		-1 140 µg/ml	+1 180 µg/ml	-1 0.8 ml/min	+1 1.2 ml/min	-1 258 nm	+1 262 nm
<b>1</b>	---	140 µg/ml		0.8		258	
<b>2</b>	+--	180 µg/ml		0.8		258	
<b>3</b>	--+	140 µg/ml		1.2		258	
<b>4</b>	++-	180 µg/ml		1.2		258	
<b>5</b>	---+	140 µg/ml		0.8		262	
<b>6</b>	+++	180 µg/ml		0.8		262	
<b>7</b>	---+	140 µg/ml		1.2		262	
<b>8</b>	+++	180 µg/ml		1.2		262	

Les différents essais ont été injecté de façon aléatoire, les réponses obtenus ont été corrigé par rapport au 100% (standard) pour avoir des teneurs en % à partir desquelles nous calculons la probabilité pour qu'un facteur de variation n'influence pas la réponse, et cela en utilisant le logiciel JMP

### 1.2.5 Etude de l'intégrité de dilution

A partir de la solution stock de métronidazole nous avons préparé une solution à 0,64mg/ml. Puis nous effectuons une dilution à 1/10 dans le plasma pour obtenir une solution de travail à 0.064 mg/ml en suivant les étapes ci-dessous :

-Pipeter 20 ml de solution stock de métronidazole dans une fiole de 25 ml, puis compléter au trait de jauge avec le diluant.

-Pipeter 100 µl de métronidazole dans 900 µl Du plasma. Nous obtenons une solution de travail (**solution A**) à 0,064mg/ml.

L'intégrité de dilution est ensuite évaluée pour deux dilutions 1/2 et 1/4 et est présentée dans le tableau ci-dessous :

**Tableau XVII: Protocole d'étude de l'intégrité de dilutions**

Facteur de dilutions	Concentration après dilutions	Protocole de dilution	Traitement
1/2	32 µg/ml	Pipetter 500 µl de <b>solution A</b> dans un tube sec Ajouter 500µl de plasma Vortexer 1min	Pipetter 900µl de plasma chargé de <b>solution A</b> Ajouter 100µl de fluconazole La solution obtenue est ensuite traitée comme un SV
1/4	16 µg/ml	Pipetter 250µl de <b>solution A</b> dans un tube sec Ajouter 750µl de plasma Vortexer 1min	Pipetter 900µl de plasma chargé de <b>solution A</b> Ajouter 100µl de fluconazole La solution obtenue est ensuite traitée comme un SV

Pour chaque niveau de dilutions décrits dans le tableau ci-dessus, 5 répétitions ont été effectuées. Le nombre total de solutions obtenues est de 10.

### 1.2.6 Etude de l'effet carry over

L'étude de l'effet carry over se fait par injection du niveau le plus élevé de concentration du SE, directement suivie de l'injection du blanc.

### 1.3 Analyse des données brutes

En utilisant les SE, nous avons effectué un étalonnage interne, les réponses  $y$  obtenu sa partir du rapport des airs du pic du métronidazole et de l'étalon interne sont ajustées en fonction du rapport des concentrations du métronidazole et de l'étalon interne, en utilisant 1e modèle mathématique linéaire avec 4 fonctions mathématiques :

$$y = ax + b, y = ax, \sqrt{y} = a\sqrt{x} + b, \ln y = a \ln x + b.$$

Nous avons réalisé l'étude statistique des données brutes obtenues, après alignement des observations et prédictions inverses, sur Excel de Microsoft Office 2019 enregistré et installé sur Microsoft Office 2019 installé sur Windows 10 authentique, et ce en introduisant dans ce logiciel les feuilles de calcul conçues par l'équipe du Laboratoire de Chimie Analytique de Tizi-Ouzou.

# Résultats

**2. Résultats**

Les chromatogrammes obtenus sont présentés dans l'annexe 1.

**2.1 Estimation du rendement d'extraction**

L'estimation du rendement d'extraction sur 3 niveaux de concentrations et après 3 répétitions a donné les résultats suivants :

**Tableau XVIII: Calcul du pourcentage de rendement d'extraction.**

Concentrations µg/ml	Aires des pics des SE		Aires des pics des SV		Rapport des aires des pics des SE	Rapport des aires des pics des SV	Rendement d'extraction (%)
	Métronidazole	Fluconazole	Métronidazole	Fluconazole			
2	135001	628204	143146	579450	0.21	0.24	114.95
	107877	582905	133390	612138	0.18	0.21	117.74
	134035	600268	138247	626230	0.22	0.22	98.86
8	605025	591991	582597	592609	1.02	0.98	96.19
	589246	624450	572493	627312	0.94	0.91	96.71
	609918	617588	580620	590347	0.98	0.98	99.58
32	2509146	601990	2350612	605591	4.16	3.88	93.12
	2379056	636289	2377224	605657	3.73	3.92	104.97
	2380457	606240	2529887	611744	3.92	4.13	105.32
<b>Moyenne</b>							<b>103.05</b>
<b>Ecart type</b>							<b>8.52</b>

L'intervalle de confiance du rendement d'extraction a été calcul en utilisant la formule suivante :  $\mu \pm t \sigma / \sqrt{n}$

Avec  $\mu$  la moyenne ;

$t$  de Student à  $\nu$  degrés de liberté ( $\nu=8$ )

$\sigma$  L'écart type ;

$n$  Nombre d'essais ;

L'intervalle obtenu est de : [96,10 ; 110,00].

## PARTIE PRATIQUERésultats

### 2.2Données brutes

Les chromatogrammes obtenus sont présentés dans l'annexe 2, les données brutes obtenues sont présentées dans les tableaux suivants :

**Tableau XVIII: Données brute des standards d'étalonnages**

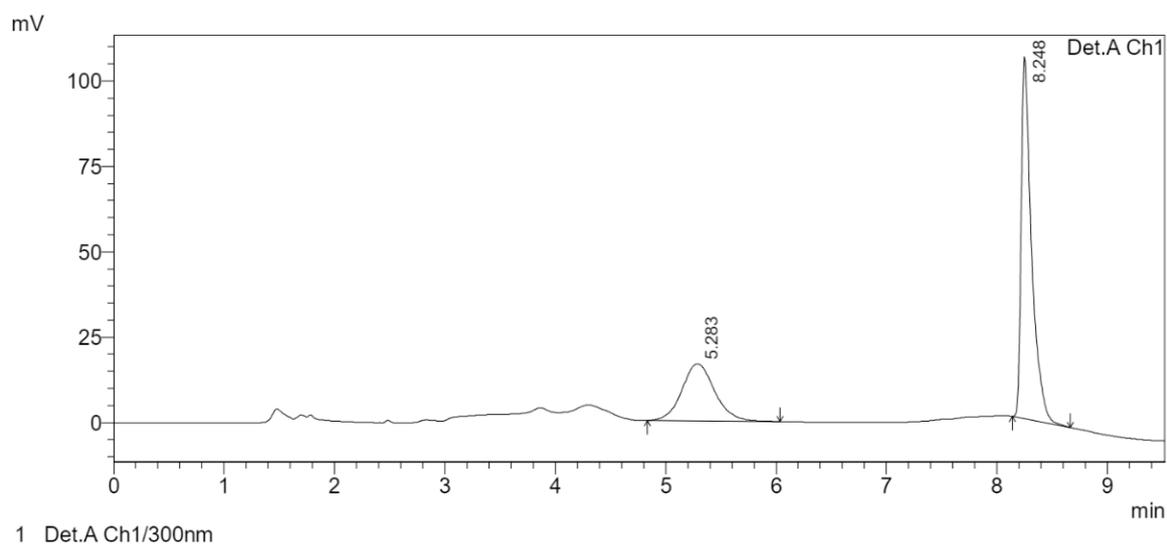
NIVEAU CONC	Rep	DONNEES BRUTES OBTENUES (STANDARD D'ETALONNAGE)											
		SERIE 01				SERIE 02				SERIE 03			
		Concentrations Métrnidazole mg/ml	Réponses Métrnidazole	Réponses E.I	Rapport des réponses	Concentrations Métrnidazole	Réponses Métrnidazole	Réponses E.I	Rapport des réponses	Concentrations Métrnidazole	Réponses Métrnidazole	Réponses E.I	Rapport des réponses
1	1	0,0020	135001	628204	0,21	0,0020	113930	658546	0,17	0,0020	158555	595638	0,27
	2	0.0020	107877	582905	0,19	0.0020	134035	600268	0,22	0.0020	129846	616090	0,21
2	1	0,0040	261758	615252	0,43	0,0040	238549	634987	0,38	0,0040	306935	608145	0,50
	2	0,0040	237471	598906	0,40	0,0040	314164	663612	0,47	0,0040	238783	630850	0,38
3	1	0.0080	534012	620150	0,86	0.0080	605025	591991	1,02	0.0080	609918	617588	0,99
	2	0,0080	544744	599822	0,91	0,0080	589246	624450	0,94	0,0080	589246	624450	0,94
4	1	0,0160	1236471	632730	1,95	0,0161	1285420	666866	1,93	0,0161	1172129	601701	1,95
	2	0,0161	1159800	622075	1,86	0,0161	1283505	669424	1,92	0,0161	1283505	669424	1,92
5	1	0,0320	2380457	606240	3,93	0,0321	2509146	601990	4,17	0,0321	2293876	608844	3,77
	2	0,0321	2126566	586200	3,63	0,0321	2379056	636289	3,74	0,0321	2379056	636289	3,74

Tableau XIX: Données brutes es standards de validation

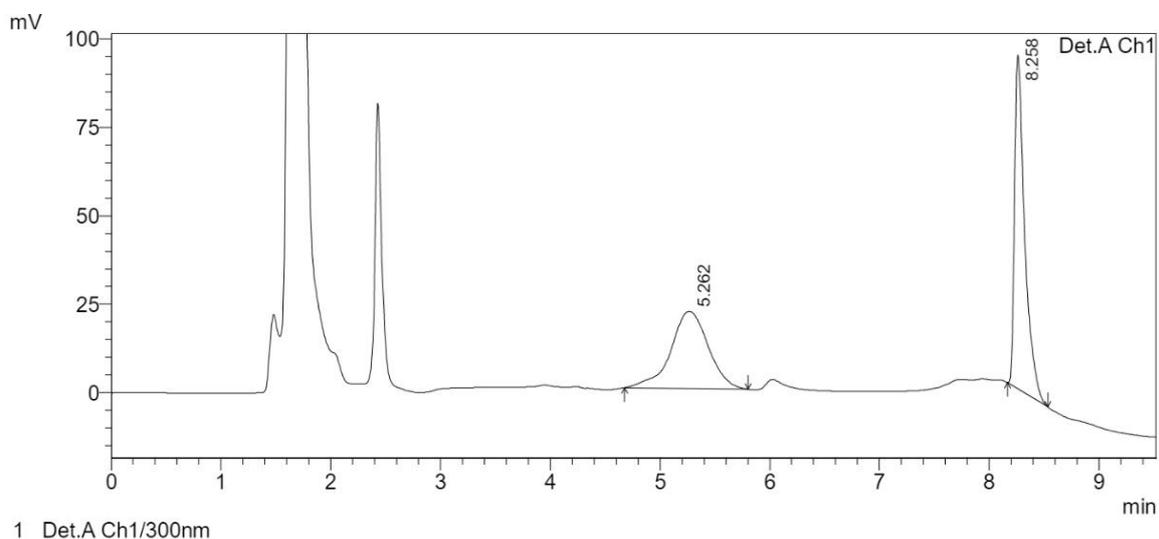
DONNEES BRUTES OBTENUES (STANDARD DE VALIDATION)													
NIVEAU CONC	Rep	SERIE 01				SERIE 02				SERIE 03			
		Concentrations Métronidazole mg/ml	Réponses Métronidazole	Réponses E.I	Rapport des réponses	Concentrations Métronidazole	Réponses Métronidazole	Réponses E.I	Rapport des réponses	Concentrations Métronidazole	Réponses Métronidazole	Réponses E.I	Rapport des réponses
1	1	0,0020	143146	579450	<b>0,25</b>	0,0020	136610	626455	<b>0,22</b>	0,0020	159274	571991	<b>0,28</b>
	2	0,0020	133390	592138	<b>0,23</b>	0,0020	132092	533057	<b>0,25</b>	0,0020	129590	616604	<b>0,21</b>
	3	0,0020	138247	626230	<b>0,22</b>	0,0020	144463	708500	<b>0,20</b>	0,0020	153291	652506	<b>0,23</b>
2	1	0,0040	282001	606064	<b>0,47</b>	0,0040	285085	614530	<b>0,46</b>	0,0040	320539	584404	<b>0,55</b>
	2	0,0040	279471	621933	<b>0,45</b>	0,0040	290140	607682	<b>0,48</b>	0,0040	272942	501357	<b>0,54</b>
	3	0,0040	287241	590492	<b>0,49</b>	0,0040	263194	614201	<b>0,43</b>	0,0040	290140	607682	<b>0,48</b>
3	1	0,0080	582597	592609	<b>0,98</b>	0,0080	573913	617437	<b>0,93</b>	0,0080	618151	642088	<b>0,96</b>
	2	0,0080	572493	627312	<b>0,91</b>	0,0080	577192	605657	<b>0,95</b>	0,0080	631900	629227	<b>1,00</b>
	3	0,0080	580620	590347	<b>0,98</b>	0,0080	557965	548875	<b>1,02</b>	0,0080	611479	584111	<b>1,05</b>
4	1	0,0160	1156872	597166	<b>1,94</b>	0,0160	1177475	588047	<b>2,00</b>	0,0161	1193334	627505	<b>1,90</b>
	2	0,0161	1185893	617563	<b>1,92</b>	0,0160	1177985	631516	<b>1,87</b>	0,0161	1244107	597112	<b>2,08</b>
	3	0,0161	947048	561301	<b>1,69</b>	0,0160	1053936	540322	<b>1,95</b>	0,0161	1279132	692380	<b>1,85</b>
5	1	0,0320	2350612	605591	<b>3,88</b>	0,0320	2458823	642600	<b>3,83</b>	0,0321	2374067	608921	<b>3,90</b>
	2	0,0321	2377224	605657	<b>3,93</b>	0,0320	2315970	642600	<b>3,60</b>	0,0321	2348101	654428	<b>3,59</b>
	3	0,0322	2529887	611744	<b>4,14</b>	0,0320	2358687	568984	<b>4,15</b>	0,0321	2536204	660979	<b>3,84</b>

### 2.3. Spécificité

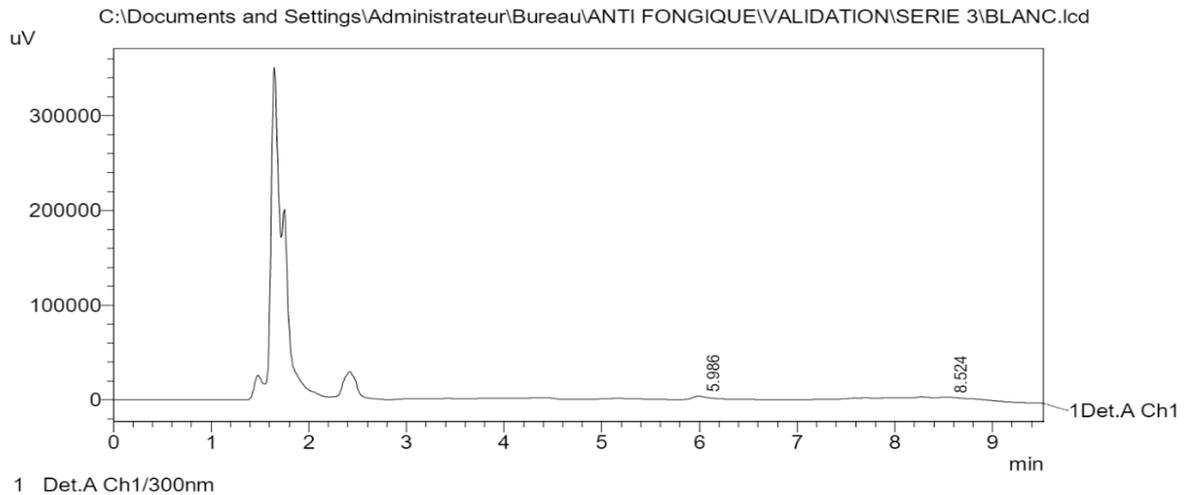
La spécificité est démontrée en comparant les chromatogrammes du standard de validation, du standard d'étalonnage, et du blanc (placebo).



**Figure 7: Chromatogramme du standard d'étalonnage**



**Figure 8: Chromatogramme du standard de validation**

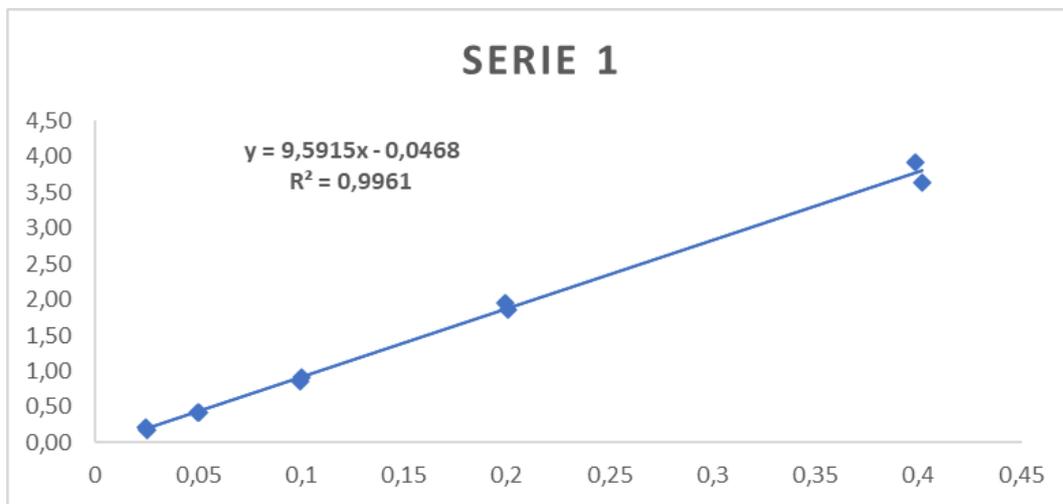


**Figure 9: Chromatogramme du placebo**

**2.4.Modèle  $Y= ax+b$**

**2.4.1 Fonction de réponse**

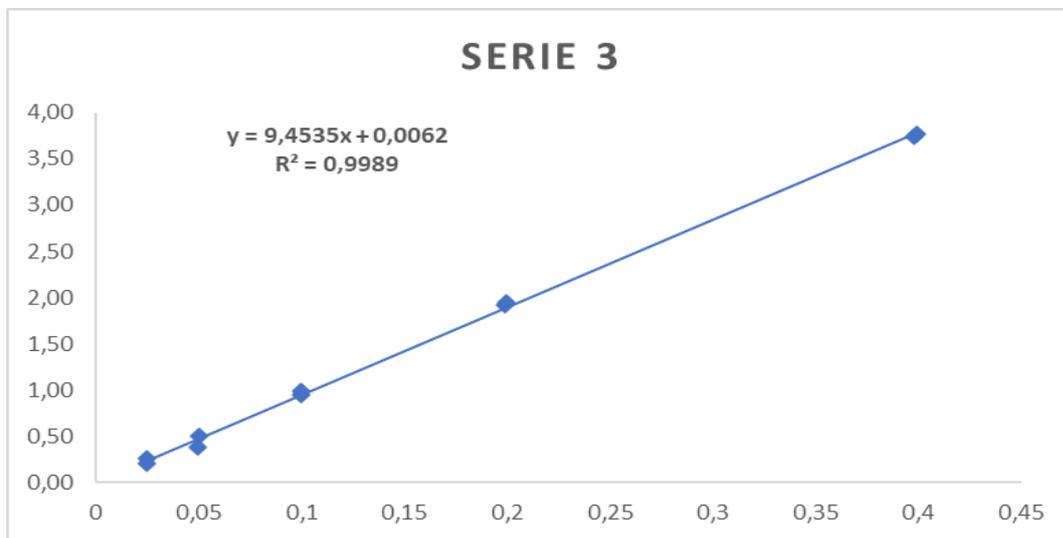
La relation entre la réponse instrumentale (l'air du pic), et la concentration introduite dans les SE, obtenue sur chacune des trois séries est représenté, pour ce modèle mathématique, comme suit :



**Figure 10: Courbe d'étalonnage obtenu avec la fonction  $y= ax+b$  pour la série1**



**Figure 11: Courbe d'étalonnage obtenu avec la fonction  $y = ax + b$  pour la série 2**



**Figure 12: Courbe d'étalonnage obtenu avec la fonction  $y = ax + b$  pour la série 3**

### 2.4.2 Alignement des observations

Pour pallier la variation de concentrations introduites pour chaque niveau, l'alignement des réponses sur la moyenne des concentrations introduites est exigé.

L'alignement des réponses obtenues avec les échantillons de validation est résumé dans le tableau suivant :

Tableau XX: Alignement des observations obtenues avec les SV des trois séries

Alignement des réponses		
Série 1	Série 2	Série 3
$Y_{ijk,c}$	$Y_{ijk,c}$	$Y_{ijk,c}$
0,25	0,22	0,28
0,23	0,25	0,21
0,22	0,20	0,23
0,47	0,46	0,55
0,45	0,48	0,54
0,49	0,43	0,48
0,98	0,93	0,96
0,91	0,95	1,00
0,98	1,02	1,05
1,94	2,00	1,90
1,92	1,87	2,08
1,69	1,95	1,85
3,88	3,83	3,90
3,92	3,60	3,59
4,13	4,15	3,84

### 2.4.3 Prédiction inverses

Les prises d'essai prédites avec la fonction de réponse choisie sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau XXI: Prédiction inverses obtenus avec les SV des trois séries

Prédiction inverses $x_{ijk,calc}$		
Série 1	Série 2	Série 3
$x_{ijk,calc}$	$x_{ijk,calc}$	$x_{ijk,calc}$
0,0025	0,0023	0,0023
0,0023	0,0025	0,0017
0,0023	0,0022	0,0019
0,0043	0,0043	0,0046
0,0041	0,0044	0,0046
0,0045	0,0040	0,0040
0,0086	0,0080	0,0081
0,0080	0,0082	0,0085
0,0087	0,0087	0,0088
0,0166	0,0165	0,0161
0,0164	0,0155	0,0177

0,0147	0,0162	0,0156
0,0329	0,0311	0,0331
0,0331	0,0294	0,0306
0,0354	0,0337	0,0325

#### 2.4.4 Fidélité

La fidélité de notre méthode est évaluée dans des conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Elle est calculée pour chaque niveau de concentration, exprimée en écart type et en termes de coefficients de variations. Les calculs des variances intra-série et inter-série et les CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont présentés comme suit :

**Tableau XXII: Calcul des écarts type, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire**

Variance intra-Série $\sigma^2w,j$	Variance inter-Série $\sigma^2B,j$	Ecartype de la répétabilité	Ecartype Intersérie	Ecartype de la fidélité intermédiaire	CV Répétabilité	CV Fidélité intermédiaire
0,00000004	0,00000002	0,00021	0,00015	0,00026	10,383	12,910
0,00000006	0,00000000	0,00024	0,00000	0,00024	5,979	5,979
0,00000011	0,00000000	0,00033	0,00000	0,00033	4,162	4,162
0,00000073	0,00000000	0,00085	0,00000	0,00085	5,318	5,318
0,00000280	0,00000063	0,00167	0,00080	0,00185	5,208	5,768

#### 2.4.5 Justesse

Pour chaque niveau de concentration des SV, la justesse est calculée en terme de biais absolu, biais relatif, et de pourcentage de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration comme mentionné dans le tableau ci-dessous :

**Tableau XXIII: Calcul de la justesse pour chaque niveau de concentration des SV**

Moyenne Concentrations Intro	Moyenne des concentrations prédites	Biais Absolus	Biais relatifs	% de Recouvrement
0,0020	0,0022	0,00022	10,799	110,799
0,0040	0,0043	0,00029	7,293	107,293
0,0080	0,0084	0,00038	4,724	104,724
0,01610	0,0162	0,00009	0,572	100,572
0,03213	0,0324	0,00031	0,955	100,955

#### 2.4.6 Erreur totale

L'erreur absolue et l'erreur totale relative calculées pour chaque niveau de concentrations sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau XXIV: Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des SV

ERREUR TOTALE		
Niveaux	Erreur Absolue	Erreur Relative
1	0,0005	23,709
2	0,0005	13,272
3	0,0007	8,887
4	0,0009	5,890
5	0,0022	6,723

#### 2.4.7 Intervalle de tolérance

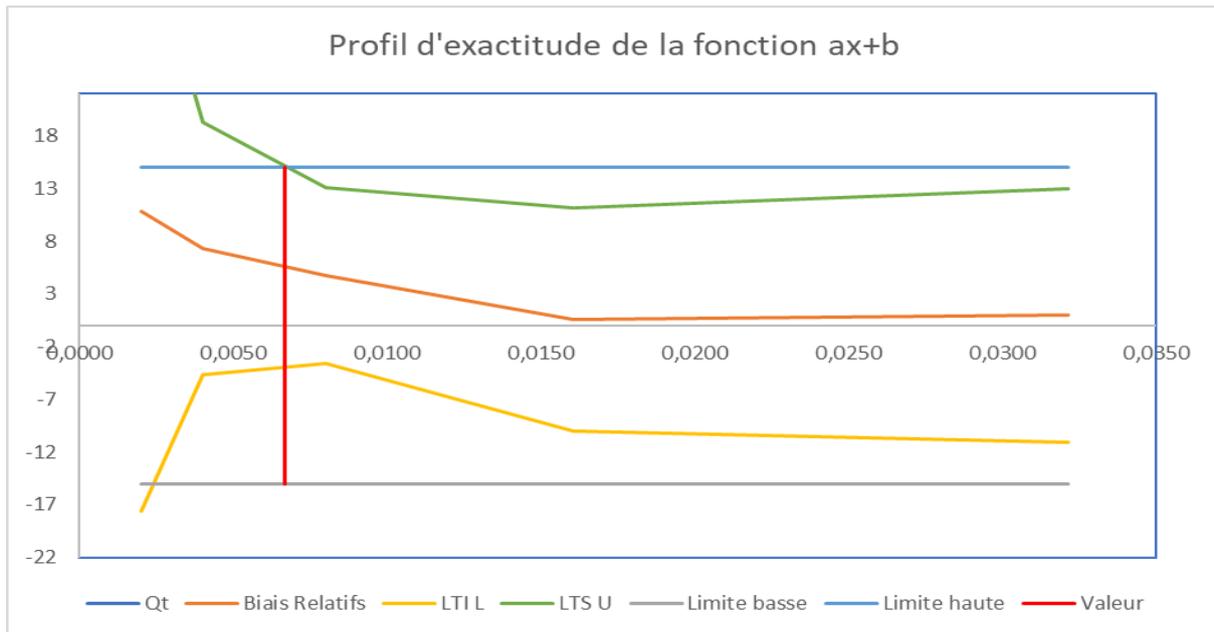
Les limites de tolérances sont calculées pour chaque niveau de concentration, les résultats obtenus sont présentés ci-dessous :

Tableau XXV: Calcul de l'intervalle de tolérance

Niveaux	Moy Intro	R	B	V	Qt	Biais Relatifs	CV FI	LTI L	LTS U
1	0,0020	0,546	0,766	5,188	2,01504837	10,799	12,910	-17,575	39,172
2	0,0040	0,000	1,000	7,714	1,89457861	7,293	5,979	-4,649	19,234
3	0,0080	0,000	1,000	7,714	1,89457861	4,724	4,162	-3,588	13,037
4	0,0161	0,000	1,000	7,714	1,89457861	0,572	5,318	-10,049	11,193
5	0,0321	0,226	0,855	6,519	1,94318028	0,955	5,768	-11,075	12,986

#### 2.4.8 Profil d'exactitude

Afin de valider la méthode de dosage du Métronidazole au niveau du plasma, nous avons opté pour le modèle de régression linéaire, illustré dans le profil d'exactitude qui est indiqué dans la figure qui suit :



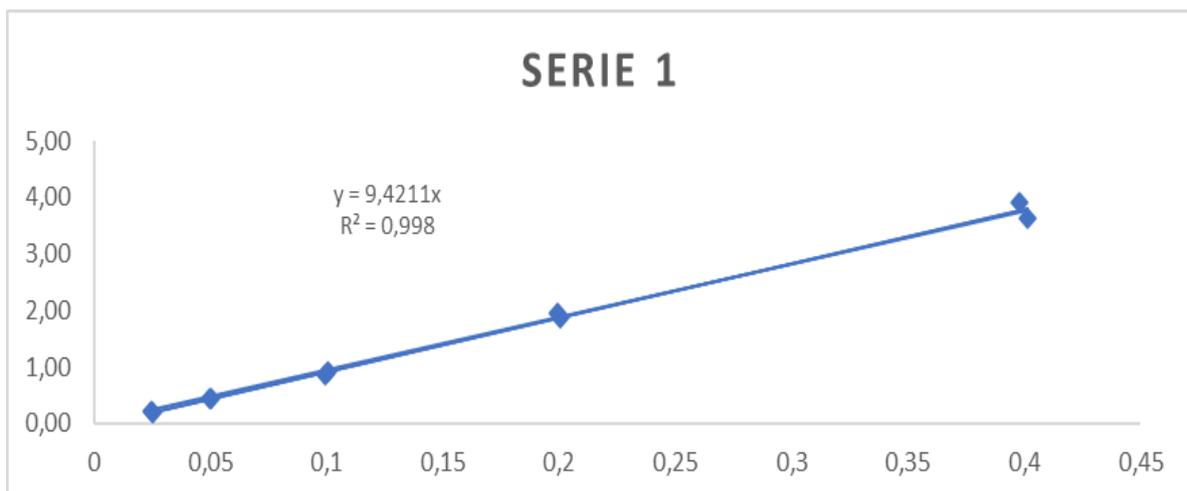
**Figure 13: Profil d'exactitude obtenue avec la fonction  $y=ax+b$**

L'intervalle de quantification déduit est de **0.0067 à 0.032 mg/ml**

## 2.5 Modèle $Y= ax$

### 2.5.1 Fonction de réponse

La relation entre la réponse instrumentale (l'air du pic) , et la concentration introduite dans les SE, obtenue sur chacune des trois séries est représenté, pour ce modèle mathématique, comme suit :



**Figure 14: Courbe d'étalonnage obtenu avec la fonction  $y= ax$  pour la série 1**



**Figure 15: Courbe d'étalonnage obtenu avec la fonction  $y = ax$  pour la série 2**



**Figure 16: Courbe d'étalonnage obtenu avec la fonction  $y = ax$  pour la série 3**

**2.5.2 Alignement des observations**

Pour pallier à la variation de concentrations introduites pour chaque niveau, l'alignement des réponses sur la moyenne des concentrations introduites est exigé.

L'alignement des réponses obtenues avec les échantillons de validation est résumé dans le tableau suivant :

**Tableau XXVI: Alignement des observations obtenus avec les SV des trois séries**

<b>Alignement des réponses</b>		
<b>Série 1</b>	<b>Série 2</b>	<b>Série 3</b>
Y <sub>ijk,c</sub>	Y <sub>ijk,c</sub>	Y <sub>ijk,c</sub>
0,25	0,22	0,28
0,23	0,25	0,21
0,22	0,20	0,23
0,47	0,46	0,55
0,45	0,48	0,54
0,49	0,43	0,48
0,98	0,93	0,96

0,91	0,95	1,00
0,98	1,02	1,05
1,94	2,00	1,90
1,92	1,87	2,08
1,69	1,95	1,85
3,88	3,83	3,90
3,92	3,60	3,59
4,13	4,15	3,84

### 2.5.3 Prédications inverses

Afin d'effectuer les prédictions inverses, et donc calculer des concentrations en retour avec la fonction de réponse, on s'assure qu'au sein d'un niveau de concentration, ses dernières sont toutes identiques.

Les prises d'essai prédites avec la fonction de réponse choisie sont présentées dans le tableau suivant :

**Tableau XXVII: Prédications inverses obtenus avec les SV des trois séries**

<b>Prédications inverses <math>x_{ijk,calc}</math></b>		
<b>Serie 1</b>	<b>Serie 2</b>	<b>Serie 3</b>
$x_{ijk,calc}$	$x_{ijk,calc}$	$x_{ijk,calc}$
0,0021	0,0018	0,0024
0,0019	0,0020	0,0018
0,0019	0,0017	0,0020
0,0040	0,0038	0,0047
0,0038	0,0039	0,0046
0,0042	0,0035	0,0040
0,0084	0,0076	0,0082
0,0078	0,0078	0,0086
0,0085	0,0083	0,0089
0,0165	0,0164	0,0161
0,0163	0,0153	0,0178
0,0146	0,0160	0,0156
0,0331	0,0313	0,0331
0,0333	0,0296	0,0306
0,0357	0,0340	0,0324

### 2.5.4 Fidélité

La fidélité de notre méthode est évaluée dans des conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Elle est calculée pour chaque niveau de concentration, exprimée en écart type et en termes de coefficients de variations. Les calculs des variances intra-série et inter-série et les CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont présentés comme suit :

**Tableau XXVIII: Calcul des écarts type, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire**

<b>Fidélité</b>						
<b>Variance intra-Série <math>\sigma^2w,j</math></b>	<b>Variance inter-Série <math>\sigma^2B,j</math></b>	<b>Ecartype de la répétabilité</b>	<b>Ecartype Intersérie</b>	<b>Ecartype de la fidélité intermédiaire</b>	<b>CV Répétabilité</b>	<b>CV Fidélité intermédiaire</b>
0,000000042	0,000000000	0,000205173	0,000000000	0,000205173	10,218	10,218
0,000000068	0,000000103	0,000260792	0,000320650	0,000413314	6,494	10,292
0,000000140	0,000000044	0,000373702	0,000209237	0,000428291	4,653	5,332
0,000000785	0,000000000	0,000885989	0,000000000	0,000885989	5,515	5,515
0,000002901	0,000000679	0,001703180	0,000823958	0,001892017	5,301	5,889

### 2.5.5 Justesse

Pour chaque niveau de concentration des SV, la justesse est calculée en terme de biais absolu, biais relatif, et de pourcentage de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration comme mentionné dans le tableau ci-dessous :

**Tableau XXIX: Calcul de la justesse pour chaque niveau de concentrations des SV**

<b>Moyenne Concentrations Intro</b>	<b>Moyenne des concentrations prédites</b>	<b>Biais Absolus</b>	<b>Biais relatifs</b>	<b>% de Recouvrement</b>
0.0020	0.0020	-0,00006	-2,830	97,170
0.0040	0.0041	0,00005	1,128	101,128
0.0080	0.0082	0,00019	2,349	102,349
0.0161	0.0161	0,00001	0,041	100,041
0.0321	0.0326	0,00045	1,399	101,399

### 2.5.6 Erreur totale

L'erreur absolue et l'erreur totale relative calculées pour chaque niveau de concentrations sont présentées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau XXX : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des SV**

<b>Niveau</b>	<b>Erreur Absolue</b>	<b>Erreur Relative</b>
<b>1</b>	0,000	13,048
<b>2</b>	0,000	11,420
<b>3</b>	0,001	7,682
<b>4</b>	0,001	5,557
<b>5</b>	0,002	7,288

--	--	--

### 2.5.7 Intervalle de tolérance

Les limites de tolérances sont calculées pour chaque niveau de concentration, les résultats obtenus sont présentés ci-dessous :

**Tableau XXXI: Calcul de l'intervalle de tolérance**

	Moy Intro	R	B	V	Qt	Biais Relatifs	CV FI	LTI L	LTS U
<b>1</b>	<b>0,0020</b>	0,000	1,000	7,714	<b>1,89457861</b>	-2,830	10,218	<b>-23,235</b>	<b>17,576</b>
<b>2</b>	<b>0,0040</b>	1,512	0,674	3,552	<b>2,35336343</b>	1,128	10,292	<b>-25,895</b>	<b>28,152</b>
<b>3</b>	<b>0,0080</b>	0,313	0,823	6,091	<b>1,94318028</b>	2,349	5,332	<b>-8,830</b>	<b>13,529</b>
<b>4</b>	<b>0,0161</b>	0,000	1,000	7,714	<b>1,89457861</b>	0,041	5,515	<b>-10,973</b>	<b>11,056</b>
<b>5</b>	<b>0,0321</b>	0,234	0,851	6,479	<b>1,94318028</b>	1,399	5,889	<b>-10,890</b>	<b>13,688</b>

### 2.5.8 Profil d'exactitude

Afin de valider la méthode de dosage du Métronidazole au niveau du plasma, nous avons opté pour le modèle de régression linéaire, illustré dans le profil d'exactitude qui est indiqué dans la figure qui suit :

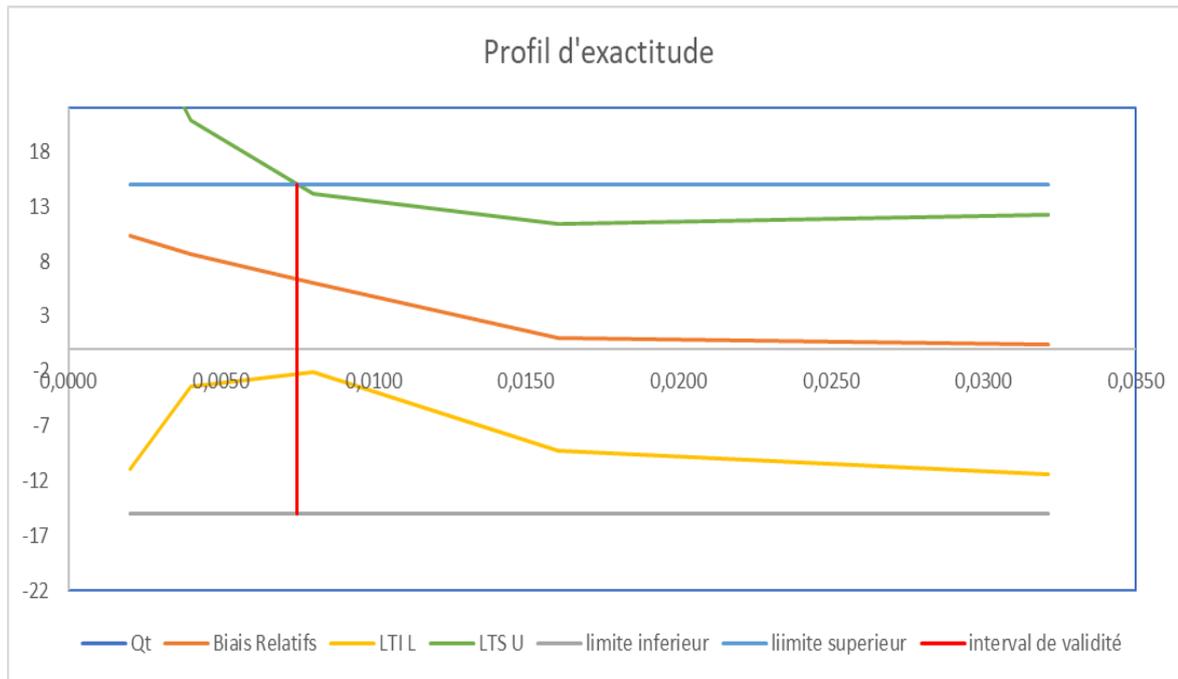


Figure 17: Profil d'exactitude obtenu avec la fonction  $y=ax$

L'intervalle de quantification déduit est de 0,0075 à 0,032 mg/ml.

### 2.6. Modèle $\sqrt{y} = a\sqrt{x} + b$

Les données brutes ont été transformées pour les concentrations en  $\sqrt{x}$  et pour les réponses en  $\sqrt{y}$ .

Tableau XXXII: Résultats obtenus sur la gamme SV pour la réponse  $\sqrt{y}=a\sqrt{x}+b$

STANDARD DE VALIDATION							
NIVEAU CONC	Rep	SERIES i					
		Série 1		Série 2		Série 3	
		Quantités introduites	Réponse instrumentale corrigée	Quantités introduites	Réponse instrumentale corrigée	Quantités introduites	Réponse instrumentale corrigée
J	K						
1	1	0,16	0,50	0,16	0,47	0,16	0,53
	2	0,16	0,47	0,16	0,50	0,16	0,46
	3	0,16	0,47	0,16	0,45	0,16	0,48
2	1	0,22	0,68	0,22	0,68	0,22	0,74
	2	0,22	0,67	0,22	0,69	0,22	0,74
	3	0,22	0,70	0,22	0,65	0,22	0,69
3	1	0,32	0,99	0,32	0,96	0,32	0,98
	2	0,32	0,96	0,32	0,98	0,32	1,00
	3	0,32	0,99	0,32	1,01	0,32	1,02
4	1	0,45	1,39	0,45	1,42	0,45	1,38

## PARTIE PRATIQUE Résultats

	<b>2</b>	0,45	1,39	0,45	1,37	0,45	1,44
	<b>3</b>	0,45	1,30	0,45	1,40	0,45	1,36
<b>5</b>	<b>1</b>	0,63	1,97	0,63	1,96	0,63	1,97
	<b>2</b>	0,63	1,98	0,63	1,90	0,63	1,89
	<b>3</b>	0,63	2,03	0,63	2,04	0,63	1,96

### 2.6.1 Fonction de réponse

La relation entre la réponse instrumentale (l'air du pic), et la concentration introduite dans les SE, obtenue sur chacune des trois séries est représenté, pour ce modèle mathématique, comme suit :

Tableau XXXIII: Résultats obtenus sur la gamme SE pour la réponse  $\sqrt{y}=a\sqrt{x}+b$ 

STANDARD D'ETALONNAGE							
NIVEAU CONC	Rep	SERIES <i>i</i>					
		Serie 1		Serie 2		Serie 3	
		Rapport des Concentration	Rapport des Réponses	Rapport des Concentration	Rapport des Réponses	Rapport des Concentration	Rapport des Réponses
J	K	X	Y	X	Y	x	Y
1		0,1577593	0,46	0,1583407	0,42	0,1580156	0,52
		0,15841	0,43	0,1580156	0,47	0,1576532	0,46
2		0,2231053	0,65	0,2239275	0,61	0,2234678	0,71
		0,2240256	0,65	0,2234678	0,63	0,2229553	0,62
3		0,3155186	0,93	0,3166813	1,01	0,3160311	0,99
		0,31682	0,95	0,3160311	0,97	0,3153064	0,97
4		0,4462106	1,40	0,447855	1,39	0,4469355	1,40
		0,4480511	1,37	0,4469355	1,38	0,4459105	1,38
5		0,6310371	1,98	0,6333627	2,04	0,6320623	1,94
		0,63364	1,90	0,6320623	1,93	0,6306127	1,93

A partir du tableau ci-dessus, nous traçons les courbes d'étalonnage des trois séries de SE.

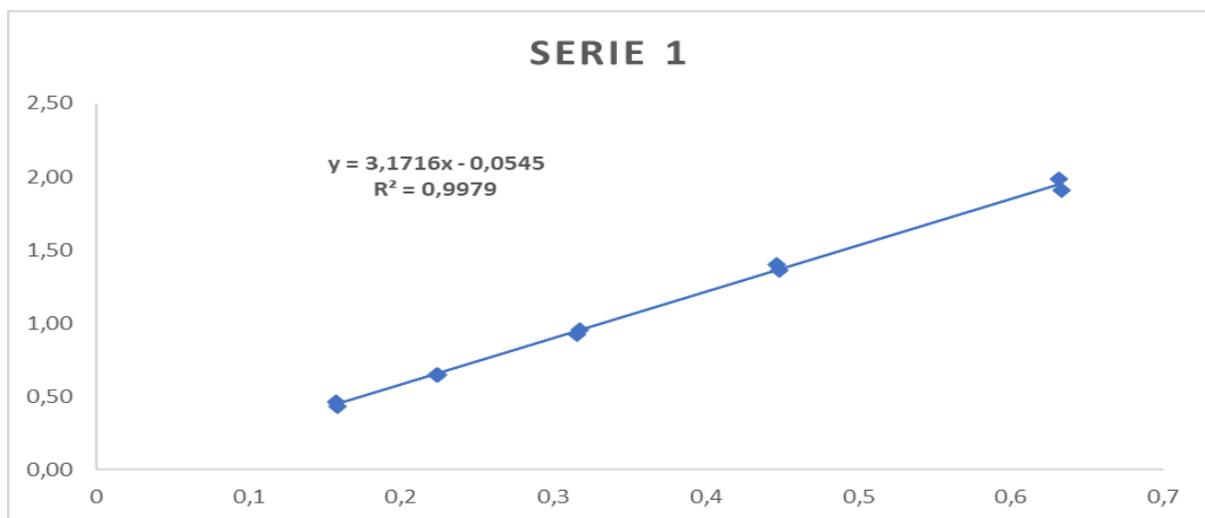
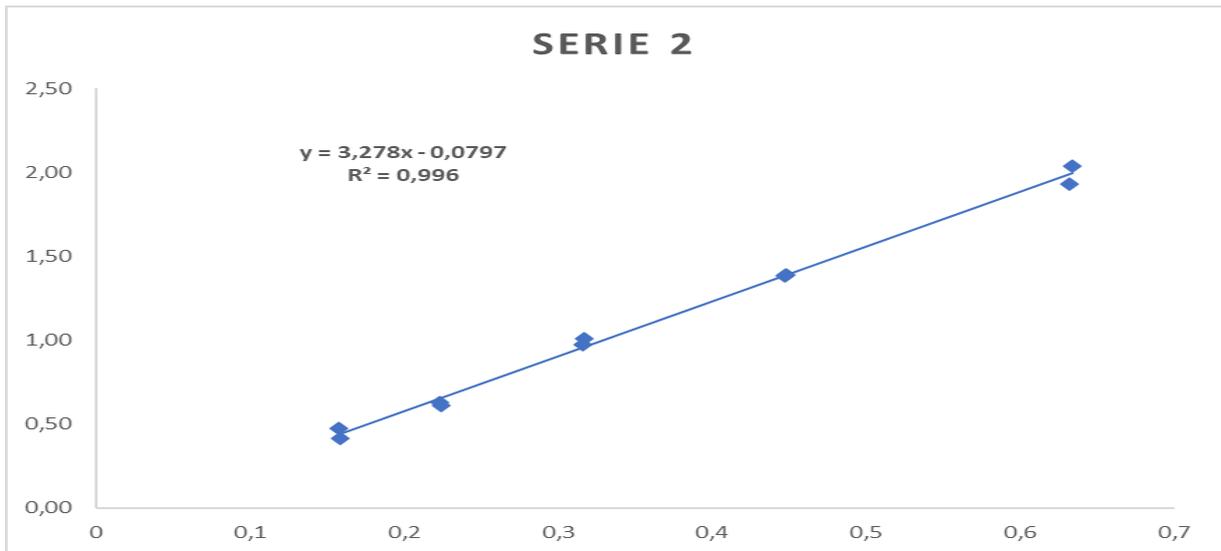
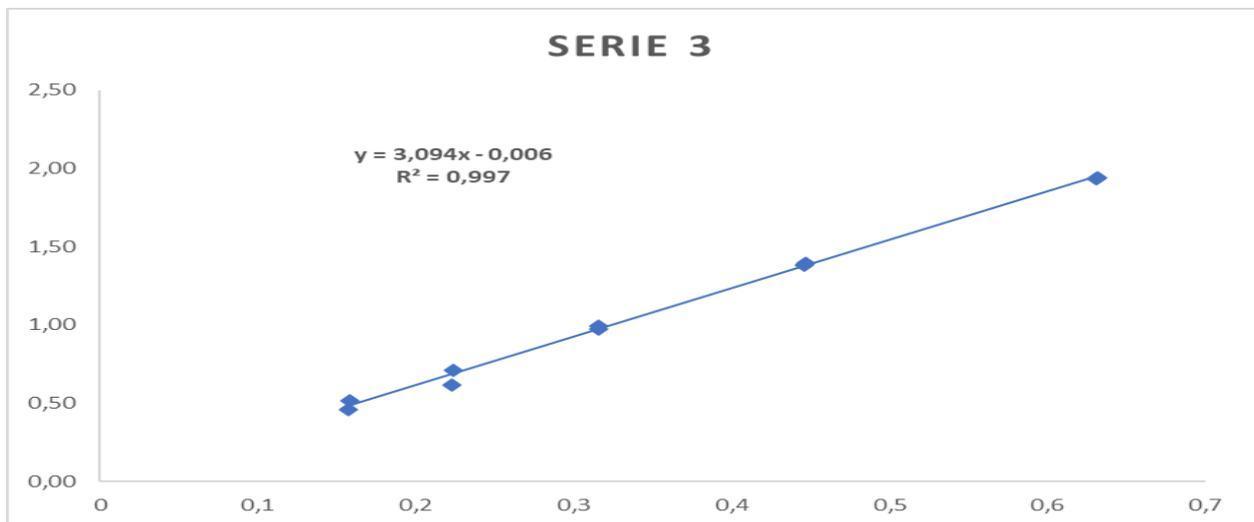


Figure 18: Courbe d'étalonnage obtenu avec la fonction  $\sqrt{y}=a\sqrt{x}+b$  pour la série 1



**Figure 19: Courbe d'étalonnage obtenue avec la fonction  $\sqrt{y}=a\sqrt{x}+b$  pour la série 2**



**Figure 20: Courbe d'étalonnage obtenue avec la fonction  $\sqrt{y}=a\sqrt{x}+b$  pour la série 3**

### 2.6.2 Alignement des observations

Pour pallier à la variation de concentrations introduites pour chaque niveau, l'alignement des réponses sur la moyenne des concentrations introduites est exigé.

L'alignement des réponses obtenues avec les échantillons de validation est résumé dans le tableau suivant :

Tableau XXXIV: Alignement des observations obtenus avec les SV des trois séries

Alignement des réponses		
Serie 1	Serie 2	Serie 3
Yijk,c	Yijk,c	Yijk,c
0,50	0,47	0,53
0,47	0,50	0,46
0,47	0,45	0,48
0,68	0,68	0,74
0,67	0,69	0,74
0,70	0,65	0,69
0,99	0,96	0,98
0,96	0,98	1,00
0,99	1,01	1,02
1,39	1,42	1,38
1,39	1,37	1,44
1,30	1,40	1,36
1,97	1,96	1,97
1,98	1,90	1,89
2,03	2,04	1,96

### 2.6.3 Prédiction inverses

Afin d'effectuer les prédictions inverses, et donc calculer des concentrations en retour avec la fonction de réponse, on s'assure qu'au sein d'un niveau de concentration, ces dernières sont toutes identiques.

Les prises d'essai prédites avec la fonction de réponse choisie sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau XXXV: Prédiction inverses obtenus avec les SV des trois séries

Prédiction inverses xijk,calc		
Serie 1	Serie 2	Serie 3
xijk,calc	xijk,calc	xijk,calc
0,0024	0,0022	0,0024
0,0022	0,0025	0,0018
0,0022	0,0021	0,0020
0,0043	0,0043	0,0047

## PARTIE PRATIQUE Résultats

0,0042	0,0044	0,0047
0,0046	0,0040	0,0041
0,0087	0,0081	0,0082
0,0081	0,0083	0,0086
0,0088	0,0089	0,0089
0,0167	0,0167	0,0161
0,0165	0,0156	0,0177
0,0148	0,0163	0,0156
0,0328	0,0309	0,0330
0,0330	0,0293	0,0305
0,0352	0,0335	0,0323

### 2.6.4 Fidélité

La fidélité de notre méthode est évaluée dans des conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Elle est calculée pour chaque niveau de concentration, exprimée en écart type et en termes de coefficients de variations. Les calculs des variances intra-série et inter-série et les CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont présentés comme suit :

**Tableau XXXVI: Calcul des écarts type, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire**

Fidélité						
Variance intra-Série $\sigma^2w,j$	Variance inter-Série $\sigma^2B,j$	Ecartype de la répétabilité	Ecartype Intersérie	Ecartype de la fidélité intermédiaire	CV Répétabilité	CV Fidélité intermédiaire
0,000000046	0,000000000	0,000213466	0,000000000	0,000213466	10,631	10,631
0,000000060	0,000000000	0,000244505	0,000000000	0,000244505	6,088	6,088
0,000000106	0,000000000	0,000326328	0,000000000	0,000326328	4,063	4,063
0,000000692	0,000000000	0,000831768	0,000000000	0,000831768	5,178	5,178
0,000002678	0,000000662	0,001636549	0,000813363	0,001827526	5,094	5,688

### 2.6.5 Justesse

Pour chaque niveau de concentration des SV, la justesse est calculée en terme de biais absolu, biais relatif, et de pourcentage de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration comme mentionné dans le tableau ci-dessous :

**Tableau XXXVII: Calcul de la justesse pour chaque niveau de concentration des SV**

<b>Moyenne Concentrations Intro</b>	<b>Moyenne des concentrations prédites</b>	<b>Biais Absolus</b>	<b>Biais relatifs</b>	<b>% de Recouvrement</b>
0,0020	0,0022	0,000	10,353	110,353
0,0040	0,0044	0,000	8,722	108,722
0,0080	0,0085	0,000	6,035	106,035
0,0161	0,162	0,000	1,029	101,029
0,0321	0,0323	0,000	0,420	100,420

### 2.6.6 Erreur totale

L'erreur absolue et l'erreur totale relative calculées pour chaque niveau de concentrations sont présentées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau XXXVIII: Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des SV**

<b>Niveau</b>	<b>Erreur Absolue</b>	<b>Erreur Relative</b>
1	<b>0,000</b>	<b>20,984</b>
2	<b>0,001</b>	<b>14,810</b>
3	<b>0,001</b>	<b>10,098</b>
4	<b>0,001</b>	<b>6,207</b>
5	<b>0,002</b>	<b>6,108</b>

### 2.6.7 Intervalle de tolérance

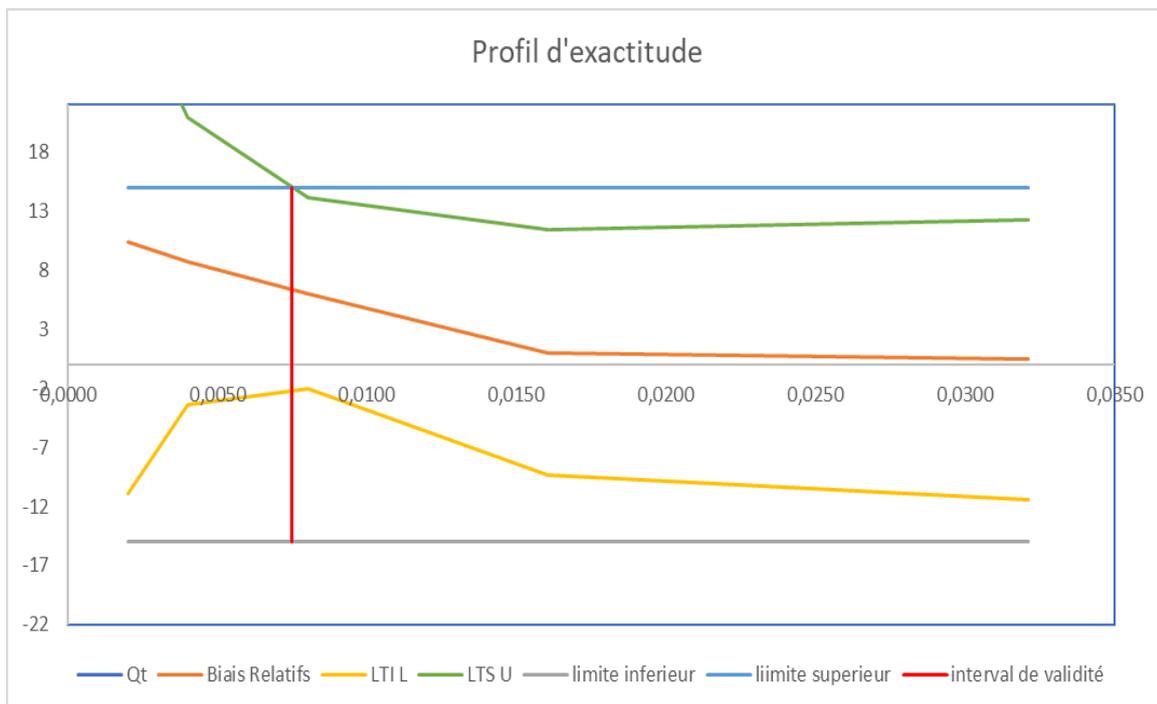
Les limites de tolérances sont calculées pour chaque niveau de concentration, les résultats obtenus sont présentés ci-dessous :

**Tableau XXXIX: Calcul de l'intervalle de tolérance**

	<i>Moy Intro</i>	<i>R</i>	<i>B</i>	<i>V</i>	<i>Qt</i>	<i>Biais Relatifs</i>	<i>CV FI</i>	<i>LTI L</i>	<i>LTS U</i>
1	<b>0,0020</b>	0,000	1,000	7,714	<b>1,89457861</b>	10,353	10,631	<b>-10,877</b>	<b>31,583</b>
2	<b>0,0040</b>	0,000	1,000	7,714	<b>1,89457861</b>	8,722	6,088	<b>-3,437</b>	<b>20,881</b>
3	<b>0,0080</b>	0,000	1,000	7,714	<b>1,89457861</b>	6,035	4,063	<b>-2,079</b>	<b>14,149</b>
4	<b>0,0161</b>	0,000	1,000	7,714	<b>1,89457861</b>	1,029	5,178	<b>-9,311</b>	<b>11,370</b>
5	<b>0,0321</b>	0,247	0,846	6,413	<b>1,94318028</b>	0,420	5,688	<b>-11,460</b>	<b>12,300</b>

**2.6.8 Profil d'exactitude**

Afin de valider la méthode de dosage du Métronidazole au niveau du plasma, nous avons opté pour le modèle de régression linéaire, illustré dans le profil d'exactitude qui est indiqué dans la figure qui suit :



**Figure 21: Profil d'exactitude obtenu avec la fonction  $\sqrt{y}=a\sqrt{x}+b$**

L'intervalle de quantification déduit est de 0.0075 à 0.032 mg/ml.

2.7. Modèle  $lny = alnx + b$ 

Les données brutes ont été transformées pour les concentrations en  $\ln x$  et pour les réponses en  $\ln y$ .

Tableau XL: Résultats obtenus sur la gamme SV pour la réponse  $\ln y = a \ln x + b$ 

STANDARDS DE VALIDATION							
NIVEAU CONC	Rep	SERIES i					
		Série 1		Série 2		Série 3	
		Quantités introduites	Réponse instrumental e corrigée	Quantités introduites	Réponse instrumental e corrigée	Quantités introduites	Réponse instrumental e corrigée
J	k						
1		-3,69	-1,40	-3,69	-1,52	-3,69	-1,28
		-3,69	-1,49	-3,69	-1,40	-3,69	-1,56
		-3,69	-1,51	-3,69	-1,59	-3,69	-1,45
2		-3,00	-0,77	-2,99	-0,77	-3,00	-0,60
		-3,00	-0,80	-3,00	-0,74	-3,00	-0,61
		-2,99	-0,72	-2,99	-0,85	-2,99	-0,74
3		-2,31	-0,02	-2,30	-0,07	-2,30	-0,04
		-2,30	-0,09	-2,30	-0,05	-2,31	0,00
		-2,30	-0,02	-2,30	0,02	-2,30	0,05
4		-1,61	0,66	-1,61	0,69	-1,61	0,64
		-1,61	0,65	-1,61	0,62	-1,62	0,73
		-1,61	0,52	-1,61	0,67	-1,61	0,61
5		-0,92	1,36	-0,91	1,34	-0,92	1,36
		-0,92	1,37	-0,92	1,28	-0,92	1,28
		-0,92	1,42	-0,92	1,42	-0,91	1,34

## 2.7.1 Fonction de réponse

La relation entre la réponse instrumentale (l'air du pic), et la concentration introduite dans les SE, obtenue sur chacune des trois séries est représenté, pour ce modèle mathématique, comme suit :

Tableau XLI: Résultats obtenus sur la gamme SE pour la réponse  $\ln y = a \ln x + b$

NIVEAU CONC	Rep	STANDARDS D'ETALONNAGE					
		Série 1		Série 2		Série 3	
		Rapport des Concentration	Rapport des Réponses	Rapport des Concentration	Rapport des Réponses	Rapport des Concentration	Rapport des Réponses
J	K	X	Y	X	y	X	Y
1		-3,6933699	-1,54	-3,6860129	-1,75	-3,6901234	-1,32
		-3,6851374	-1,69	-3,6901234	-1,50	-3,6947154	-1,56
2		-3,0002227	-0,85	-2,9928657	-0,98	-2,9969762	-0,68
		-2,9919902	-0,85	-2,9969762	-0,93	-3,0015683	-0,97
3		-2,3070756	-0,15	-2,2997185	0,02	-2,303829	-0,01
		-2,298843	-0,10	-2,303829	-0,06	-2,3084211	-0,06
4		-1,6139284	0,67	-1,6065713	0,66	-1,6106818	0,67
		-1,6056959	0,62	-1,6106818	0,65	-1,6152739	0,65
5		-0,9207812	1,37	-0,9134242	1,43	-0,9175347	1,33
		-0,9125487	1,29	-0,9175347	1,32	-0,9221267	1,32

A partir des données du tableau ci-dessus, nous traçons les courbes d'étalonnage des trois séries de SE.

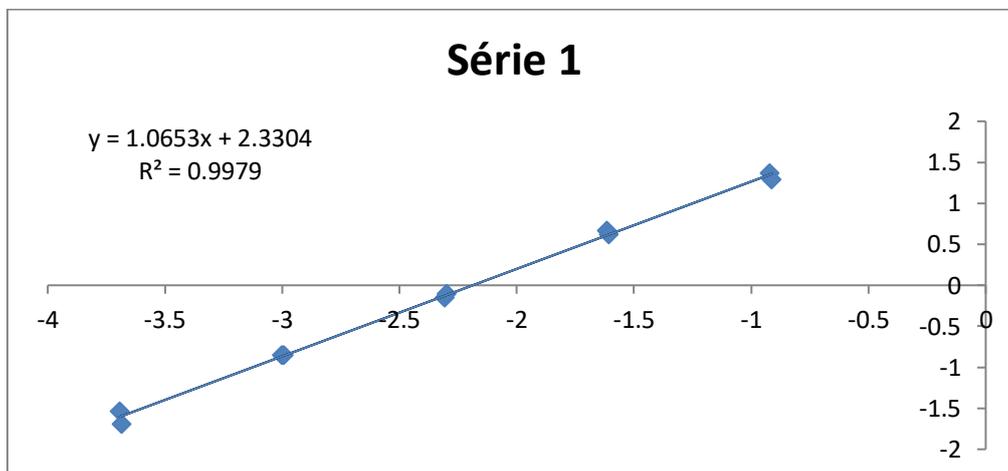


Figure 22: Courbe d'étalonnage obtenue avec la fonction  $\ln y = a \ln x + b$  pour la série 1

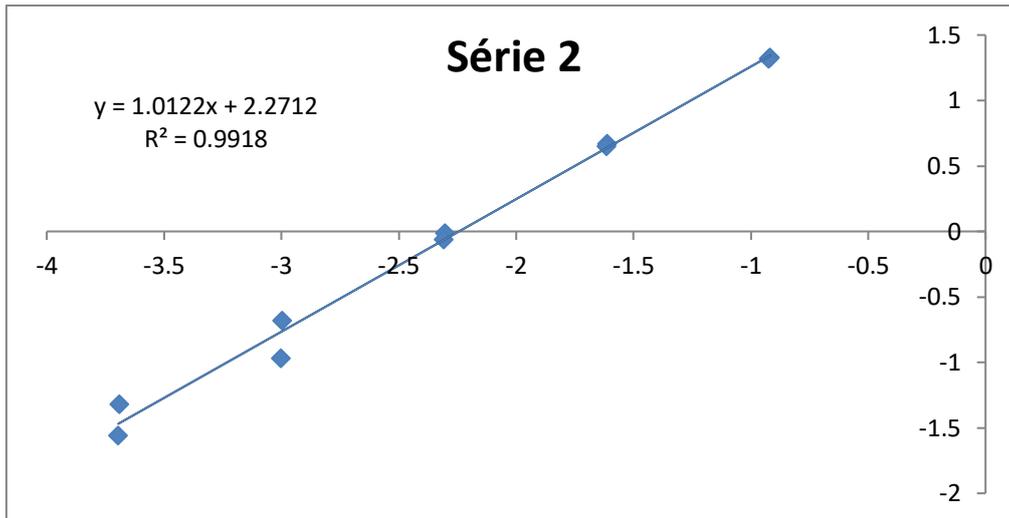


Figure 23: Courbe d'étalonnage obtenue avec la fonction  $\ln y = a \ln x + b$  pour la série 2

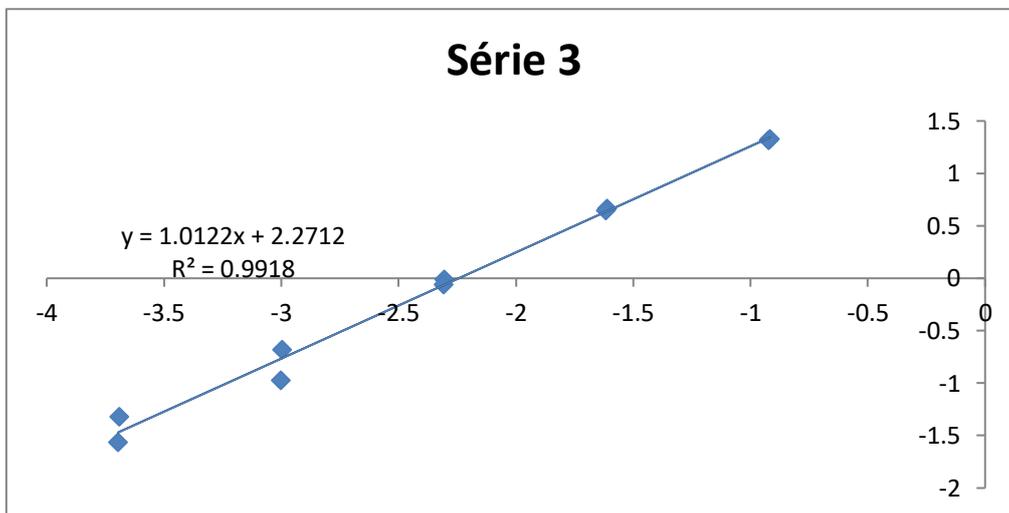


Figure 24: Courbe d'étalonnage obtenue avec la fonction  $\ln y = a \ln x + b$  pour la série 3

### 2.7.2 Alignement des observations

Pour pallier la variation de concentrations introduites pour chaque niveau, l'alignement des réponses sur la moyenne des concentrations introduites est exigé.

L'alignement des réponses obtenues avec les échantillons de validation est résumé dans le tableau suivant :

Tableau XLII: Alignement des observations obtenus avec les SV des trois séries

Alignement des réponses		
Série 1	Série 2	Série 3
Y <sub>ijk,c</sub>	Y <sub>ijk,c</sub>	Y <sub>ijk,c</sub>
-1,40	-1,52	-1,28
-1,49	-1,40	-1,56
-1,51	-1,59	-1,45
-0,77	-0,77	-0,60
-0,80	-0,74	-0,61
-0,72	-0,85	-0,74
-0,02	-0,07	-0,04
-0,09	-0,05	0,00
-0,02	0,02	0,05
0,66	0,69	0,64
0,65	0,62	0,73
0,52	0,67	0,61
1,36	1,34	1,36
1,37	1,28	1,28
1,42	1,42	1,34

### 2.7.3 Prédications inverses

Afin d'effectuer les prédictions inverses, et donc calculer des concentrations en retour avec la fonction de réponse, on s'assure qu'au sein d'un niveau de concentration, ses dernières sont toutes identiques.

Les prises d'essai prédites avec la fonction de réponse choisie sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau XLIII: Prédications inverses obtenus avec les SV des trois séries

Prédications inverses x <sub>ijk,calc</sub>		
Série 1	Série 2	Serie 3
x <sub>ijk,calc</sub>	x <sub>ijk,calc</sub>	x <sub>ijk,calc</sub>
0,0024	0,0022	0,0024
0,0022	0,0025	0,0018
0,0022	0,0021	0,0020
0,0044	0,0044	0,0047

0,0042	0,0046	0,0047
0,0046	0,0041	0,0041
0,0089	0,0083	0,0082
0,0082	0,0085	0,0086
0,0090	0,0091	0,0089
0,0168	0,0168	0,0161
0,0166	0,0158	0,0177
0,0149	0,0164	0,0156
0,0322	0,0302	0,0328
0,0324	0,0287	0,0303
0,0346	0,0326	0,0321

#### 2.7.4 Fidélité

La fidélité de notre méthode est évaluée dans des conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Elle est calculée pour chaque niveau de concentration, exprimée en écart type et en termes de coefficients de variations. Les calculs des variances intra-série et inter-série et les CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont présentés comme suit :

**Tableau XLIV: Calcul des écarts type, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire**

<b>Fidélité</b>						
<b>Variance intra-Série <math>\sigma^2_{w,j}</math></b>	<b>Variance inter-Série <math>\sigma^2_{B,j}</math></b>	<b>Ecartype de la répétabilité</b>	<b>Ecartype Intersérie</b>	<b>Ecartype de la fidélité intermédiaire</b>	<b>CV Répétabilité</b>	<b>CV Fidélité intermédiaire</b>
0,00000	0,00000	0,00021	0,00000	0,00021	10,553	10,553
0,00000	0,00000	0,00024	0,00000	0,00024	5,959	5,959
0,00000	0,00000	0,00033	0,00000	0,00033	4,074	4,074
0,00000	0,00000	0,00081	0,00000	0,00081	5,051	5,051
0,00000	0,00000	0,00155	0,00091	0,00180	4,825	5,592

**2.7.5 Justesse**

Pour chaque niveau de concentration des SV, la justesse est calculée en termes de biais absolu, biais relatif, et de pourcentage de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration comme mentionné dans le tableau ci-dessous :

**Tableau XLV: Calcul de la justesse pour chaque niveau de concentration des SV**

<b>Moyenne Concentrations Intro</b>	<b>Moyenne des concentrations prédites</b>	<b>Biais Absolus</b>	<b>Biais relatifs</b>	<b>% de Recouvrement</b>
0.0020	0.0022	0,000	10,402	110,402
0.0040	0.0044	0,000	10,340	110,340
0.0080	0.0086	0,001	7,583	107,583
0.0161	0.0163	0,000	1,421	101,421
0.0321	0.0318	0,000	-1,068	98,932

**2.7.6 Erreur totale**

L'erreur absolue et l'erreur totale relative calculées pour chaque niveau de concentrations sont présentées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau XLVI: Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des SV**

<b>Niveau</b>	<b>Erreur Absolue</b>	<b>Erreur Relative</b>
<b>1</b>	0,000	20,955
<b>2</b>	0,001	16,299
<b>3</b>	0,001	11,657
<b>4</b>	0,001	6,473
<b>5</b>	0,002	6,660

**2.7.7 Intervalle de tolérance:**

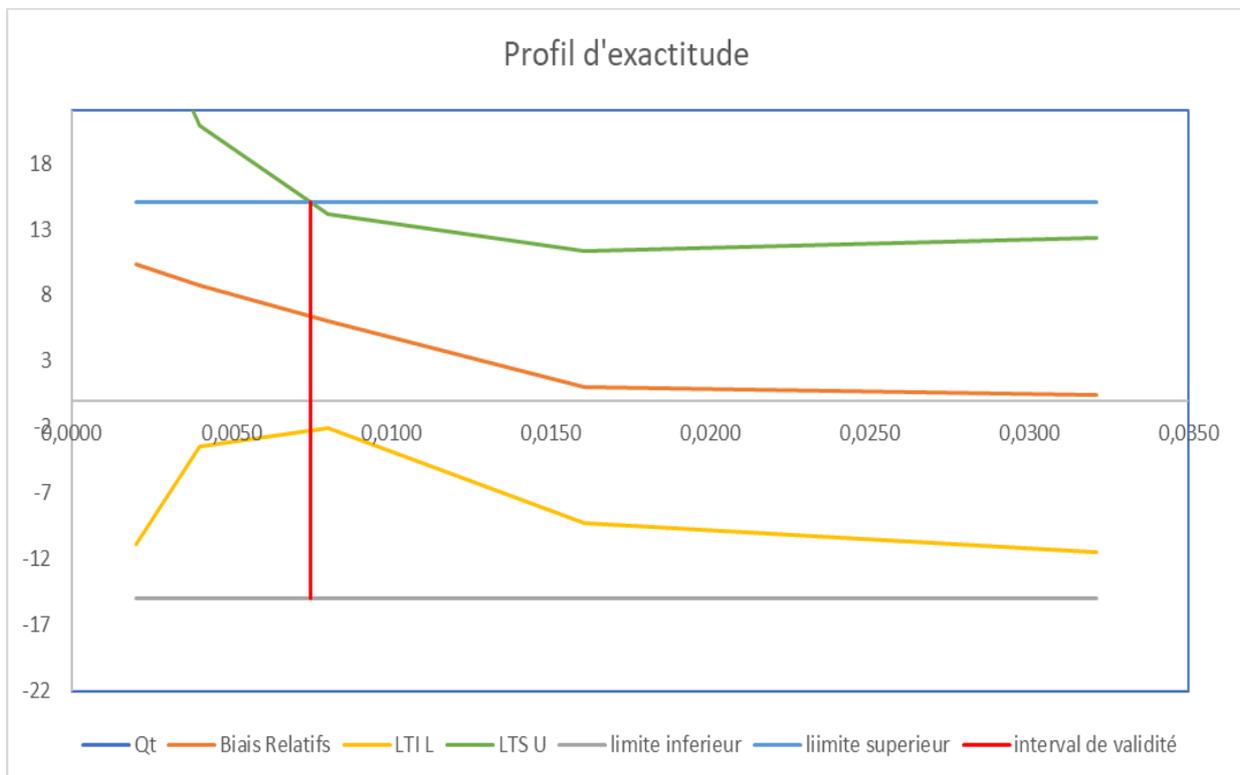
Les limites de tolérances sont calculées pour chaque niveau de concentration, les résultats obtenus sont présentés ci-dessous :

**Tableau XLVII: Calcul de l'intervalle de tolérance**

Moy Intro	R	B	V	Qt	Biais Relatifs	CV FI	LTI L	LTS U
<b>0,0020</b>	0,000	1,000	7,714	<b>1,89457861</b>	10,402	10,553	<b>-10,673</b>	<b>31,477</b>
<b>0,0040</b>	0,000	1,000	7,714	<b>1,89457861</b>	10,340	5,959	<b>-1,560</b>	<b>22,240</b>
<b>0,0080</b>	0,000	1,000	7,714	<b>1,89457861</b>	7,583	4,074	<b>-0,553</b>	<b>15,719</b>
<b>0,0161</b>	0,000	1,000	7,714	<b>1,89457861</b>	1,421	5,051	<b>-8,667</b>	<b>11,509</b>
<b>0,0321</b>	0,343	0,814	5,956	<b>2,01504837</b>	-1,068	5,592	<b>-13,246</b>	<b>11,110</b>

**2.7.8 Profil d'exactitude**

Afin de valider la méthode de dosage du Métronidazole au niveau du plasma, nous avons opté pour le modèle de régression linéaire, illustré dans le profil d'exactitude qui est indiqué dans la figure qui suit :



**Figure 25: Profil d'exactitude obtenu avec la fonction  $\ln y = a \ln x + b$**

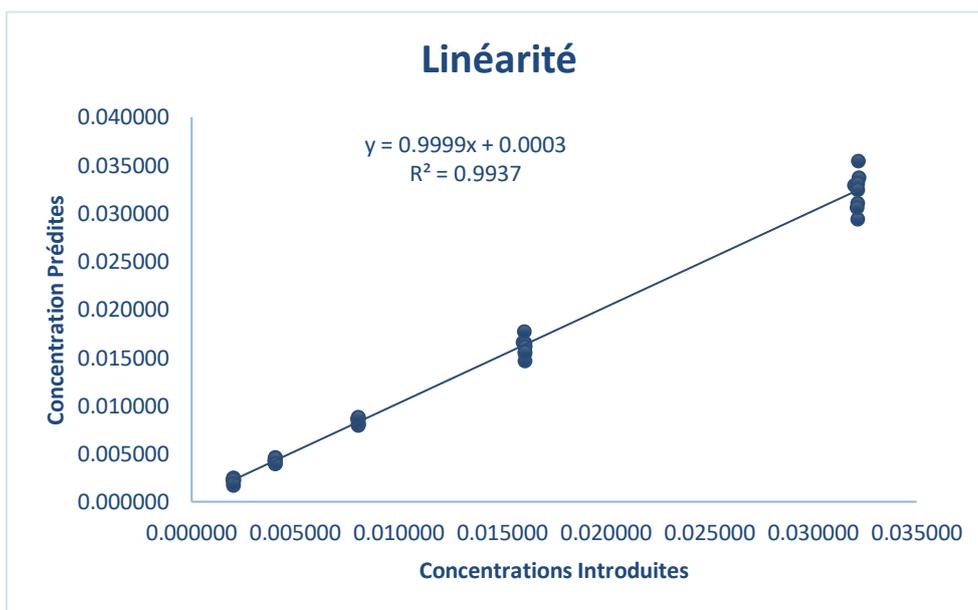
L'intervalle de quantification déduit est de 0.0075 à 0.032 mg/ml.

**2.8 Etude de linéarité**

Pour la fonction choisie  $ax+b$ , un modèle de régression linéaire a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante :  $y = 0,9933x + 0,0004$

**Tableau XLVIII : Concentrations prédites en fonction des concentrations introduites pour les trois séries**

Niveau	Rep	Serie 1		Serie 2		Serie 3	
		Quant intro	QuantPréd	Quant intro	QuantPréd	Quant intro	QuantPréd
1	1	0,002000	0,002430	0,002009	0,002228	0,002009	0,002393
	2	0,002008	0,002227	0,002009	0,002497	0,002008	0,001820
	3	0,002010	0,002222	0,002012	0,002112	0,002009	0,002015
2	1	0,004000	0,004335	0,004018	0,004316	0,004017	0,004683
	2	0,004016	0,004179	0,004017	0,004447	0,004015	0,004668
	3	0,004021	0,004569	0,004024	0,004034	0,004018	0,004065
3	1	0,007999	0,008741	0,008035	0,008124	0,008034	0,008188
	2	0,008032	0,008111	0,008034	0,008347	0,008030	0,008574
	3	0,008041	0,008845	0,008048	0,008856	0,008035	0,008864
4	1	0,015998	0,016714	0,016070	0,016660	0,016068	0,016118
	2	0,016064	0,016500	0,016068	0,015642	0,016060	0,017725
	3	0,016082	0,014801	0,016096	0,016307	0,016070	0,015598
5	1	0,031996	0,032754	0,032140	0,030905	0,032136	0,032959
	2	0,032128	0,032962	0,032136	0,029296	0,032120	0,030465
	3	0,032164	0,035228	0,032192	0,033490	0,032140	0,032309



**Figure 26: Courbe de linéarité obtenue avec la fonction  $y=ax+b$**

Le tableau suivant résume les tests statistiques appliqués pour l'étude de la linéarité.

**Tableau XLIX: Test statistique pour l'étude de la linéarité**

	Comparaison de la pente avec 1	Comparaison de l'ordonné à l'origine avec 0
<b>t calculé</b>	0.005	1.28
<b>t(0.05 ;43)</b>	2.01	2.01
<b>P</b>	> 0.05	>0.05

### 2.9 Robustesse

L'étude de la robustesse pour le métronidazole et le fluconazole ont été effectuée sur 3 facteurs, les résultats obtenus sont décrit ci-dessous :

**Tableau L: Etude de la robustesse pour le métronidazole**

N° de l'essai	Concentration Echantillonug/ml	Concentration Standardug/ml	Aire (absorbance) échantillon	Aire (absorbance) standard	Concentration estimée ug/ml	Reponse (Teneur en %)
<b>1</b>	14,05	16,00	761039	917422	13	<b>83</b>
<b>2</b>	18,06	16,00	996078	917422	17	<b>109</b>
<b>3</b>	14,05	16,00	548746	662686	13	<b>83</b>
<b>4</b>	18,06	16,00	679815	662686	16	<b>103</b>
<b>5</b>	14,05	16,00	922092	1103285	13	<b>84</b>
<b>6</b>	18,06	16,00	1143127	1103285	17	<b>104</b>
<b>7</b>	14,05	16,00	654958	743127	14	<b>88</b>
<b>8</b>	18,06	16,00	785786	743127	17	<b>106</b>

**Tableau LI: Etude de la robustesse pour le fluconazole**

N° de l'essai	Concentration introduite Echantillon	Concentration Standard	Teneur introduite (%)	Aire échantillon	Aire standard	Concentration estimée	Réponse (Teneur en %)
1	140,05	160,00	87,53	382526	461130	133	<b>83</b>
2	180,06	160,00	112,54	500666	461130	174	<b>109</b>
3	140,05	160,00	87,53	275820	333091	132	<b>83</b>
4	180,06	160,00	112,54	341700	333091	164	<b>103</b>
5	140,05	160,00	87,53	463478	554552	134	<b>84</b>
6	180,06	160,00	112,54	574578	554552	166	<b>104</b>

7	140,05	160,00	87,53	329206	373523	141	<b>88</b>
8	180,06	160,00	112,54	394965	373523	169	<b>106</b>

**Tableau LII: Tableau de l'interprétation de la robustesse du métronidazole et du fluconazole**

<b>EFFETS ETUDIÉS</b>	<b>SIGNIFICATION</b>
Débit	P>0.05
Longueur d'onde	P>0.05
<b>Concentration</b>	<b>P&lt;0.05</b>
Débit*Longueur d'onde	P>0.05
Débit*Concentration	P>0.05
Longueur d'onde* Concentration	P>0.05

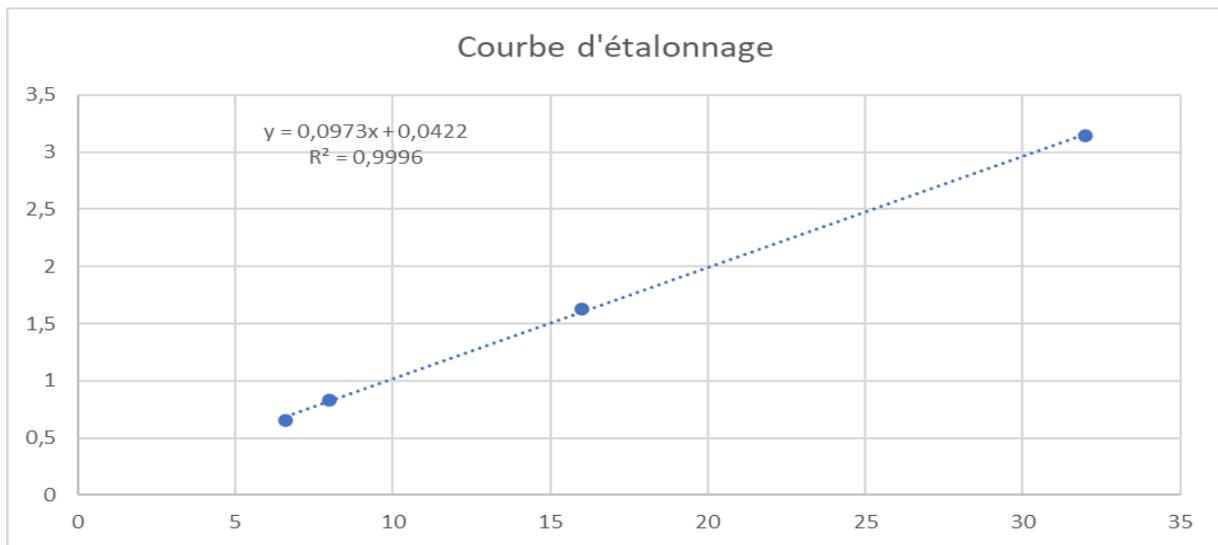
*P : La probabilité pour que l'influence du facteur soit non significative*

**2.10 Etude de l'intégrité de dilution :**

Pour l'étude de l'intégrité de dilution, une courbe d'étalonnage a été tracé a partir de l'intervalle de validité définit par le profil d'exactitude pour la fonction  $y=ax+b$

**Tableau LIII: Résultats des SE**

<b>Concentrations (µg/ml)</b>	<b>Air des pics du métronidazole</b>	<b>Air des pics du fluconazole</b>	<b>Rapport des airs des pics</b>
6,6	412498	628204	0,6566306
8	512825	615252	0,8335202
16	1007401	620150	1,6244473
32	1957367	622075	3,1465129



**Figure 27: Courbe d'étalonnage pour l'étude de l'intégrité de dilution**

A partir de la courbe d'étalonnage des prédictions inverses ont permis d'estimer les concentrations obtenues pour chaque dilution. Ces dernières sont résumées ci-dessous :

**Tableau LIV: Résultats de la dilution à 1/2**

Aires des pics du métronidazole	Aires des pics du fluconazole	Rapports des airs	Prédictions inverses
1828349	579450	3,15531797	31,987775
1905317	592138	3,21769081	32,62866
1927382	605657	3,18229955	32,265013
1796789	601744	2,98596912	30,247704
1666810	626230	2,66165786	26,915383
		<b>Moyenne</b>	<b>30,80890692</b>
		<b>CV</b>	<b>7,66</b>

Les intervalles de conformité selon l'ICH sont :

-Pour la justesse : concentration nominale +/- 15 %,

Donc pour une concentration de 32µg/ml l'intervalle est de : [27,2 - 36,8]

-Pour la CV de répétabilité, il doit être inférieur à 15%.

**Tableau LV: Résultats de la dilution à 1/4**

Aires des pics du métronidazole	Aires des pics du fluconazole	Rapports des airs	Prédictions inverses
898025	590347	1,52118161	15,196909
931101	597166	1,55919962	15,587547
914789	617563	1,48128855	14,787005

873384	605591	1,44220109	14,385378
947048	561301	1,68723733	16,903143
		Moyenne	15,37199633
		CV	3,37

Les intervalles de conformité selon l'ICH sont :

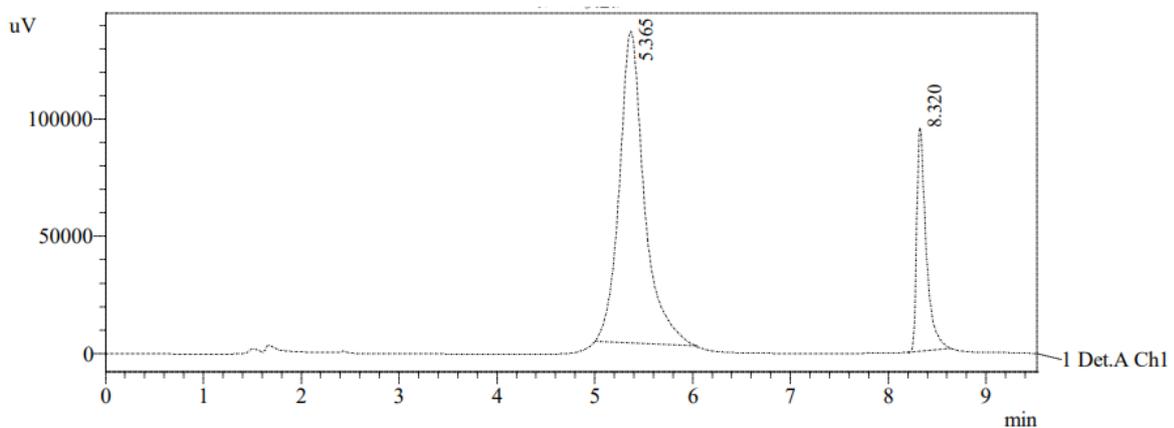
-Pour la justesse : concentration nominale +/- 15 %,

Donc pour une concentration de 16µg/ml l'intervalle est de : [13.6–18.4]

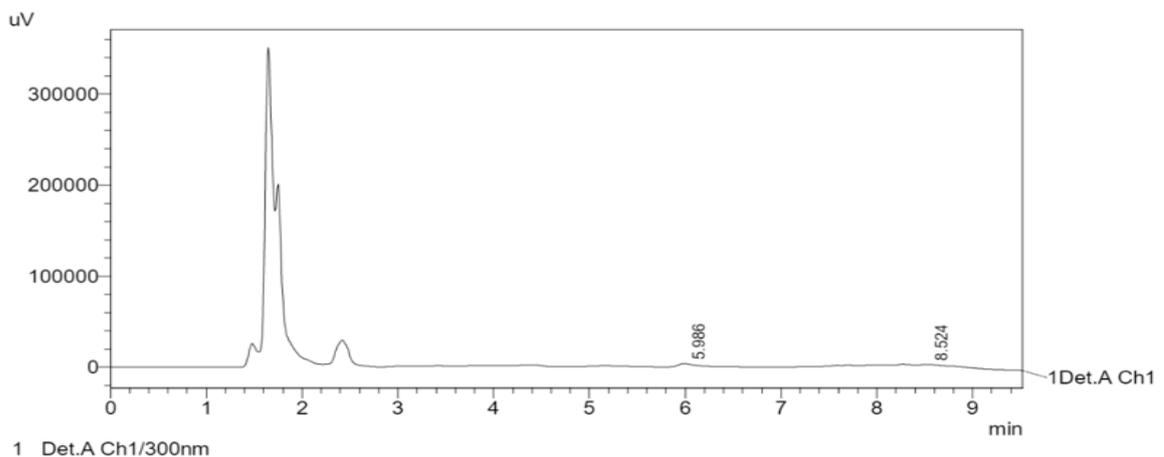
-Pour la CV de répétabilité, il doit être inférieur à 15%.

### 2.11 Etude de l'effet carry over

Les résultats de l'étude de carry over sont présentés sous forme de chromatogrammes :



**Figure 28: Chromatogramme du niveau de concentration le plus élevé**



**Figure 29: Chromatogramme du blanc après injection du niveau de concentration le plus élevé**

Selon ICH M10 la méthode ne présente pas d'effet carry over si la réponse du metronidazole obtenu avec le blanc après injection du plus haut niveau de concentration est

## **PARTIE PRATIQUE Résultats**

<20% de la limite inférieure de quantification. Et si la réponse obtenue avec l'étalon interne est < 5% du pic de l'étalon interne.

# **DISCUSSION**

### 3. Discussion :

#### 3.1. Rendement extraction

Afin de déterminer l'éventuelle présence d'un effet matrice, nous avons estimé le rendement d'extraction.

Le pourcentage des rapports des aires des pics du métronidazole (SV/SE), a donné pour les 3 niveaux de concentrations (2 µg/ml, 8 µg/ml, et 32 µg/ml), avec 3 répétitions, des rendements d'extractions allant de 93.68 à 123.65 %

A partir de leurs moyennes 102.3727% nous avons établi un intervalle de confiance de [81,13 ; 121,62]

Etant donné que  $100\% \in [81,13; 121,62]$ , nous pouvons déduire qu'il n'y a pas d'effet suppresseur ou amplificateur dû à la matrice. Et le rendement d'extraction de notre méthode est considéré comme étant de 100%

#### 3.2. Sélectivité

Nous avons constaté après l'étude comparative des chromatogrammes obtenus avec les SV, SE et le placebo :

-Les temps de rétention et les aires des pics obtenus avec le SV et le SE pour l'étalon interne et le principe actif pour le même niveau de concentration sont comparables en termes d'aire de pic et de temps de rétention.

-Le chromatogramme du placebo a donné une réponse nulle pour le temps de rétention des différents pics.

Nous pouvons en déduire que la méthode de dosage est donc sélective, cela signifie que notre méthode d'analyse est capable d'établir de manière univoque l'existence du principe actif (métronidazole) et de l'étalon interne (fluconazole) en présence d'autres composés sans qu'il n'y ait d'interférences.

#### 3.3. Fonction de réponse

Les résultats obtenus à partir des standards d'étalonnage(SE) nous ont permis de tracer les modèles d'étalonnage représentés dans les figures 10,12,14 et 16.

Avec les 4 fonctions étudiées :  $Y = ax + b$ ,  $Y = ax^2$ ,  $\sqrt{y} = a\sqrt{x} + b$ ,  $\ln y = a \ln x + b$ , et pour chacune des 3 séries effectuées, le facteur de détermination  $R^2$  est supérieur à 0.99

Ceci nous permet de dire que les variations des concentrations introduite  $x$  explique les variations des réponses  $y$ .

Donc ces modèles d'étalonnages sont applicable pour notre méthode de dosage afin d'évaluer les paramètres de validation.

La validité de ses modèles est ensuite démontrée par le profil d'exactitude et l'intervalle de quantification définie par celui ci.

### 3.4. Fidélité

Selon ICH M10 dans une matrice biologique, la méthode sera considérée comme fidèle si le CV de répétabilité et le CV de la fidélité intermédiaire sont tout les deux inférieur à 15%.

Les CV de la fidélité intermédiaire et de la répétabilité que nous avons obtenus, pour chacune des fonctions étudier  $y=ax+b$ ,  $y=ax$ ,  $\sqrt{y} = a\sqrt{x} + b$  et  $\ln y = \ln x + b$  sur les 5 niveaux de concentrations sont de

-Pour les CV de la fidélité intermédiaire, ils varient de 4 à 13%, le CV le plus élevé étant toujours obtenu avec le niveau de concentration 1

- Pour les CV de la répétabilité, ils varient de 4 à 11%, le plus élevé toujours obtenu avec le niveau de concentration 1

Tous les CV de la fidélité intermédiaire et de la répétabilité obtenue pour les 5 niveaux de concentration et avec chacune des quatre fonctions de réponse sont donc inférieur 15%.

Ce qui nous permet de dire que notre méthode présente une bonne fidélité. Donc que le résultat obtenu présente une faible dispersion. Ceci témoigne aussi de la faible proportion d'erreurs aléatoires apporté par notre manipulation.

### 3.5. Justesse

L'estimation de la justesse d'une méthode se fait par le calcul du biais relatif et du pourcentage de recouvrement qui doivent être respectivement proche de 0 et de 100 %.

-Pour la fonction  $y= ax+b$  le biais relatif varie de 0.6 à 10.8, avec le biais relatif le plus grand obtenu pour le niveau 1. En ce qui concerne le pourcentage de recouvrement il varie de 100.572 à 110.799 %, ce dernier ayant été retrouvé au niveau 1.

-Pour la fonction  $y= ax$  le biais relatif varie de -2.8 à 2.35 avec le biais relatif le plus grand obtenu pour le niveau 1. En ce qui concerne le pourcentage de recouvrement il varie de 97.170 à 102.349 %, ce dernier ayant été retrouvé au niveau 3.

-Pour la fonction  $\sqrt{y} = a\sqrt{x} + b$  le biais relatif obtenu varie de 0.4 à 10.4 pour tous les niveaux de concentrations, avec le biais relatif les plus grands obtenus au niveau 1. En ce qui concerne le pourcentage de recouvrement, il varie de 100.420 à 110.353 %, ce dernier ayant été retrouvé au niveau 1.

-Pour la fonction  $\ln y = \ln x + b$  le biais relatif varie de -1.1 à 10.4 pour tous les niveaux de concentrations, avec le biais relatif les plus grands obtenus au niveau 1. En ce qui concerne le pourcentage de recouvrement il varie de 98.932 à 110.402 %, ce dernier ayant été retrouvé au niveau 1.

Selon ICH M10 une méthode est jugé juste si le biais relatif est  $< 15\%$  et que le pourcentage de recouvrement est proche de 100 %

Ces deux critères étant respecté, nous pouvons déduire que notre méthode de dosage présente une bonne justesse pour tous les niveaux étudié et que les erreurs systématiques sont non significatives. De ce fait nous démontrons l'étroitesse de l'accord entre la moyenne des masses introduites et des masses prédites.

### 3.6. Profil d'exactitude

Le profil d'exactitude est une approche harmonisé, applicable a notre méthode de dosage dans le plasma. Il permet de dégager un intervalle de quantifications pour chaque fonction de réponses étudié et cela par l'intersection entre les limites de tolérance et d'acceptabilité, chaque point précédant le point d'intersection sera exclu de l'intervalle de validité :

-Le profil obtenu avec les fonctions  $y = ax + b$ , a défini un intervalle de validité allant de 0.0067 mg/ml à 0.032 mg/ml. Il a été défini par l'intersection entre la limite d'acceptabilité supérieur et la limite de tolérance supérieur.

-Avec le fonction  $y = ax$ , l'intervalle de quantification dégagé va de 0.0075 mg/ml à 0.032 mg/ml. Cet intervalle a été défini par l'intersection entre la limite d'acceptabilité supérieur et la limite de tolérance supérieur.

-La fonction  $\sqrt{y} = a\sqrt{x} + b$ , a permis de définir un intervalle de quantification allant de 0.0075 mg/ml à 0.032 mg/ml. Cet intervalle a été défini par l'intersection entre la limite d'acceptabilité supérieur et la limite de tolérance supérieur.

-Enfin la fonction  $\ln y = \ln x + b$ , a dégagé un intervalle de quantification allant de 0.0075 mg/ml à 0.032 mg/ml. Cet intervalle a été défini par l'intersection entre la limite d'acceptabilité supérieur et la limite de tolérance supérieur.

Cela signifie que pour chacun des intervalles prédéfinis, nous pouvons garantir que la méthode est capable de produire une proportion de 95% de résultats acceptables et seulement 5% de futures mesures peuvent être en dehors des limites d'acceptations.

Pour les niveaux 1 et 2, malgré que les résultats de la fidélité et de la justesse soit acceptable ils ont été exclus de l'intervalle de validité définie par le profil d'exactitude. Ceci confirme l'intérêt du profil d'exactitude comme outil décisionnel, qui en plus d'être visuel, facile à interpréter et objectif, permet une approche globale de la validation.

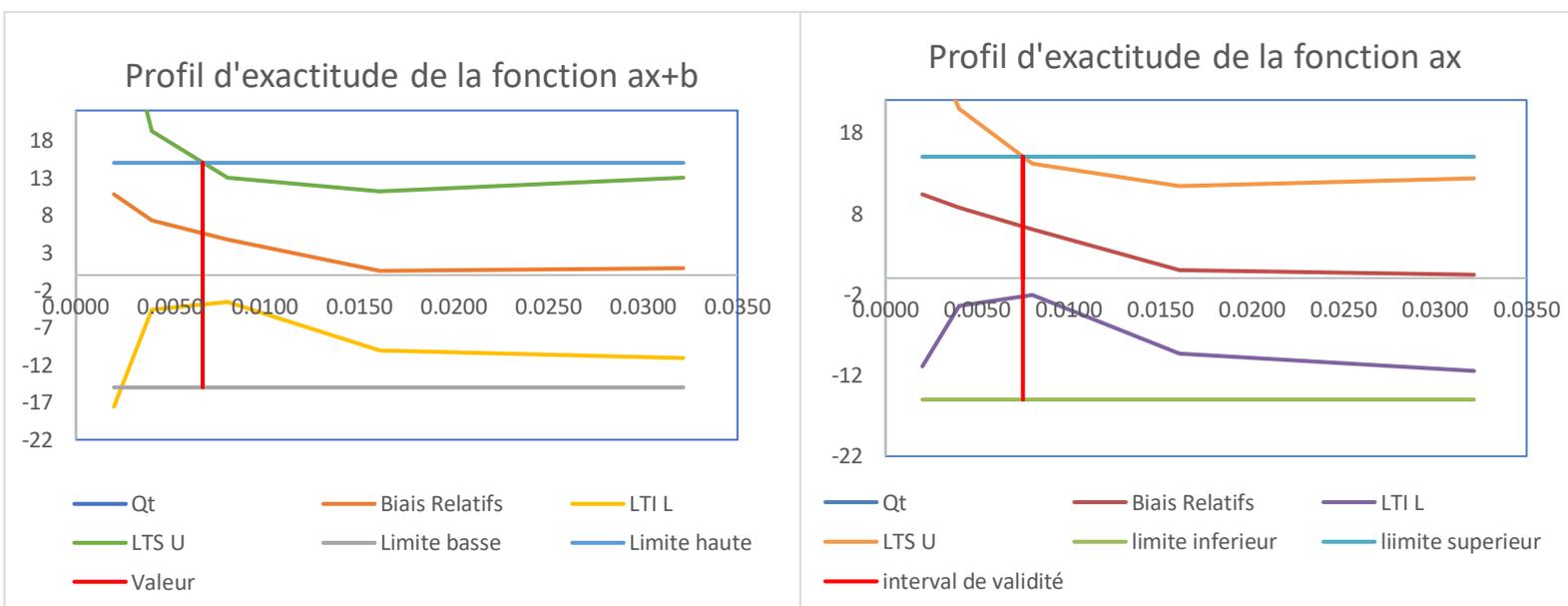
Plusieurs méthodes de dosage du métronidazole dans le plasma ont été validées parmi elle, des méthodes utilisant l'HPLC et la spectrométrie de masse UPLC MS / MS.

- UPLC MS/MS : la courbe d'étalonnage est linéaire sur l'intervalle 0.1-300 $\mu$ M. la méthode est aussi sensible avec une préparation simple et rapide de l'échantillon qui utilise seulement 10  $\mu$ L de plasma (50).
- HPLC (Ezzeldin and El-NAhhas) : la courbe d'étalonnage est linéaire sur l'intervalle 0.05 – 30.0  $\mu$ g/ml. La méthode appliquée ici était exacte, précise, spécifique, sensible et capable de déterminer les concentrations de métronidazole dans un petit volume de plasma humain (200  $\mu$ l) et implique une utilisation réduite de solvant organique(51).

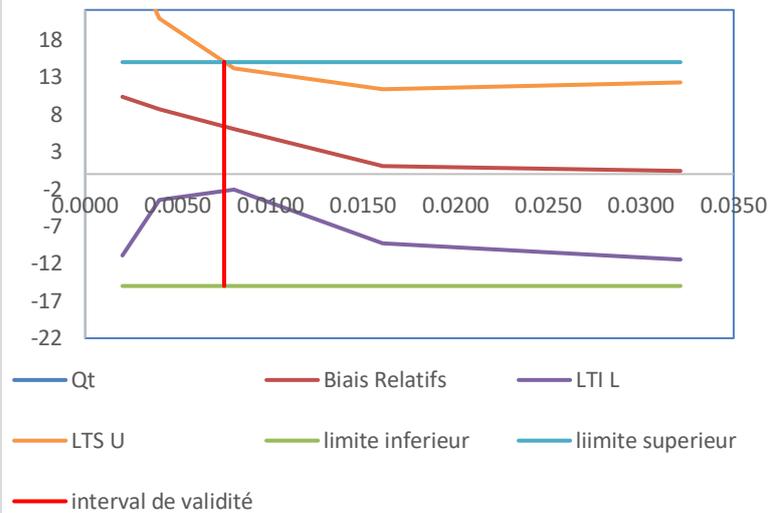
Nous pouvons ainsi comparer les résultats obtenus avec notre nouvelle méthode de dosage du métronidazole dans le plasma par HPLC avec celles-ci :

### 3.7. Choix de la fonction de réponse

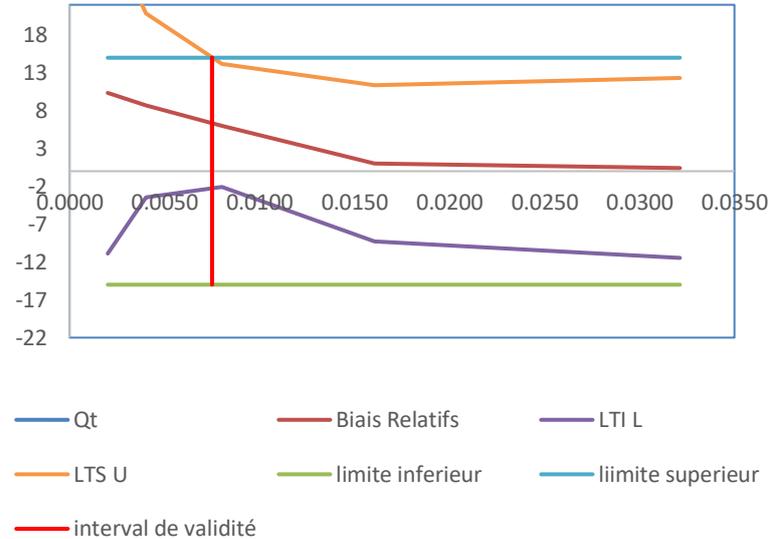
D'après les profils d'exactitude représentés dans les figures suivantes :



Profil d'exactitude la fonction Ln



Profil d'exactitude de la fonction racine



En raison de la simplicité du modèle et de l'intervalle de validité [0.0067 ; 0.32] qui est le plus large notre choix c'est porté sur la fonction  $y=ax+b$ .

Ce modèle est préconisé pour le dosage du métronidazole dans le plasma avec fluconazole comme étalon interne par HPLC, dans le cadre du suivi thérapeutique chez les personnes à risque.

### 3.8. Linéarité

La linéarité a été évaluée pour la fonction  $y=ax+b$  pour chaque niveau de concentrations avec 3 répétitions,  $a$  représente la pente,  $b$  l'ordonnée à l'origine,  $x$  la concentration introduite et  $y$  la concentration prédite. L'analyse de l'évolution des concentrations prédites en fonction des concentrations introduites a permis de vérifier l'existence d'une pente significative comparable à 1 et d'une ordonnée à l'origine comparable à 0 avec une probabilité  $>0.05$  un  $t_{calculé} < t_0$  et un facteur de détermination  $R^2=0.9938$

La linéarité de la méthode est donc confirmée ceci signifie que il n'y a pas d'effet matrice additif ou multiplicatif.

### 3.9. Robustesse

Une méthode de dosage est dite robuste si  $p$ , la probabilité que le facteur  $n$  n'influence pas la réponse instrumentale est supérieur à 5%.

Pour le facteur A (concentration) les résultats obtenus montrent :  $p < 5\%$ , donc notre méthode est sensible aux variations de concentrations.

A l'inverse pour le facteur B (débit) et C(longueur d'onde) les résultats obtenus montrent :  $p > 5\%$ , cela signifie que de légères variations du débit et de la longueur d'onde ne sont pas significatives, donc qu'elle n'influence pas la réponse expérimentale.

Au vue de ces résultats, nous pouvons déduire que notre méthode est robuste aux variations du débit et de la longueur d'onde, mais qu'elle est sensible aux variations de concentration. En routine cela signifie que de faibles variations de concentrations seront détectables, mais que des variations légères et incontrôlées du débit et de la longueur d'onde ne seront pas significatives.

### 3.10. Intégrité de dilution

Le profil d'exactitude ayant définie un nouvel intervalle de validité, nous avons tracé une nouvelle courbe d'étalonnage a partir de laquelle des prédictions inverses ont permis d'estimer les concentrations obtenu pour chaque niveau de dilution  $\frac{1}{2}$  et  $\frac{1}{4}$ .

Nous avons calculé la moyenne des concentrations ainsi que le coefficient de variations CV pour chaque dilution.

Pour une dilution à  $\frac{1}{2}$  la moyenne est de 30.81  $\in$  [27,2 ; 36,8] qui est l'intervalle de conformité de la justesse, et le CV de répétabilité est de 7,66  $<$  15%.

Pour une dilution à  $\frac{1}{4}$  la moyenne est de 15.37  $\in$  [13,6 ; 18,4] et le CV de répétabilité est de 3,37  $<$  15%.

Ceci confirme que la dilution n'impacte pas les concentrations de l'analyte calculées avec notre méthode de dosage. Lors de l'analyse en routine, si les concentrations dépassent la limite supérieure de l'intervalle de validité une dilution par l'un de ces deux facteur peut être effectuer.

### 3.11. Carry over

L'étude de l'effet carry over permet d'estimer une augmentation des concentrations mesuré du a la présence d'analyte résiduel a un précédent dosage dans l'instrument analytique.

La réponse du métronidazole obtenu avec le blanc  $<$  à 20% de la réponse la limite inferieur de quantification,

La réponse du fluconazole obtenu avec le blanc étant  $<$  à 5% de la réponse de l'étalon interne.

Nous pouvons déduire que notre méthode de dosage ne présenta pas d'effet carry over. Cela signifie que les concentrations mesurées ne sont pas influencé par de précédentes analyses.

# **Conclusion et Recommandations**

### Conclusion et Recommandations

La validation des procédures analytiques est un principe accepté et utilisé dans tous les secteurs d'activité, à savoir le domaine pharmaceutique et biologique, pour s'assurer de la fiabilité des résultats fournis lors de l'analyse en routine.

Plusieurs méthodes de dosage du métronidazole dans le plasma ont été validées parmi elle, des méthodes utilisant l'HPLC et UPLC MS/MS toutes réalisées dans le cadre d'étude de bioéquivalence.

Notre étude s'est portée sur le dosage plasmatique du métronidazole par HPLC, cette méthode est la 1<sup>ère</sup> à être réalisée dans le domaine du suivi thérapeutique des personnes jugées à risque.

Après avoir optimisé la méthode de dosage, la rendant la plus simple et rapide possible, nous avons effectué un plan d'étalonnage pour générer un modèle pour chaque série permettant de relier la réponse analytique (la surface du pic) à la concentration introduite. Ensuite, nous avons étudié la fidélité et la justesse de la méthode. Enfin, l'établissement des intervalles de tolérance appariés à des limites d'acceptation nous a permis de tracer un profil d'exactitude qui caractérise la validité de la méthode dans un intervalle de quantification de [6.7 µg/ml ; 32 µg/ml].

Les résultats obtenus répondent aux exigences et performances spécifiques élaborées dans cette approche harmonisée ; ce qui atteste la validité de la méthode utilisée et son aptitude à être utilisée et appliquée en routine pour le dosage du métronidazole dans le plasma dont l'objectif est le suivi thérapeutique du métronidazole.

Le protocole détaillé du dosage du métronidazole dans le plasma par HPLC dans le cadre du suivi thérapeutique est présenté dans l'annexe 3

Cette étude pose les bases d'un travail à poursuivre et améliorer. Pour se faire nous recommandons de compléter les résultats obtenus avec des études de la stabilité, et des différents facteurs influençant le dosage en routine (déterminer une potentielle influence des anticoagulants sur le dosage du métronidazole ainsi que les conditions de prélèvement et conservation). Un autre ajout est d'étudier le contrôle de qualité interne du dosage du métronidazole (contrôle normal et pathologique)

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ben Saad L. Étude de la séparation des Fluoroquinolones par HPLC: Application à l'étude de leur dégradation par rayons gamma. Décembre 2013. Université Tunis El Manar Faculté des Sciences de Tunis 19.
2. Padoin C. Suivi thérapeutique pharmacologique des antifongiques: utile ? Journal des Anti-infectieux. Mars 2016. Volume 18, numéro 1, pages 14-18.
3. Labarde S. Enjeux du suivi thérapeutique pharmacologique. Actualités Pharmaceutiques. , Octobre 2015. Volume 54, numéro 549, Pages 39-41.
4. Julien V. Suivi thérapeutique pharmacologique des antifongiques: de l'intérêt des dosages. , Avril 2013. La lettre de l'infectiologue. Tome XXVIII, numéro 2, page 64.
5. Freeman CD, Klutman NE, Lamp KC. Metronidazole. Drugs. 1 Novembre 1997. Volume 54, numéro 5, pages 679-708.
6. N. Widmer D. Werner, Al .Suivi thérapeutique des médicaments (II) La pratique clinique. 2008. Revue Medicale Suisse , Volume 4, pages 1649- 1660.
7. Bouklouze A, Cherrah Y. Validation des procédures analytiques selon la nouvelle approche basée sur l'erreur total (Profil d'exactitude). Les technologies de laboratoire. 2009 [cité 5 Juillet 2022]; Volume 4, numéro 14.
8. Bouabidi A. Etude Critique des Différentes Approches de Validation des Méthodes Analytiques. Faculté des Sciences Ben M'Sik Casablanca, Maroc, Faculté de Médecine Département de Pharmacie. 26 Avril 2013.
9. Jerod L. Nagel and David M. Aronoff , Metronidazole. Fondation universitaire Juan N Corpas, Colombie, partir de ClinicalKey.es par Elsevier, 05 novembre 2019.
10. Meyler's side effects of drugs: the international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions. Editeur Aronson, Jeffrey K. Amsterdam Boston Heidelberg: Elsevier, 15 Octobre 2015.
11. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 4173, Metronidazole. [Cité 18 juin 2022].

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

12. Métronidazole. Product listing detail. AA Pharma Inc. Vaughan, Ontario, Canada. 11 Janvier 2019 [cité 04 Mars 2022].
13. Métronidazole. Monographie de Produit. Pfizer. Kirkland, Québec, Canada. 18 septembre 2018 [cité 17 juin 2022].
14. Metronidazole. Oncohemat Key. Mis à jour le 01 Juillet 2017 [cité 4 mars 2022].
15. Ahmed F. A Review on HPLC Method Development and Validation of Metronidazole Tablet. University of Asia Pacific, Dacca, Bangladesh. Mai 2021.
16. Hernández Ceruelos A. Romero-Quezada LC. AL Therapeutic uses of metronidazole and its side effects: an update. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. Janvier 2019. Volume 23, numéro 1, pages 397-401.
17. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, Sajed T, Johnson D, Li C, Sayeeda Z, Assempour N, Iynkkaran I, Liu Y, Maciejewski A, Gale N, Wilson A, Chin L, Cummings R, Le D, Pon A, Knox C, Wilson M. DrugBank 5.0. Mis à jour 2018. Metronidazole. [Internet]. [cité 4 mars 2022]. Disponible sur: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00916>
18. eEML . Electronic Essential Medicines List]. [cité 17 juill 2022].
19. European Medicines Agency Pre-authorisation Evaluation of Medicines for Human Use, European medicines agency decision on the granting of a product specific waiver for Bismuth subcitrate potassium / Metronidazole / Tetracycline hydrochloride in accordance with Regulation (EC) No 1901/2006 of the European Parliament and of the Council as amended. 20 Avril 2009.
20. Monographie de Flagyl® (métronidazole); Sanofi-aventis Canada Inc. Mis à jour le 21 février 2017.
21. Neurotoxicité du métronidazole, médicament antibiotique et antiparasitaire chez le chien : des risques même à faible dose | Signes et sens - Communiqués de presse [Internet]. [cité 4 mars 2022].

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

22. Centre International de Recherche sur le Cancer, OMS. Agents Classés par les Monographies du CIRC, Volumes 1–132, Groupe 2B. Mis à jour le 1er juillet 2022
23. Ankourao Kalla Z. Adaptation de la posologie des antibiotiques chez les insuffisants rénaux dans les services de néphrologie et d'hémodialyse de l'hôpital du Point G, Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie, Université de Bamako , Mali .26 Février 2005.
24. Buyse S, Paugam-Burtz C, AL . Adaptation des thérapeutiques médicamenteuses en cas d'insuffisance hépatocellulaire. 2 Octobre 2007. *Réanimation*, Volume 16, numéro 7-8, pages 576-586.
25. Product Monograph Including Patient Medication Information, FLAGYL Métronidazole 10 % Cream. 31 Décembre 1970, Mis a jour 9 Mai 2022. Sanofi-Aventis, Laval, Quebec, Canada.
26. Metronidazole capsule. Laboratoire PFIZER. FLAGYL®. New York, Etas unis. Mis à jour Décembre 2021
27. Nicolas O, Robert D, AL . Traitements de l'échantillon biologique avant l'analyse chromatographique. Applications à la pharmacocinétique et à la toxicologie. *Annal de Toxicologie Analytique*. 2004; Volume 16, numéro 3, pages 199-213.
28. Abe E, Delyle SG, Alvarez JC. Extraction liquide-liquide : théorie, applications, difficultés. *Annal de Toxicologie Analytique*. 2010; Volume 22, numéro 2, pages 51-59.
29. Labat L. La préparation des matrices biologiques pour l'analyse des métaux. *Annal de Toxicologie Analytique*. 2010; Volume 22, numéro 2, pages 81-88.
30. Nicolas O, Farenc C, Bressolle F. Stratégie de validation de méthodes de dosage en bioanalyse en vue d'études pharmacocinétiques et toxicologiques. *Annal de Toxicologie Analytique*. 2004; Volume 16, numéro 2, pages 118-127.
31. Raynaud M. Validation du procédé de fabrication dans l'industrie pharmaceutique, appliqué aux formes solides orales. 11 Avril 2011. Université de Limoge, France.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

32. Amadou Sangaré. Analyse de l'utilisation des documents normatifs et réglementaires chez les fabricants de machines au Québec. Février 2009. Université du Québec à Trois-Rivières.
33. ISO, termes et définition. ISO /IEC 2017. [cité le 17 Mars 2022] .
34. FDA : F.D.A. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center of Veterinary Medicine (CVM), Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation [Draft Guidance], 2013.
35. ICH International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Geneva, Switzerland, 2005.
36. Agence Européenne des Médicaments EMA. [cité 26 juin 2022].
37. Boulanger B. Chapuzet E. et al. Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches. Mai- Juin 2003. volume 13 , numéro 3.
38. Pinguet I. Validation analytique: application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie. Université de Bordeaux, France. 31 Aout 2015, Mis a jour le 23 Aout 2017. dumas-01188779
39. STP Pharma pratiques volume 21-N°2 -mars-avril 2011. Analyse des performances d'une méthode analytique, Evaluation des risques lors d'une utilisation en routine - Avantages et inconvénients des différentes approches. << G. de Fontenay, J. Respaud, P. Puig, C. Lemaire.
40. ICH Harmonised Guideline Bioanalytical Method Validation M10. Endorsement by the Members of the ICH Assembly under *Step 2* and release for public consultation. 26 Fevrier 2019.
41. Pr Mamou Cours Validation des méthodes analytiques. Département de Pharmacie de Tizi-Ouzou, Algérie. Laboratoire de Chimie Analytique.
42. Hubert P. Nguyen-Huu J.J. et al . SFSTP 2006: Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches Partie II - Statistiques Commission. 2006.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

43. Vander Heyden Y, Massart DL. Chapter 3 Review of the use of robustness and ruggedness in analytical chemistry. In: Data Handling in Science and Technology [Internet]. Elsevier; 1996 [cité 15 juin 2022]. p. 79- 147.
44. H. Fabre. Robustness testing in liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 14 (1996) 1125-1132.
45. Thèse de SIAVELIS Armand pour le diplôme d'état de docteur en Pharmacie, université d'Angers 2014-2015, Analyse des différentes approches de validation des méthodes de dosage et proposition d'un guide de validation de méthode de dosage en pharmacie hospitalière.
46. E. Rozet<sup>1,\*</sup>, B. Boulanger<sup>2</sup>, W. Dewé<sup>2</sup>, P. Chiap<sup>3</sup>, F. Moonen<sup>4</sup>, B. Govaerts<sup>5</sup>, J. Crommen<sup>6</sup>, Ph. Hubert<sup>1</sup>. GERER LE RISQUE LORS DE LA VALIDATION DES METHODES ANALYTIQUES : APPLICATION A LA DETERMINATION D'IMPURETES.
47. Garmoum K. Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. 2010
48. Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude. Éditée et diffusée par l'Association Française de Normalisation (AFNOR). Mai 2010.
49. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 3365, Fluconazole. [cité 21 juin 2022]
50. Stancil S. Van Haandel L . Abdel-Rahman S . Pearce RE. Development of a UPLC-MS/MS method for quantitation of metronidazole and 2-hydroxy metronidazole in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*. Août 2018. Volume 1092, pages 272- 278.
51. Ezzeldin E . El-Nahas T. New Analytical Method for the Determination of Metronidazole in Human Plasma: Application to Bioequivalence Study. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 22 Février 2013. Volume 11, numéro 5, pages 799-805.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

52. Aymen L. Chromatographie Liquide à Haute Performance HPLC. National Institute of Applied Sciences and Technology. [National Institute of Applied Sciences and Technology](#). Tunis, Tunisie. Janvier 2020. cité 25 juin 2022].
53. Bensakhria A. Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) . Analytical Toxicology. 28 octobre, 2016. [Cité 25 juin 2022].
54. Colomb F. HPLC Principe et appareillage - Les séries SMS, BSE et BGB. Académie de Normmandie, France. 20 Janvier 2010[Internet]. [cité 25 juin 2022].
55. Cuq JL. La Chromatographie Liquide. Université de Montpellier, France. 1996 .page101.
56. Technique: Principes de la chromatographie. Université de Sherbrooke. Canada [cité 25 juin 2022].
57. Hubert P, Nguyen-Huu JJ, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal--part III . Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Septembre 2007. Volume 45, numéro 1, pages 82-96.
58. Fiche infos BSF Humatem HPLC. Mis à jour Version Septembre 2013. [cité 18 mars 2022].
59. Cours de Chromatographie. Master de chimie 1ère année. Faculté des sciences d'Orsay, Paris, France. [cité 25 juin 2022].

# **Annexe I**

## **Chromatographie**

## 1. Introduction

La Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) ou (HPLC) en langue anglaise, ou simplement la *chromatographie* en phase *liquide* (CPL) est une technique de séparation et de purification d'un ou plusieurs composés d'un mélange soluble dans une phase mobile liquide. Elle est utilisée en analyse quantitative et qualitative dans le domaine de chimie analytique, de toxicologie et de la biochimie(53,54,55).

## 2. Historique

C'est au début du XX<sup>ème</sup> siècle, plus précisément le 21 mars 1903, que naît la chromatographie. Ce jour-là TSWETT, botaniste d'origine russe, présent à Varsovie son premier article sur une nouvelle sorte de phénomène d'adsorption et son application à l'analyse biochimique. Il y décrivait la formation de zones colorées lors de l'élution par l'éther de pétrole de pigments végétaux dans une colonne remplie de carbonate de calcium. L'origine du mot chromatographie vient peut-être de cette séparation de composés colorés, puisque en grec, **CHROMA** signifie couleur.

Puis les travaux de TSWETT tombèrent dans l'oubli pendant une vingtaine d'années et il faudra attendre 1931 la publication de KUHN et LEDERER sur la séparation des isomères du carotène et de la xanthophylle pour assister au développement de la chromatographie en tant qu'outil analytique. A partir de cette date, la chromatographie prit son véritable essor

- **1934**, premier livre de ZECHMEISTER et CHOLNOKY, qui par son succès, contribua à vulgariser la chromatographie.

- **1941**, La chromatographie de partage, MARTIN-SYNGE.

- **1944**, La chromatographie sur papier, CONSDEN-GORDON, MARTIN.- **1948**, Prix Nobel à TISELIUS (premier détecteur optique par mesure du changement d'indice de réfraction, premier système de gradient d'élution).

- **1952**, Prix Nobel à MARTIN et SYNGE MOORE et STEIN Chromatographie d'échange ionique (Prix Nobel).

- **1959**, Chromatographie sur gel (PORATH, FLODIN).

- **1969**, Avènement de la chromatographie liquide moderne (HPLC, FPLC)(55).

## 3. Principe

Le principe de la chromatographie liquide CPL, s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange suivant leur affinité entre deux phases non-

miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire, constituées de grains sphériques de diamètre compris entre 2-5 micromètres.

Les composés à séparer (solutés) sont dissous dans un solvant et introduit dans une phase mobile liquide (éluant). Selon la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire très élaborée, dans une colonne chromatographique.

Cependant, la phase mobile est poussée par une pompe à haute pression pour vaincre la perte de charge provoquée par le remplissage de la colonne. A la sortie de la colonne, les solutés séparés sont représentés par des pics appelés chromatogrammes, qui sont détectés et enregistrés par des détecteurs appropriés (1,53).

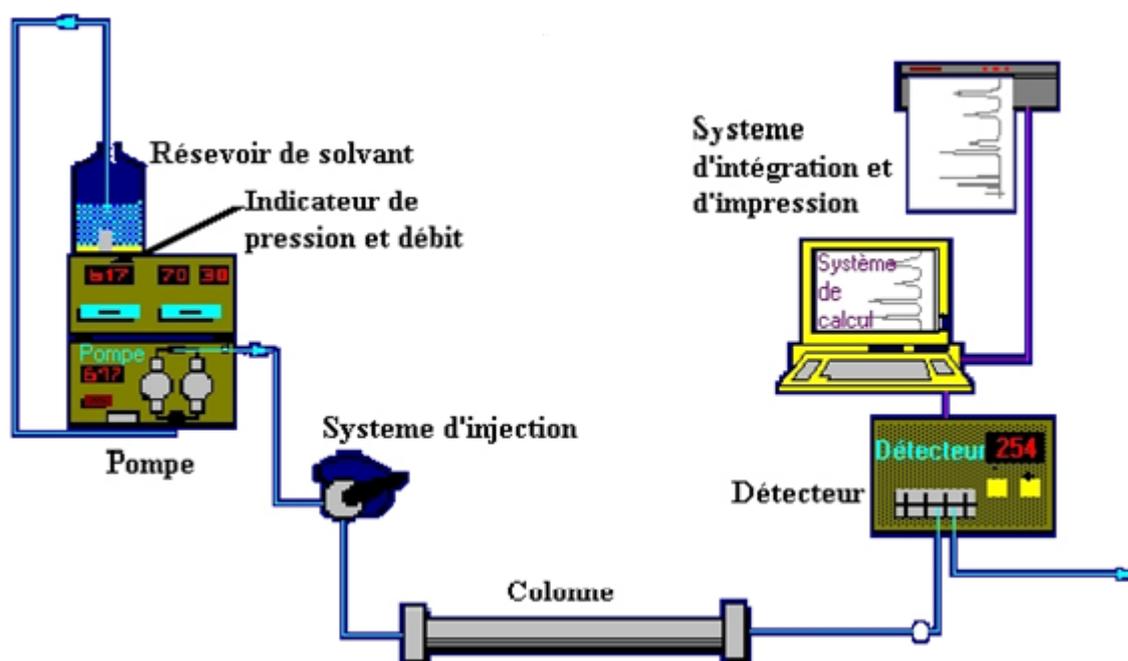


Figure 30: Principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC

#### 4. Appareillage

Les différents modules spécialisés de la chaîne HPLC sont représentés par le schéma ci-dessous. Ils sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre interne (0,1 mm) pour assurer la circulation de la phase mobile. Elles peuvent être en acier inoxydable ou en PEEK® (ou polyether-etherketone), un polymère souple et coloré qui résiste aux solvants usuels, même sous des pressions élevées (350 bars)(53).

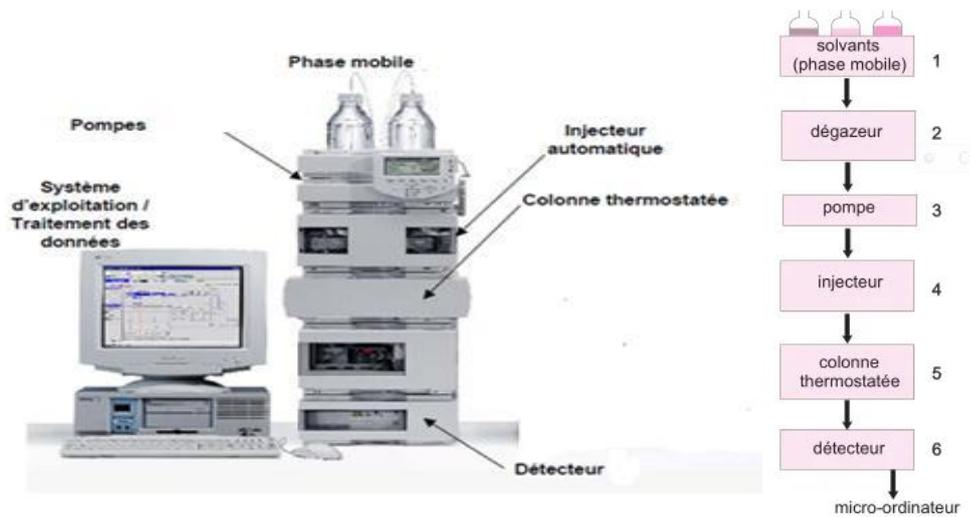


Figure 31: Module de l'HPLC

## 4.1 Pompe et gradients d'éluion

### 4.1.1 Pompe pour éluant

Elle est muni d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature de solvant, elle doit fournir la phase mobile un débit constant à une certaine pression pour atteindre la colonne. Elle permet de travailler soit :

- En mode isocratique, c'est à dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- En mode gradient, c'est à dire avec une variation des constituants du mélange d'éluant.

Actuellement les paramètres d'une pompe sont :

- débit : 0,01 à 10 ml/min.
- stabilité < 1% (<0,2% pour des chromatographies d'exclusion diffusion).
- pression maximale > 350 bars(1, 55,15).

### 4.1.2 Le réservoir de la phase mobile

Il contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluion (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse (15).

## 4.2 Injecteur

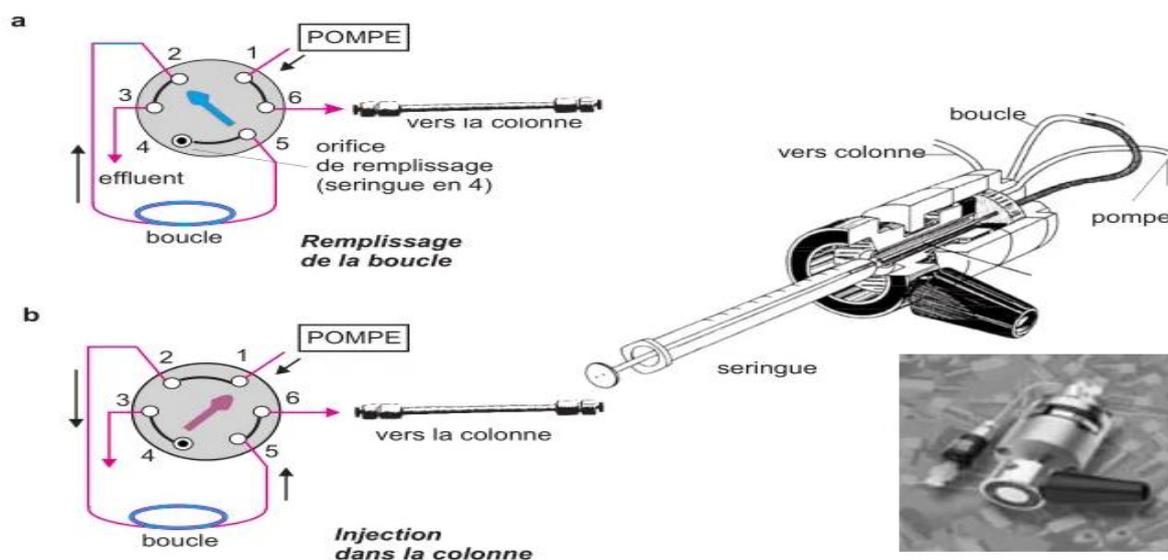
L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire en un temps bref afin de perturber le moins possible le régime de circulation de la phase mobile qui doit être stable de la colonne au détecteur.

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50  $\mu\text{L}$ ...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne.

La vanne à boucle d'échantillonnage possède 2 positions. La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe (load), la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique (inject).

Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue.

Des tubes en acier inoxydable, en Teflon, en PEEK ou en silice fondue permettent de relier la ou les pompes à l'injecteur chromatographique(53).



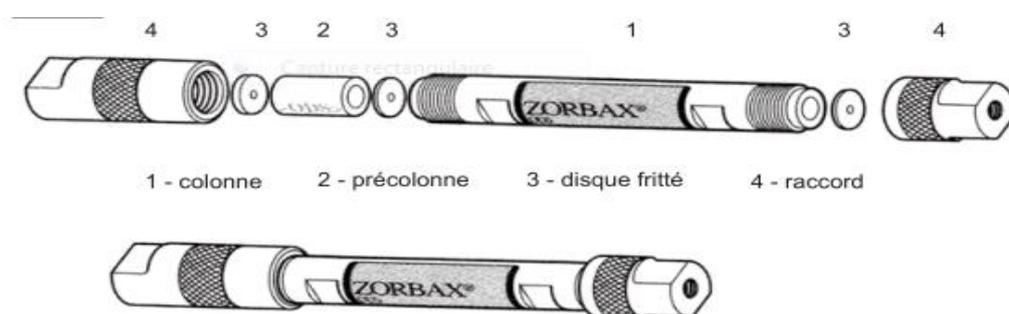
a) Remplissage de la boucle. Dans cette étape, la seringue est introduite à la position n° 4;  
 b) injection dans la colonne (noter la nouvelle position de la manette). Vanne modèle 7125.  
 Les vannes sont motorisables(53).

**Figure 32: Modèle d'injection avec une boucle**

## 4.3 Colonnes

La colonne est l'élément majeur de la chaîne HPLC elle se présente sous forme de tube droit, en acier (éventuellement doublé d'un matériau inerte en verre, ou en PEEK : Polyether-

EtherKetone) dont la longueur et le diamètre varient en fonction des modèles. Les colonnes « standard » dont le diamètre interne (DI) est d'environ 4,5 mm et la longueur de 10 cm (fig. 22), sont de plus en plus supplantées par des colonnes de plus faibles diamètres, baptisées narrow-bore (DI 2-4 mm), micro-bore (DI 1-2 mm), capillaires remplies (DI 0,1-1 mm). Ces modèles sont apparus suite à l'évolution des phases stationnaires customisées et pour simplifier les problèmes de couplage avec la spectrométrie de masse. La colonne est souvent précédée d'une précolonne, dite colonne de garde, courte (0,4 à 1 cm), remplie de la même phase stationnaire, ce qui sert à retenir certaines impuretés afin d'augmenter la durée de vie de la colonne principale. (53,54, (1))



**Figure 33: Représentation d'une colonne standard et d'une précolonne HPLC**

#### 4.4 Le détecteur

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Pour détecter, on utilise différents phénomènes physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. Généralement, on compare le signal obtenu pour la phase mobile et le soluté à celui de la phase mobile seule.

Le détecteur le plus utilisé en CLHP est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne.

Il existe d'autres détecteurs :

- Réfractomètre différentiel
- UV à barrette de diodes
- Electrochimique
- Fluorimétrie...

Ainsi que différents types de couplage :

- Spectrométrie infrarouge
- Spectrométrie de masse

- Résonance Magnétique Nucléaire...(54)

#### 4.5 Le dégazeur

Un dégazeur est un composant utilisé pour éliminer l'oxygène présent dans les solvants afin d'éviter d'endommager l'échantillon ou la phase stationnaire. Deux types de dégazeurs sont utilisés en HPLC :

- Dégazeur de gaz inerte : Le gaz inerte est barboté à travers le PM (phase mobile) pour éliminer les gaz dissous des liquides. L'hélium est le gaz noble le plus couramment utilisé pour cette application.
- Dégazeur sous vide : Cette méthode consiste à utiliser une pompe à vide principale pour réduire la pression dans l'enceinte où se trouve le solvant, séparant ainsi les gaz dissous dans le fluide. Elle est plus efficace, ne nécessite plus de gaz inertes et remplace de plus en plus les anciennes techniques d'analyse HPLC. La pression dans l'enceinte est de l'ordre du millibar(53).

#### 4.6 L'enregistreur

L'enregistreur reçoit un signal électrique proportionnel à la concentration d'analyte traversant le détecteur. Ce signal est traité, amplifié et utilisé pour dessiner un chromatogramme. Pour les pics utilisables, on considère généralement que le rapport signal sur bruit doit être au moins égal à 3(1).

### 5. Polarité et chromatographie

#### 5.1 Phase mobile

Une phase mobile liquide est appelée éluant. C'est elle qui fait migrer les composés, son choix est donc important.

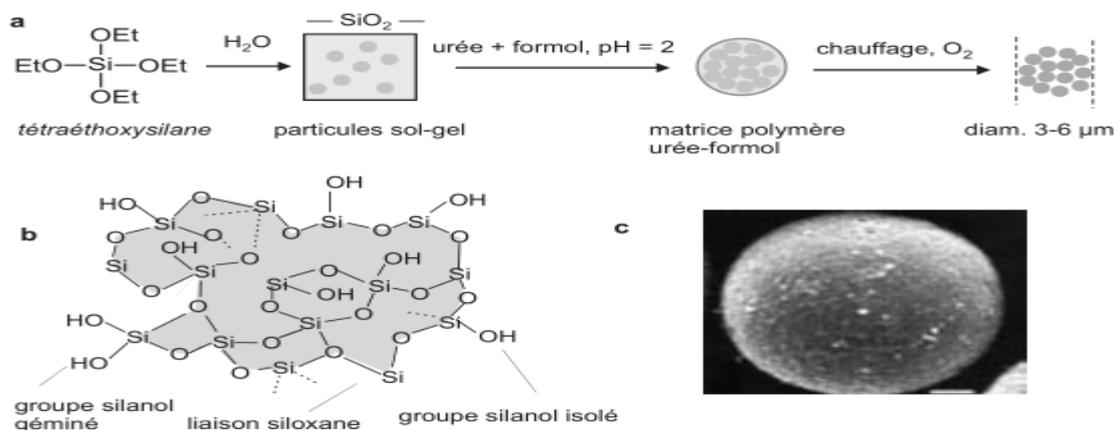
Il faut que le soluté soit soluble dans l'éluant. Il est possible de faire des mélanges de solvants pour changer sa polarité(56).

#### 5.2 Phases stationnaires

La recherche d'une bonne résolution chromatographique et d'une efficacité chromatographique élevée a abouti à des phases stationnaires de diverses propriétés et structures. Afin de raccourcir le temps d'analyse, il faut chercher à accélérer le transfert des phases mobile et stationnaire dans la colonne(53).

### 5.2.1 Phase stationnaire normale

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est un solide amorphe ayant pour formule de composition  $\text{SiO}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_n$  (avec  $n$  très proche de 0). Ce gel est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête. Bien qu'ayant une capacité d'adsorption élevée, le gel de silice décrit précédemment n'est plus utilisé tel quel en chromatographie analytique. Hydrophile par nature, ses caractéristiques évoluent au cours du temps, entraînant un manque de reproductibilité des séparations(1,53).



a) préparation de grains sphériques de gel de silice via un sol-gel. b) Représentation du réseau correspondant à un maillage tridimensionnel. c) Image d'une particule sphérique du gel de silice issu d'un assemblage compact de sphères submicroniques(53).

**Figure 34: Représentation du gel de silice pour chromatographie**

### 5.2.2 Phase stationnaire inversée

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire tels que l'acétonitrile, le méthanol et l'eau. Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante. Le gel de silice ainsi modifié devient assimilable à un liquide immobilisé, la séparation mettant en jeu les coefficients de partage et non plus les coefficients d'adsorption. Ces phases greffées, dont la polarité peut être ajustée avec précision, sont à l'origine de la

chromatographie de partage à polarité de phase inversée, utilisée dans quasiment toutes les séparations(1,53).

### 5.3 Polarité des solvants

Si la phase stationnaire est polaire, on utilise une phase mobile apolaire c'est la chromatographie en phase normale. Si la phase stationnaire est apolaire, on utilise une phase mobile polaire, on parle de la chromatographie en phase inversée. Les solvants utilisés pour HPLC sont classés suivant leur polarité et leur force éluante. La polarité de la phase mobile augmente par l'ajout d'un solvant organique tel que le méthanol ou l'acétonitrile qui sont principalement utilisés pour l'analyse par la HPLC (52).

phase polaire normale	solvants classes par polarité croissante	phase à polarité inversée
	hexane toluène trichlorométhane dichlorométhane éther acétate d'éthyle acétonitrile méthanol eau	

Figure 35: Représentation du sens d'évolution de la polarité des solvants

### 6. Spécifications techniques

- Volume d'injection d'échantillons : 1 à 100 UL
- Température du compartiment colonne : 5 à 110 C
- Gamme de pH : 1 à 12.5
- Détection : UV/Vis (190 à 800nm), Fluorescence, ELSD(57).

### 7. Avantages

- L'HPLC est une technique d'analyse rapide ayant un résultat très satisfaisant avec précision.
- Il s'agit d'une méthode automatisée.
- Cette méthode est hautement reproductible.
- La méthode HPLC est très efficace et fournit une haute résolution par rapport aux autres techniques chromatographiques.

- Plusieurs alternatives existent dans la HPLC pour une détection large et sensible.
- Il existe une grande disponibilité de la phase stationnaire et des colonnes, de plus ces colonnes peuvent être réutilisées si elles sont manipulées avec soin.- Un enregistrement permanent des pics générés peut être préservé (Sankar et al, 2020).
- Actuellement, la méthode HPLC est utilisée en combinaison avec des spectromètres de masse et un système FTIR, ce qui entraîne une augmentation importante de la spécificité et de la précision(15).

### **8. Inconvénients**

- L'un des principaux inconvénients est l'absence d'un détecteur universel. Bien que le détecteur UV-Vis soit utilisé ici, il n'est utile que pour les chromophores.
- Bien que le système HPLC soit un système analytique moderne, il est néanmoins beaucoup moins efficace que la chromatographie en phase gazeuse capillaire.
- Une personne qualifiée est nécessaire pour faire fonctionner la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) car un peu compliqué à utiliser.
- Dans le cas du système HPLC, l'échantillon et la phase mobile doivent être aussi purs que possible. Si une petite impureté est présente, alors l'ensemble du processus analytique peut échouer.
- La méthode HPLC est coûteuse en raison, principalement, de son coût de maintenance élevé(15).

### **9. L'utilisation de l'HPLC en biologie et dans l'industrie pharmaceutique.**

L'HPLC a de multiples applications dans de nombreux domaines, en biologie, elle permet :

- En biochimie, le dosage de l'hémoglobine A1c, marqueur primordial du suivi du diabète de type 2.
- En hématologie, la reconnaissance et quantification des hémoglobines anormales, et le diagnostic de la drépanocytose, des alpha et bêta thalassémies de type hétérozygote ou homozygote.
- En toxicologie, la mise en évidence et le dosage des substances lors d'intoxication volontaire ou accidentelle, des drogues, des amphétamines, de la méthadone etc...
- En pharmacologie, le dosage de nombreux médicaments pour un suivi efficace du traitement.
- En hydrologie, dans le domaine de la potabilité des eaux destinées à l'alimentation, la séparation et le dosage des principaux anions : sulfates, nitrates, nitrites, fluorures,...(58).

## 10. Renseignements apportés par la réponse instrumentale de l'HPLC

### 10.1. Grandeurs de rétention

#### 10.1.1. Coefficient de partage **K**

A un instant  $t$ , le soluté est à la concentration  $C_m$  dans la phase mobile et à la concentration  $C_s$  dans la phase stationnaire, leur rapport est appelé coefficient de partage noté  $K$ .

$$K = C_s / C_m$$

Le coefficient de partage dépend de trois types d'affinités : la première celle entre le soluté et la phase mobile, la deuxième entre le soluté et la phase stationnaire, la troisième entre les deux phases. La surface ou la hauteur du pic chromatographique est proportionnelle à la masse ou à la concentration du produit injecté(1).

#### 10.1.2. Le temps de rétention **tr**

Le temps de rétention est une grandeur caractéristique d'un analyte dans des conditions opératoires données, c'est le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué, noté **tr** et exprimé en minutes. On utilise ce paramètre pour identifier les composés dans un chromatogramme. Il varie en fonction du débit de la phase mobile et de leur composition, de la température d'élution et de la nature de colonne utilisée(1).

#### 10.1.3 Le temps mort **tm**

Le temps mort est le temps nécessaire pour qu'un composé non retenu traverse la colonne ; il est noté **tm** ou **to** et exprimé en minutes.

$$tm = to = L / V \text{ (1).}$$

#### 10.1.4 Le volume de rétention **Vr**

C'est le volume de la phase mobile nécessaire pour éluer un composé d'un mélange à analyser. Ce volume est caractéristique d'un seul composé dans des conditions opératoires données. Il est lié au temps de rétention **tr** d'un soluté et au débit d'écoulement de la phase mobile **D**. Le volume de rétention est noté **Vr**.

$$Vr = tr \cdot D \text{ (1).}$$

#### 10.1.5 Le volume mort **Vm**

On appelle volume mort **Vm** le volume de phase mobile qui passe à travers la colonne ou le volume occupé par la phase mobile dans une colonne.

$$V_m = t_m * D.$$

$V_m$  ne dépend que de la géométrie et du remplissage de la colonne(59).

### 10.1.6 Le facteur de rétention $k'$

Le facteur de rétention  $k'$  représente l'affinité d'un composé vis-à-vis de la phase stationnaire. C'est un paramètre important indépendant du débit de la phase mobile et des dimensions de la colonne. Si pour deux analyses identiques, dans les mêmes conditions opératoire, on obtient deux valeurs de temps de rétention identiques et deux valeurs de  $k'$  différentes, cela signifie qu'il y a une fuite de phase mobile avant la colonne. Et si on a deux valeurs de  $t_r$  et deux valeurs de  $k'$  différentes, ce qui indique qu'il y a des problèmes au niveau de la phase mobile ou phase stationnaire.

$$k' = (t_r - t_m) / t_m(1).$$

### 10.2. Evaluation de l'efficacité d'une colonne

L'efficacité d'une colonne analytique d'une chaîne HPLC peut s'exprimer par le nombre  $N$  de plateaux théoriques. Plus le nombre des plateaux théoriques  $N$  est élevé, plus la colonne est efficace. On définit également HEPT, la hauteur équivalente à un plateau théorique, et  $L$ , la longueur de la colonne. Plus la hauteur du plateau HEPT est faible, plus la colonne est efficace. Il existe une équation dite équation de Knox en chromatographie liquide à haute performance qui relie la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) à la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile. L'efficacité  $N$  traduit la finesse des pics.

$$HEPT = H = L/N$$

L'efficacité d'une colonne dépend de trois facteurs principaux :

- De sa géométrie : plus une colonne sera longue et plus elle sera efficace.
- De son garnissage : plus les particules de silice seront fines et plus la colonne sera efficace.
- Du débit de l'éluant : Il existe un débit optimal d'utilisation d'une colonne pour lequel son efficacité est la plus grande.

Dans le cas où les pics sont symétriques et gaussiens, le nombre de plateaux théoriques sera calculé selon la relation :  $N = 16(t_r/\omega)^2$

Si les pics sont non symétriques :

$$N = 5,54 (t_r / \omega_{1/2})^2$$

Avec :

$T_r$  : temps de rétention.

$\omega$  : largeur de pic à la base.

$\omega_{1/2}$  : largeur de pic à mi-hauteur. (1)

### 10.3. La sélectivité

On définit la sélectivité  $\alpha$  d'une séparation par le rapport de facteur de distribution ( $k_1$  et  $k_2$ ) de deux solutés. Plus  $k$  est grand, plus le composé est adsorbé fortement dans la phase stationnaire et plus la rétention est grande et inversement. La valeur de  $k$  dépend de la structure du composé qui détermine son affinité pour chacune des deux phases.

$$\alpha = k_2 / k_1$$

$\alpha$  est égale à 1 lorsque n'a pas une séparation entre les deux signaux consécutifs(1).

### 10.4. La résolution

La résolution est une mesure de la qualité d'une séparation de point de vue chevauchement de deux signaux consécutifs. Elle est exprimée à partir des temps de rétention. La résolution est calculée à partir de la relation suivante :

$$R_s = 2 (t_{r2} - t_{r1}) / (\omega_{1/2}(1) + \omega_{1/2}(2))$$

Avec :

Si  $R_s < 1$  : une mauvaise résolution.

Si  $1 < R_s < 1,5$  : une résolution acceptable.

Si  $R_s \geq 1,6$  : une bonne résolution.

Si  $1,4 < R_s < 1,6$  : une résolution optimale(1).

### 10.5. Analyse quantitative

L'aire des pics est proportionnel à la quantité de produit analysé. En pratique, le composé est injecté en solution, de préférence en concentration plutôt qu'en masse. Il existe une relation proportionnelle entre la masse injectée et la concentration du soluté, si le même volume de solution est toujours injecté. Nous écrirons  $A = k_c \cdot C$ , avec,

$A$  = aire de pic

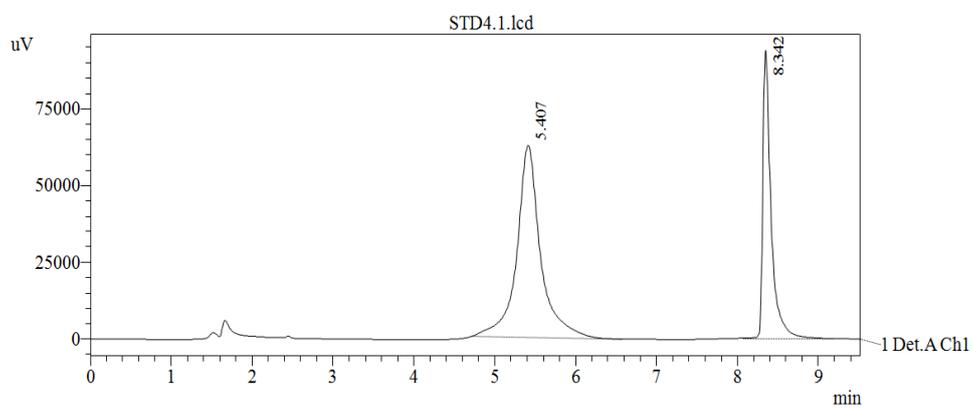
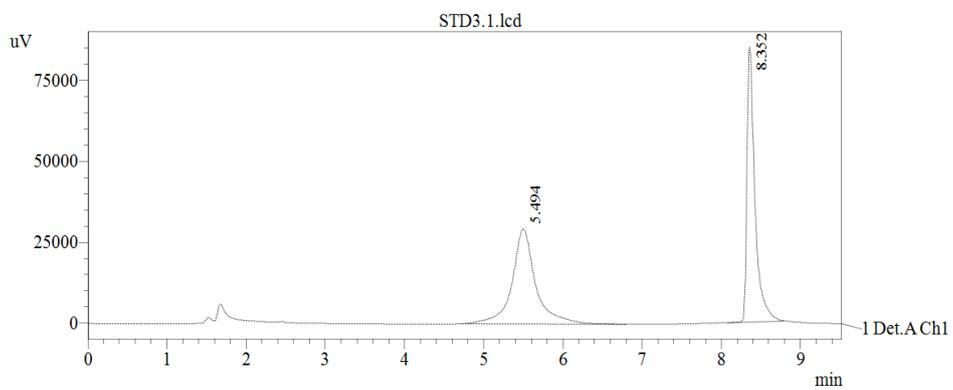
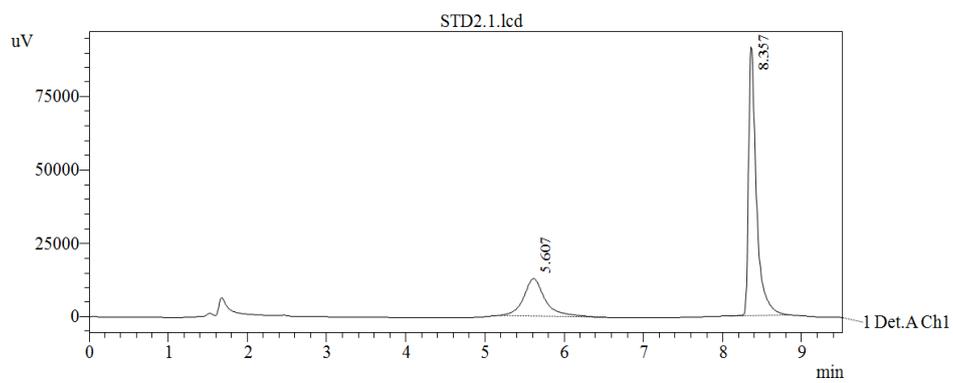
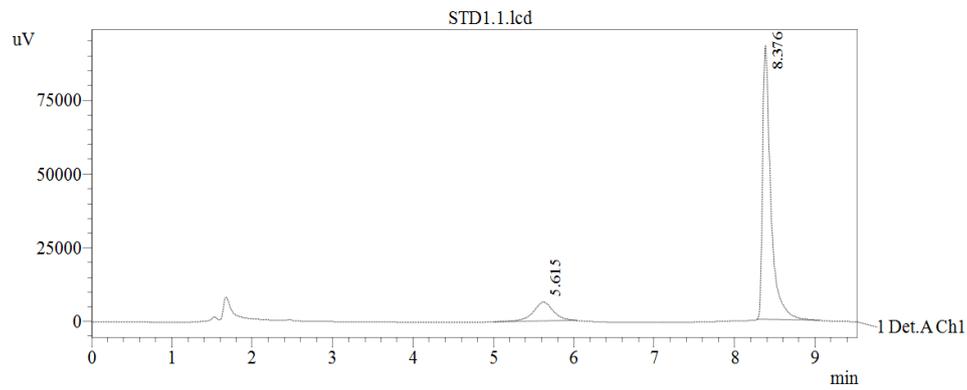
$k_c$  = coefficient de réponse du détecteur

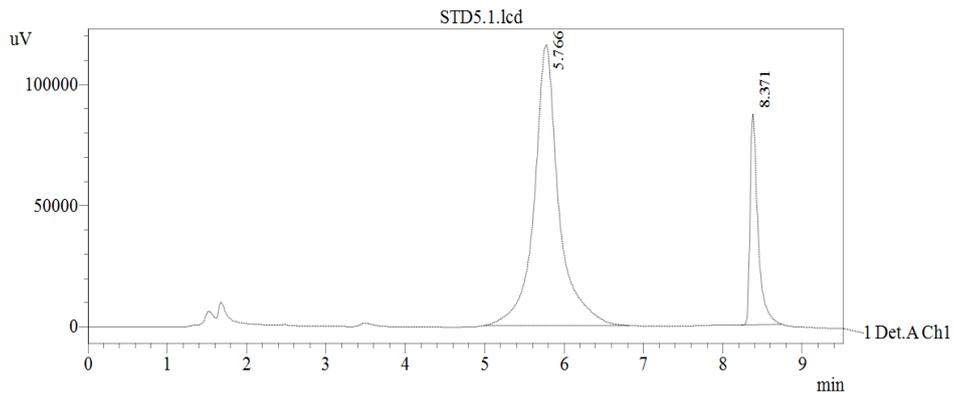
$C$  = concentration du composé injecté

# **Annexe II**

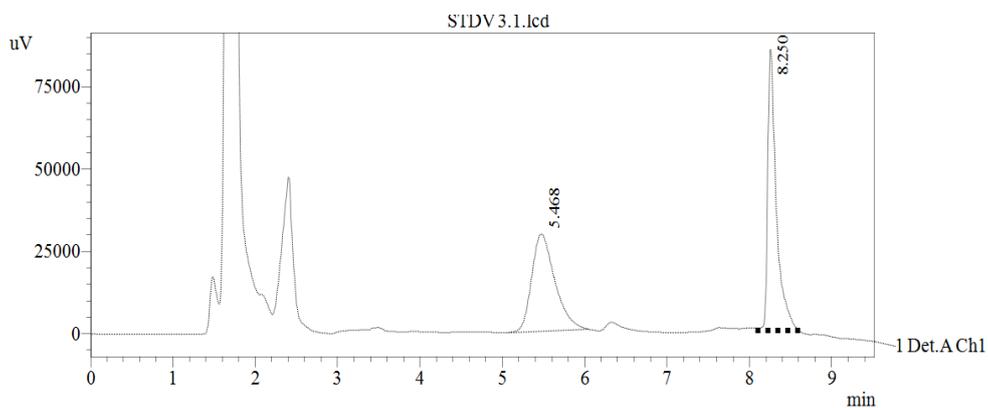
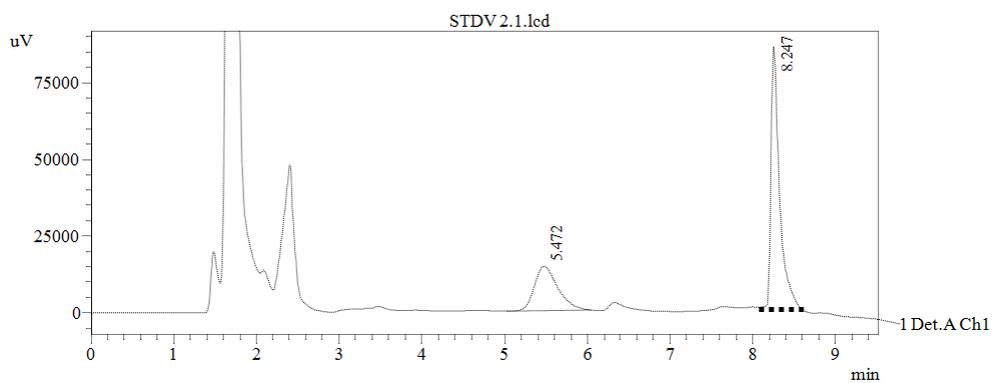
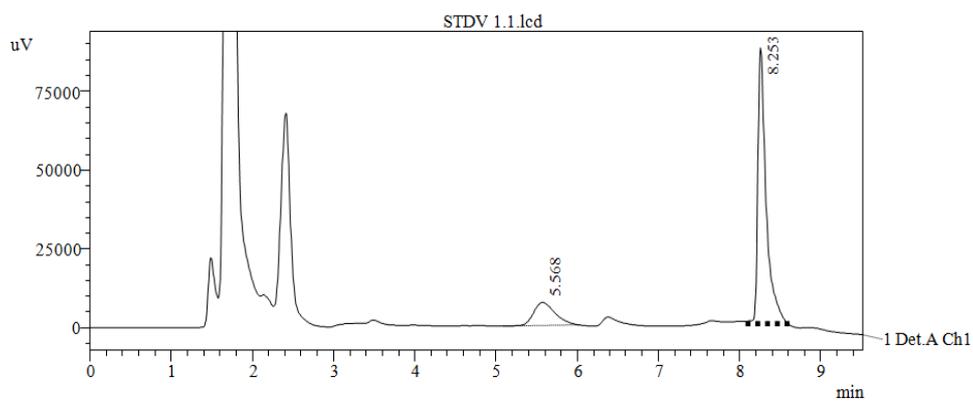
## **Chromatogrammes**

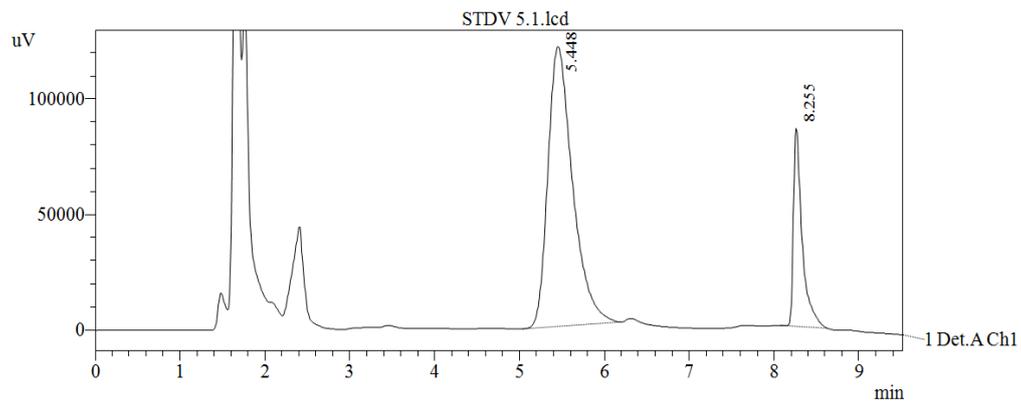
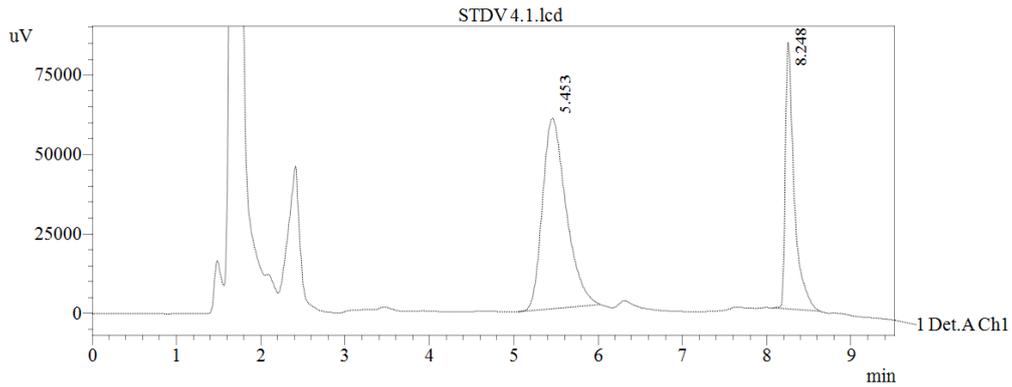
Les chromatogrammes des SE de la série 1 sont présentés comme suit



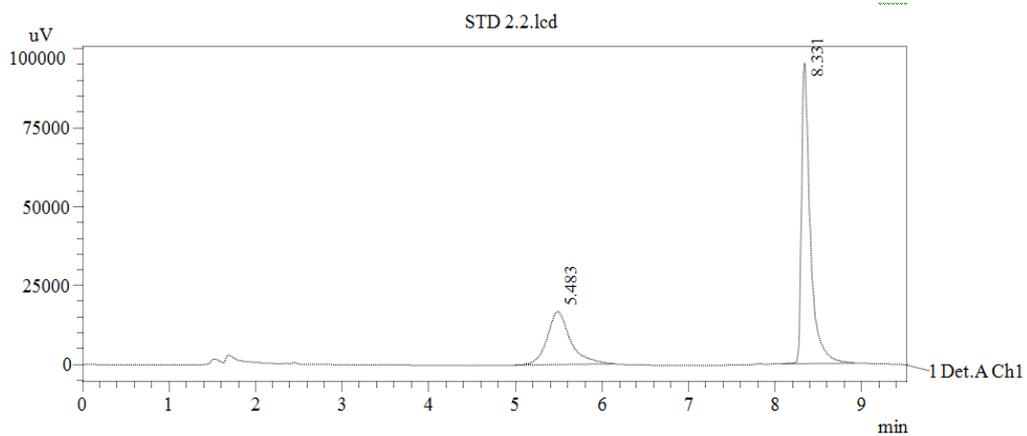
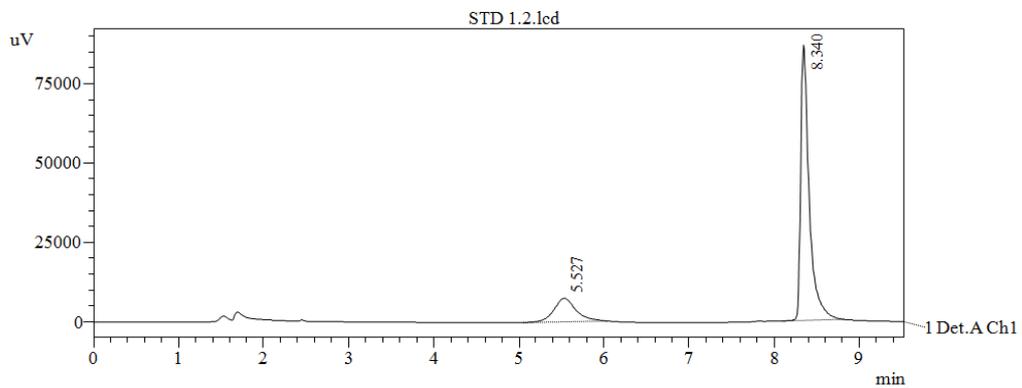


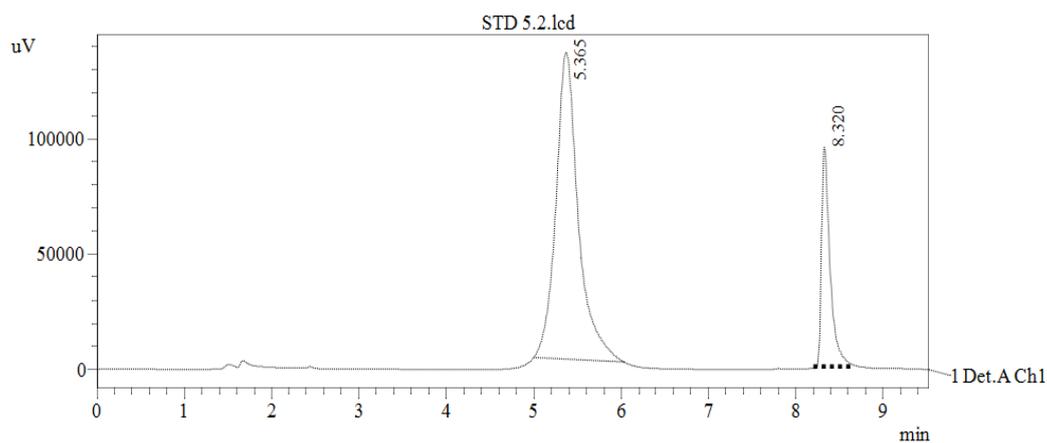
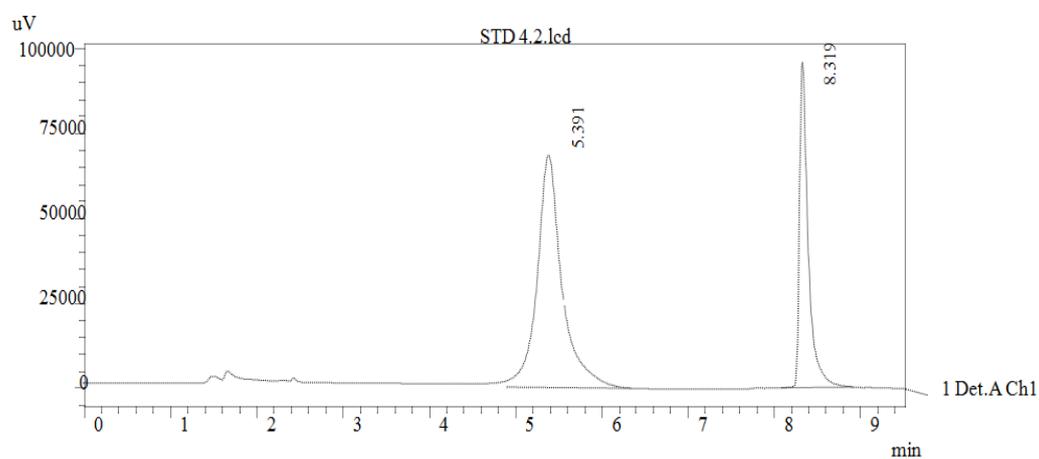
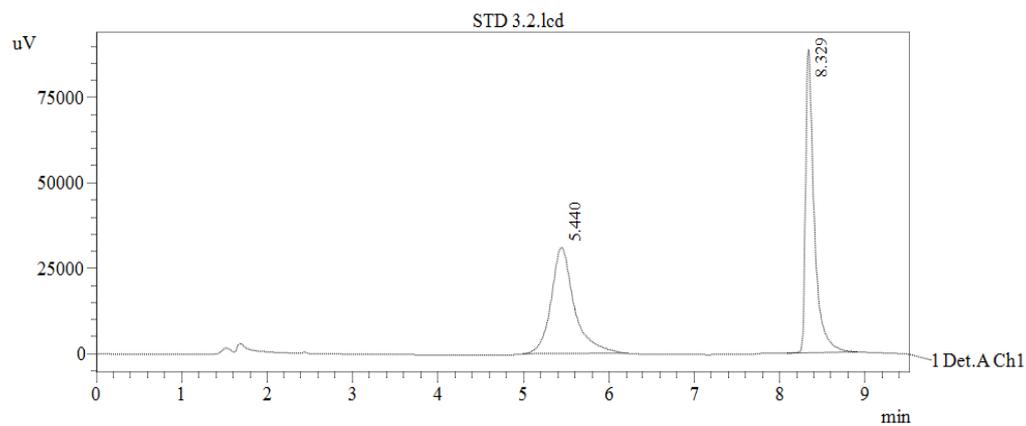
Les chromatogrammes des SV de la série 1 sont présentés comme suit



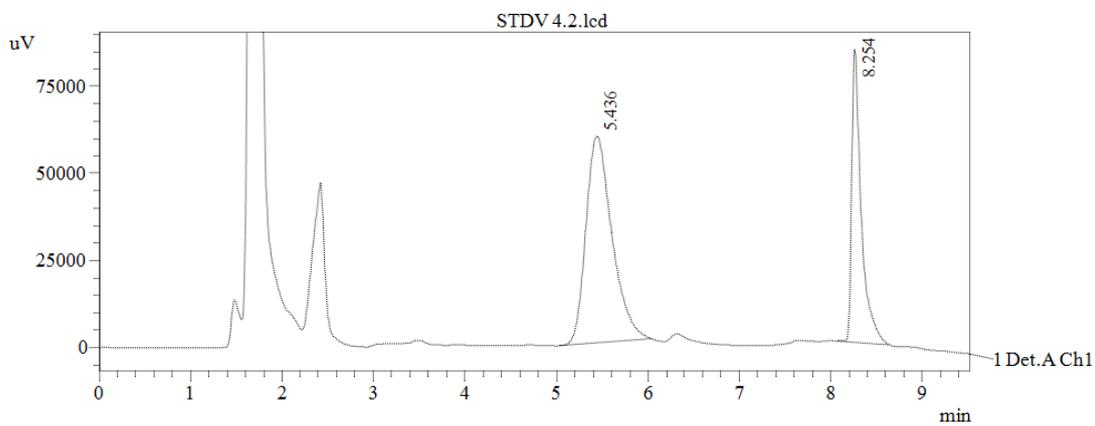
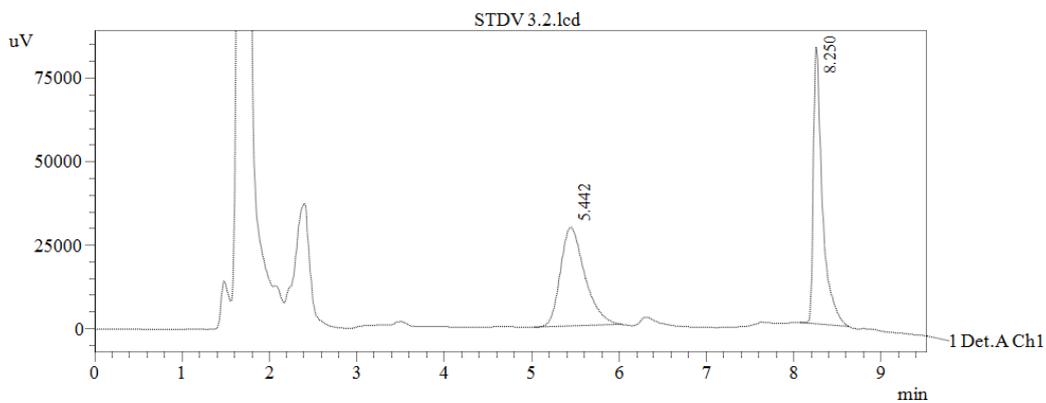
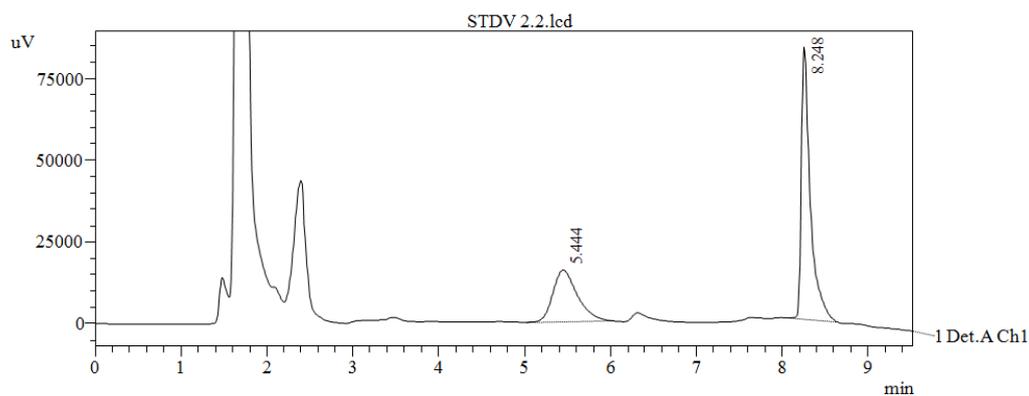
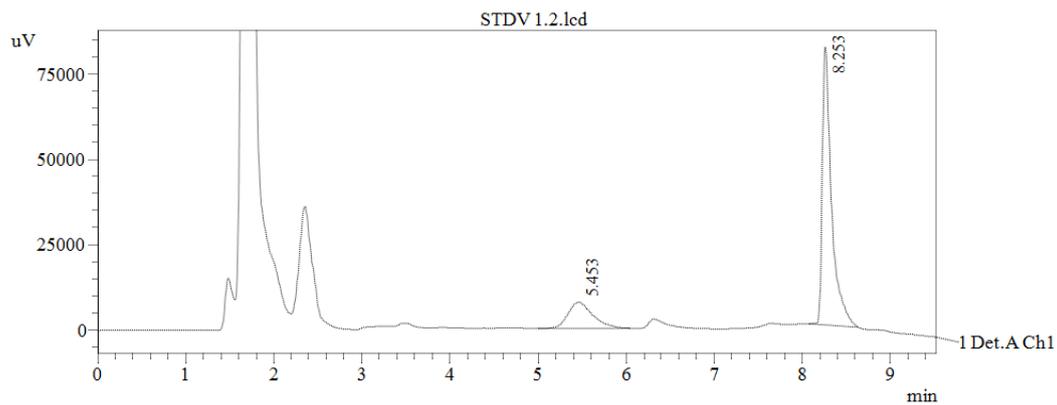


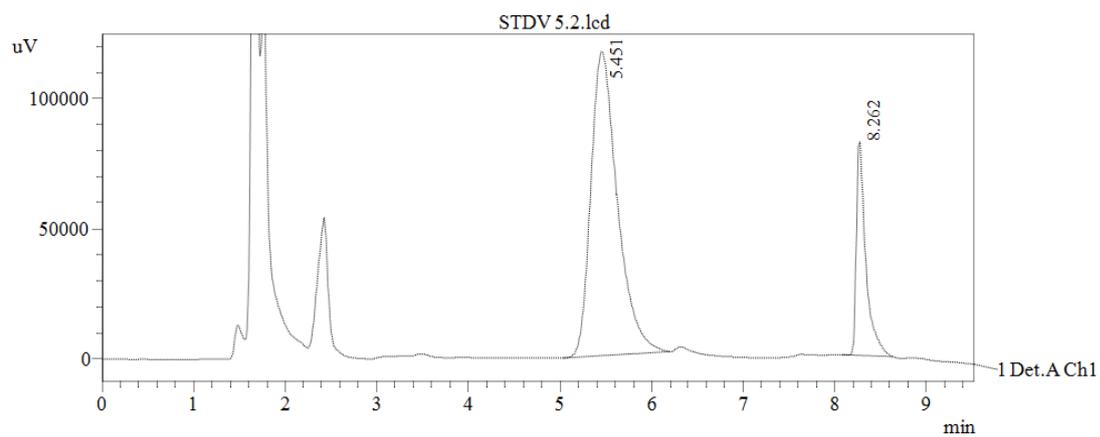
Les chromatogrammes des SE de la série 2 sont présentés comme suit



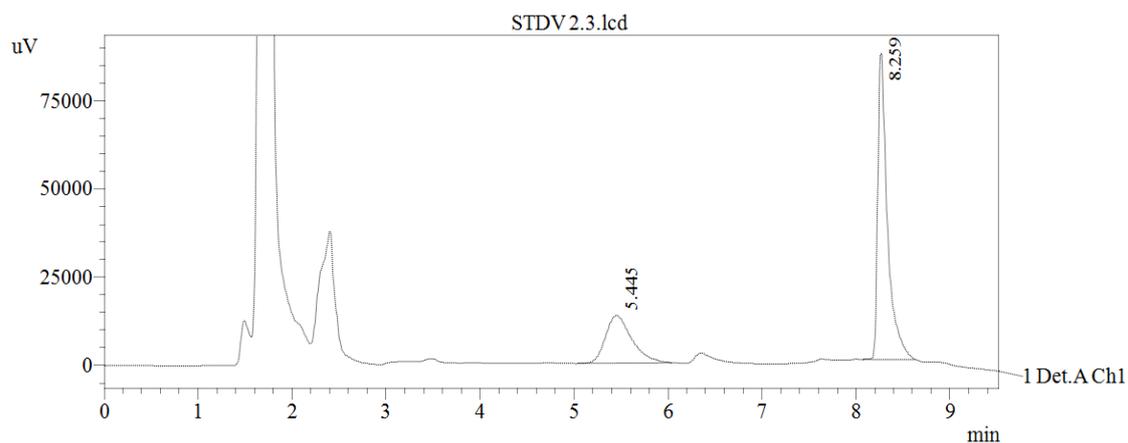
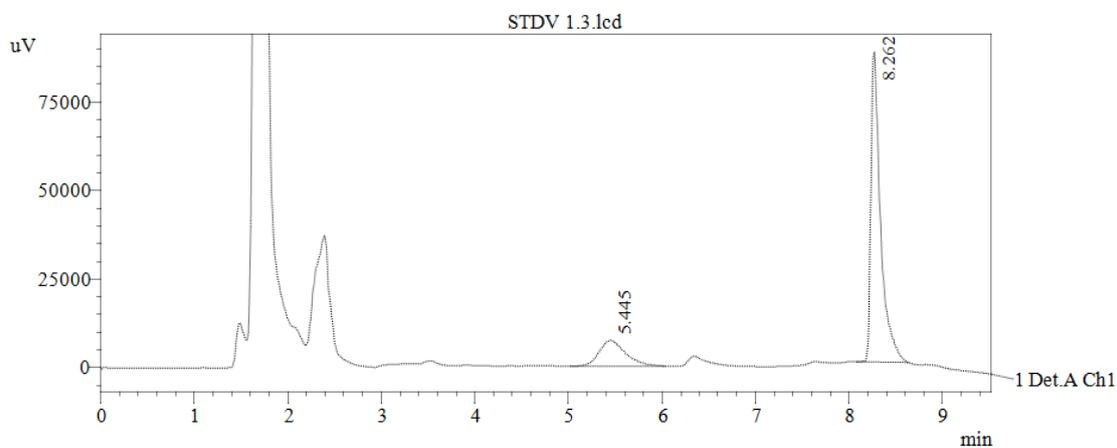


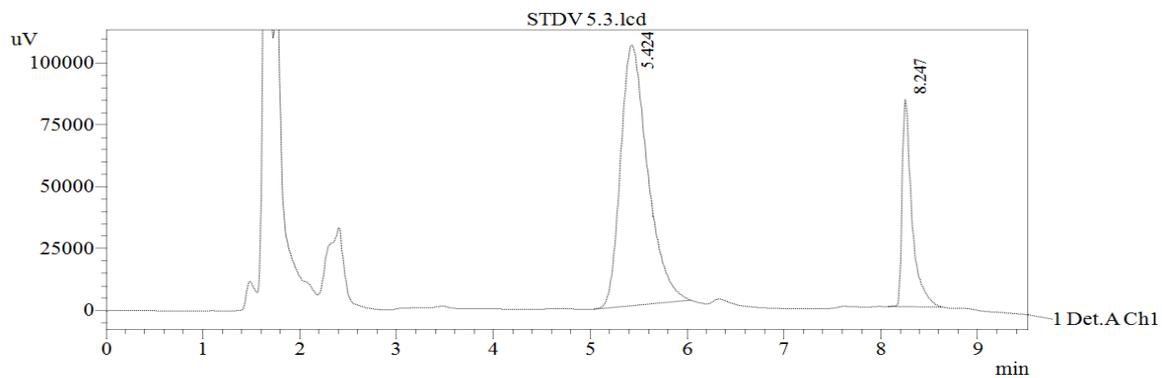
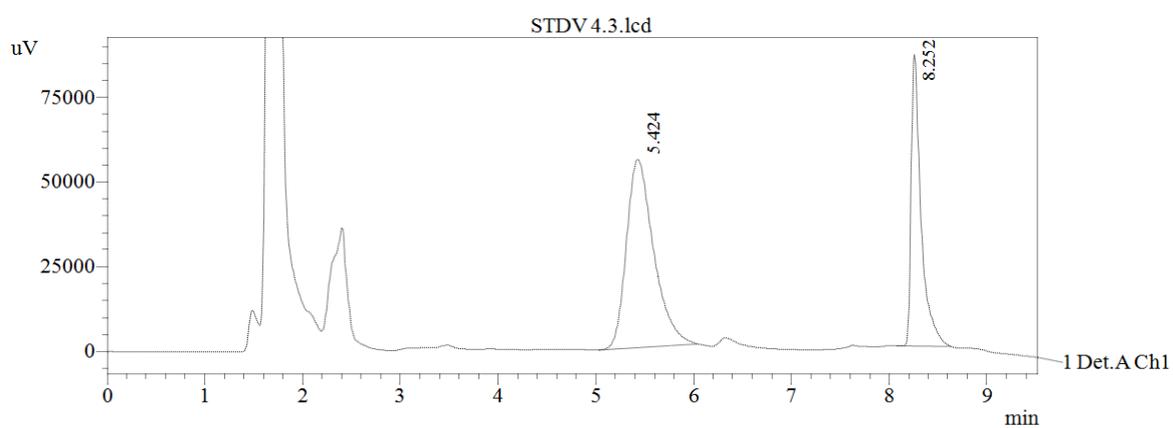
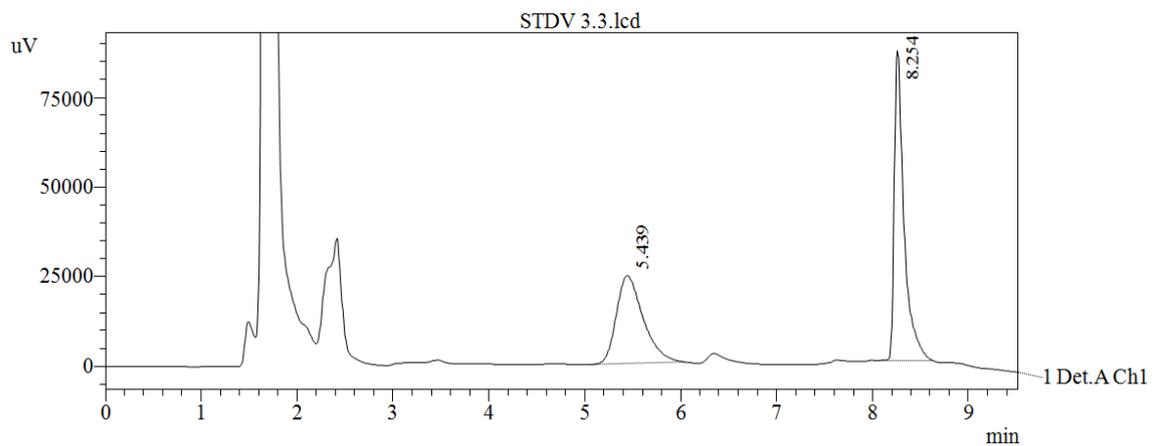
Les chromatogrammes des SV de la série 2 sont présentés comme suit





Les chromatogrammes des SV de la série 3 sont présentés comme suit





**Annexe III**  
**Fiche technique**

## Fiche technique

### Dosage du Métronidazole dans le plasma humain par HPLC

#### Application au suivi thérapeutique des patients

##### 1. Conditions de prélèvement

Effectuer un prélèvement veineux sur tube citraté, une à deux heures après la prise de 500 mg de MTZ par voie orale.

##### 2. Conditions de conservation et d'acheminement (à compléter par une étude de stabilité) :

L'échantillon est centrifugé directement après prélèvement, et acheminé rapidement au laboratoire ; conservé à 4°C.

##### 3. Conditions d'analyse

###### a. Préparation du diluant

L'HCl à  $C_2 = 0.1N$  est préparé suivant la relation  $C_1V_1 = C_2V_2$  comme suit :

Verser une petite quantité d'eau dans une fiole à volume  $V_2$  ; puis ajouter  $V_1$  d'HCl pur à  $C_1$  ensuite compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau pure.

- **Pour préparer une qsp 1 L :**

Pipeter 8.4 ml d'HCL pur dans une fiole de 1 l chargé d'eau pure, puis compléter au trait de jauge avec de l'eau pure.

###### b. Préparation de l'étalon interne

Peser 160 mg de fluconazole dans une fiole de 100 ml, solubiliser avec une quantité de diluant au vortex, puis compléter jusqu'au trait de jauge avec le diluant.

La concentration de l'étalon interne obtenu est de 1.6 mg/ml.

###### c. Préparation de la gamme d'étalonnage

A partir d'une solution mère de métronidazole obtenue après pesé de 80 mg de MTZ dans une fiole de 100 ml et solubilisée dans le diluant (HCL 0.1 N), réaliser une gamme d'étalonnage sur 3 niveaux de concentration 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml en se référant au protocole suivant :

Pipeter 5 ml de solution mère dans une fiole de 50 ml, avant de compléter jusqu'au trait de jauge avec le diluant, afin d'obtenir une concentration de 0.08 mg/ml ;

Pipeter 10 ml de solution mère dans une fiole de 50 ml, avant de compléter jusqu'au trait de jauge avec le diluant, afin d'obtenir une concentration de 0.16 mg/ml ;

Pipeter 10 ml de solution mère dans une fiole de 25 ml, avant de compléter jusqu'au trait de jauge avec le diluant, afin d'obtenir une concentration de 0.32 mg/ml ;

Faire une dilution 1/10 de chaque solution comme suit pour avoir les concentrations finales :

800 µl du diluant + 100 µl de la solution d'étalon interne + 100 µl de chaque solution du métronidazole ;

Après ajout de 500 µl de diluant pour chaque solution, homogénéiser le mélange avant de remplir les vials et de passer au dosage par HPLC.

Il est préconisé de réaliser 2 répétitions.

#### **d. Préparation du précipitant**

Préparer du TCA 2N suivant la relation :

$$n = C.V ; \quad n = \frac{m}{MM} \quad \text{MM: Masse Molaire du TCA : 163,38 g/mol}$$

$$\rightarrow m = 2V . M_{TCA}$$

-Peser **m** du TCA dans une fiole à volume **V**, puis dissoudre avec une petite quantité d'eau pure. Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau pure.

- **Pour préparer une qsp 1 L :**

Peser 65.32 g de TCA dans une fiole de 1 L, puis ajouter de l'eau pure jusqu'à dissolution complète du TCA. Compléter au trait de jauge avec de l'eau pure.

#### **e. Préparation de l'échantillon**

A 900 µl du plasma, ajouter 100 µl de l'étalon interne, 100 µl du précipitant et 400 µl de méthanol ; S'assurer de bien homogénéiser les solutions après ajout de chaque volume de réactifs.

Après centrifugation à 4000 tours/min pendant 10 min, récupérer le surnageant dans une vial pour doser à l'HPLC.

**f. Conditions chromatographiques**

Les conditions chromatographiques sont résumées dans le tableau suivant :

<b>Colonne</b>	<b>Longueur</b>	15 cm
	<b>Diamètres</b>	5 mm
	<b>Diamètre des particules</b>	4.5 um
	<b>Phase stationnaire</b>	C18 Gel de silice Octadécyle
<b>Volume injecté</b>	40 <i>ul</i>	
<b>Température</b>	Température ambiante	
<b>Débit</b>	1 ml/min	
<b>Détecteur</b>	Spectrophotomètre UV-Visible : longueur d'onde $\lambda=300$ nm pour le métronidazole $\lambda = 260$ nm pour le fluconazole	
<b>Phase mobile</b>	<b>Solution A</b> : Acétonitrile <b>Solution B</b> : Eau	
	<b>Gradient :</b> <b>0.0-2.0</b> :90 % de solution B <b>2.0-2.5</b> : de 90% à 60% de solution B <b>2.5-4.0</b> : 60% de solution B <b>4.0-4.5</b> :de 60% à 90% de solution B <b>4.5-9.5</b> : 90% de solution B	

**j. Expression des résultats**

La courbe d'étalonnage relie les rapports des aires de pic **y** et les rapports des concentrations introduites **x** utilisant la fonction mathématique **y=ax+b**, la méthode des moindres carrés permet de trouver la pente **a** et l'ordonnée à l'origine **b**.

Pour valider la courbe d'étalonnage, le facteur de détermination  $R^2$  doit s'approcher de 1 : 0,99.

Le rapport des concentrations **x** sont prédit à partir du rapport des aires des pics, en utilisant la courbe d'étalonnage. La concentration du MTZ est calculée par la formule suivante :

$$C_{MTZ} = C_{EI} \frac{(A_{MTZ}/A_{EI}) - b}{a} \mu\text{g/ml}$$

$C_{MTZ}$  : Concentration du métronidazole dans le plasma

$C_{EI}$  : concentration de l'étalon interne

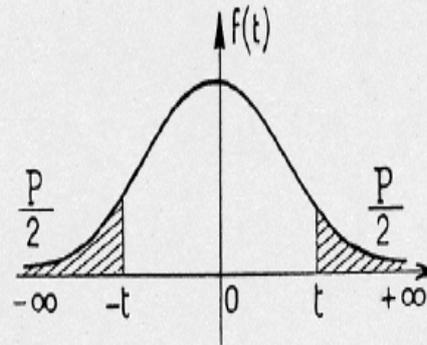
$A_{MTZ}$  : aire du pic du métronidazole

$A_{EI}$  : aire du pic de l'étalon interne

$b$  : ordonné à l'origine de la fonction de réponse

$a$  : pente de la fonction de réponse

**Annexe IV**  
**Table de Student**



$\frac{P}{v}$	0,90	0,80	0,70	0,60	0,50	0,40	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	0,325	0,510	0,727	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619
2	0,142	0,289	0,445	0,617	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,598
3	0,137	0,277	0,424	0,584	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,929
4	0,134	0,271	0,414	0,569	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,611
5	0,132	0,267	0,408	0,559	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,265	0,404	0,553	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,263	0,402	0,549	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,130	0,262	0,399	0,546	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,261	0,398	0,543	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,260	0,397	0,542	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,260	0,396	0,540	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,259	0,395	0,539	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,259	0,394	0,538	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,258	0,393	0,537	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,258	0,393	0,536	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,258	0,392	0,535	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,257	0,392	0,534	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,127	0,257	0,392	0,534	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,257	0,391	0,533	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,257	0,391	0,533	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,257	0,391	0,532	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,256	0,390	0,532	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,256	0,390	0,532	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767
24	0,127	0,256	0,390	0,531	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,256	0,389	0,531	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690
28	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659
30	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	0,126	0,255	0,388	0,529	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
80	0,126	0,254	0,387	0,527	0,679	0,848	1,046	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460
120	0,126	0,254	0,386	0,526	0,677	0,845	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373
$\infty$	0,126	0,253	0,385	0,524	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291

## Résumé :

Le métronidazole est un antibiotique et un antiparasitaire largement utilisé pour le traitement de plusieurs types d'infection, en raison de son efficacité et de sa tolérance. Mais pour certaine catégorie de patients le suivi thérapeutique du métronidazole est préconisé. Dans ce cadre, notre travail s'est porté sur la mise au point et la validation d'une méthode de dosage du métronidazole dans le plasma par HPLC en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision de validation. Les SE et SV ont été réalisés sur 5 niveaux de concentration : 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 12 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml. Les SV ayant été traités au TCA et au Méthanol pour éliminer les macromolécules contenues dans le plasma humain. A partir des résultats obtenus suite à l'analyse des standards nous avons calculé la fidélité, la justesse, ainsi que l'erreur totale avec les différents modèles mathématiques générés pour pouvoir construire le profil d'exactitude. Les résultats obtenus avec le modèle choisi  $y = ax + b$  montrent des CV < 15 %, un biais relatif < 15% et un pourcentage de recouvrement proche de 100%, ce qui nous permet d'attester de la fidélité et de la justesse de la méthode. Le profil d'exactitude définit un intervalle de quantification de [6,7 ; 32] µg/ml, pour lequel la méthode est valide et applicable en routine.

**Mots clés :** Métronidazole, HPLC, Suivi thérapeutique, Validation, Profil d'exactitude, plasma humain.

## Abstract:

Metronidazole is an antibiotic and antiparasitic agent widely used for the treatment of several types of infection, due to its effectiveness and tolerance. However, for certain categories of patients the therapeutic monitoring of metronidazole is recommended. In this context, our work focused on the development and validation of a method for the determination of metronidazole in plasma by HPLC using the accuracy profile as a validation decision tool. The SE and SV were performed on 5 levels of concentration: 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 12 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml. The SV were treated with TCA and Methanol to remove macromolecules contained in the human plasma. From the results obtained following the analysis of the standards we calculated the fidelity, the trueness, as well as the total error from the different mathematical models generated to be able to build the accuracy profile. The results obtained with the chosen model  $y = ax + b$  show CVs < 15%, a relative bias < 15% and a percentage of recovery close to 100%, which allows us to attest the fidelity and trueness of the method. The accuracy profile defines a quantification range of [6.7; 32] µg/ml, for which the method is valid and routinely applicable.

**Keywords:** Metronidazole, HPLC, Therapeutic monitoring, Validation, Accuracy profile human plasma.