

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1 –



FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE

***VALIDATION DES METHODES ANALYTIQUES EN
INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE***

**Mémoire de fin d'études Présenté en vue de l'obtention du Diplôme
de Docteur en Pharmacie**

Session : juillet 2018

Présenté par :

***-GHERIBI Khadidja.
-ZOUBIRI Fatma zohra.***

Encadré par :

**Dr. BENGHAZAL.I
Maitre-assistant en biophysique.**

Devant le jury :

**- Présidente : Dr. REGGABLI.F
Maitre-assistante en biophysique.**

**- Examineurs : Dr. REGGABLI.K
Maitre-assistante en pharmacologie.
Dr. HIMOUDACHE.H
Maitre-assistant en chimie minérale.**

Remerciements

Qu'il me soit d'abord permis de remercier et d'exprimer ma gratitude envers le bon dieu , qui nous à donner la patience et le courage pour que nous pouvons continuer ce travail.

On tient à exprimer toute nos gratitude à nos chers parents qui ont été là pour nous et nous ont donné le soutien morale et financière pour être là aujourd'hui.

On adresse nos sincères remerciements à MONSIEUR Benghazal.I, notre promoteur, qui a assuré la direction de ce travail, nous le remercie pour ses conseils pertinents et éclairés, son aide était pour nous d'une importance capitale dans la réalisation de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de nos profondes reconnaissances.

Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury, on les remercie Chaleureusement pour leur présence et pour avoir accepté d'examiner le présent mémoire.

On remercie tous les enseignants et les responsables de faculté de médecine pour leur aide et leur encouragement.

Sans oublier nos collègues dans le domaine de la recherche et durant les années d'étude, on tient à les remercier vivement.

Enfin, on voudrait associer à nos remerciements toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

Khadidja, Fatma Zohra

Dédicace

*C'est avec profonde gratitude et sincère mots,
Je dédie ce modeste travail de fin d'étude :*

*À ma mère qui m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir.
Tout ce que je peux t'offre ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte
Je te remercie pour tes sacrifices et pour l'affection dont tu m'as toujours entourée.*

*À mon père « l'épaule solide, l'œil attentif compréhensif et la personne la plus digne
de mon estime et de mon respect ». Aucune dédicace ne saurait mes sentiments.*

Que Dieu te préserve et te procure santé et longue vie inchaALLAH.

*À mon cher fiancé : Ibrahim elkhalil, merci pour ton amour, ton soutien, ta
gentillesse et tes encouragements qui ont toujours été pour moi d'un grand réconfort.*

*Je te dédie ce travail qui est aussi le tien, en implorant DIEU le tout puissant de nous
accorder une longue vie de bonheur, de prospérité et de réussite, en te souhaitant le brillant
avenir que tu mérites et de nous réunir dans l'au-delà inchaALLAH.*

*À mes beaux parents, que DIEU vous protège et vous procure santé et longue vie
inchaALLAH.*

À ma grand-mère et mon grand-père qui m'a comblé de Douaa.

*À mes chers frères : Zakaria et Zohir, que Dieu accomplisse vos vœux. Puisse l'amour et
fraternité nous unissent à jamais.*

À mes beaux frères : Abdelraouf et Imad, que dieu vous garde pour vos parents.

*À mes chères sœurs : Fatma Zohra, Ahlem, Dallel et Rekaia, auxquelles je souhaite réussite
et bonheur dans leur vie. Merci pour votre aide à la réalisation de ce travail.*

*À mes belles sœurs : Marwa, Safaa et Anfel, je vous souhaite la réussite dans vos études et
votre vie.*

*À mes nièces : Maria et Mayssaa, J'implore dieu qu'il vous apporte bonheur et santé. Je vous
aime de tout mon cœur.*

*À mes tantes, mes oncles, mes cousins : Khiereddine, Yacine, Aboubaker, Mohammed et ma
cousine Anisa, pour vos conseils et votre soutien moral.*

*À ma chère et adorable copine Fella, tu m'as toujours écouté attentivement et aidé
inlassablement, j'espère que cet œuvre pourra t'exprimer mon profond amour et respect.*

À mes adorables copines de chambre : Hafidha et Nesrine.

À mes copines avec qui j'ai partagé des moments des plus agréables : Asma, Khadidja, Nada.

*Une spécial dédicace à mon binôme : Fatma zohra que dieu te protège, je te souhaite une vie
successive pleine de bonheur inchaALLAH.*

*À tous les enseignements et les responsables de la faculté de médecine, je vous remercie
pour vos aide.*

À TOUTE MA FAMILLE ET A TOUS MES AMIS

Il me serait difficile de vous citer tous, vous êtes dans mon cœur, affectueusement.

Khadidja

Dédicace

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tous simplement que : Je dédie cette thèse à :

A Ma tendre Mère Bahia: Tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager.

A Mon cher Père Hakim : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, et le respect que j'ai toujours pour vous.

*Mes chers parents ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.
Que Dieu vous procure bonne santé et longue vie.*

A mon cher grand père Mohammed qui m'a comblé de Douaa , Aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur, l'ampleur de l'affection et de l'admiration que j'éprouve pour vous. Que DIEU vous protège et vous procure santé et longue vie inchaALLAH.

A mes chers beaux parents: Abd el rahmane et Dalila : Cette humble dédicace ne saurait exprimer nom grand respect et mon profond estime, Que Dieu vous garde et vous accorde longue vie et bonne santé.

A mon cher mari Youcef : Vous m'avez comblé par votre soutien et votre générosité. Ces quelques lignes ne sauraient exprimer toute l'affection et tout l'amour que je vous porte. Ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

A mon petit bébé Abd el rahmane ; je t'aime énormément.

A mon adorable sœur : Aya : Merci d'avoir montré tant de complaisance et de serviabilité à mon égard. Puisse Allah, le Très-Haut, vous accorde une vie heureuse et un avenir prospère.

A mes chers frères : Missoum et Ishak : Dieu vous procure une joyeuse vie pleine de réussites.

A ma très chère amie Faiza : qui ne cesse pas de m'encourager et me conseiller, je vous remercie pour ton soutien et pour toutes ces années passées ensemble. Je n'oublierai jamais les bons moments que l'on a partagés, ni ceux qui restent à venir.

A ma chère amie Khadidja, je te remercie d'être une bonne collègue dans ce travail, et une chère amie.

Fatma Zohra

Glossaire

- **Analyte** : entité physique ou chimique objet de la procédure d'analyse.
- **Biais** : estimation d'une erreur systématique.
- **Blanc** : essai réalisé en l'absence de matrice (blanc réactif) ou sur une matrice qui ne contient pas l'analyte (blanc analyte).
- **Bruit de fond** : signal parasite.
- **Capabilité** : La capabilité d'un processus de production est l'adéquation d'un procédé à réaliser une performance demandée.
- **Chimiométrie**: c'est l'application des outils mathématiques en particulier statistique à partir des données chimiques pour obtenir le max d'informations.
- **Coefficient de corrélation** : Le coefficient de corrélation linéaire (noté "R") entre deux variables est égal au rapport de leur covariance et du produit non nul de leurs écarts types. Le coefficient de corrélation est compris entre -1 et 1. Le fait que deux variables soit "fortement corrélées" ne démontre pas qu'il y ait une relation de causalité entre l'une et l'autre.
- **Coefficient de détermination** : C'est un indicateur (noté "R²") qui permet de juger la qualité d'une régression linéaire. Il détermine à quel point l'équation de régression est adaptée pour décrire une distribution de points. Le coefficient de détermination le carré du coefficient de corrélation et il est compris entre 0 et 1. Plus le coefficient de détermination se rapproche de 1, plus le nuage de points se rapproche de la droite de régression.
- **Coefficient de variation** : Rapport de l'écart-type à la moyenne.
- **Courbe d'étalonnage ou fonction de réponse** : relation existante entre la réponse (signal) et la teneur (quantité) en substance à examiner de l'échantillon à l'intérieur de l'intervalle de dosage.
- **Dosage** : détermination de la quantité de matière, la fraction, ou la concentration d'une substance précise (l'analyte) présente dans une autre ou dans un mélange (la matrice).
- **Ecart type** : paramètre statistique indiquant la dispersion des valeurs au niveau de la moyenne d'une série de mesures.
- **Echantillon d'étalonnage** : échantillons, avec ou sans matrice, de concentration connue qui permettent d'établir les points de gamme.
- **Echantillon de validation** : échantillons, reconstitués dans la matrice, dont la valeur vraie a pu être établie et qui sont utilisés pour la validation de la procédure d'analyse.
- **Erreur totale** : 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 est la somme de la justesse (biais) et de la fidélité. Elle est un bon indicateur de l'exactitude des résultats qu'elle produit.
- **Étalon** : molécule de référence.
- **Étalon interne** : molécule de référence ajoutée dans les échantillons d'étalonnage et les échantillons de validation avant leurs traitements.
- **Étalonnage ou calibration** : opération qui concerne les appareils de mesure ou de restitution de données. Réglage ou caractérisation de la réponse de l'appareil par rapport à un étalon.
- **Essais de dosage** : un dosage à une concentration définie.

- **Matériau de référence** : matériau ou substance dont une ou plusieurs valeurs de la (des) propriété(s) est (sont) suffisamment homogène(s) et bien définie(s) pour permettre de l'utiliser pour l'étalonnage de l'appareil, l'évaluation d'une méthode de mesurage, ou l'attribution de valeurs aux matériaux
- **Matériau de référence certifié** : matériau de référence, accompagné d'un certificat, dont une (ou plusieurs) valeur(s) de la (des) propriété(s) a une réalisation exacte de l'unité dans laquelle les valeurs de propriété sont exprimés et pour laquelle chaque valeur certifiée est accompagnée d'une incertitude à un niveau de confiance indiqué.
- **Mesure** : processus consistant à obtenir expérimentalement une ou plusieurs valeurs que l'on peut raisonnablement attribuer à une grandeur.
- **Matrice** : ensemble des constituants de l'échantillon autre que l'analyte
- **Méthode d'analyse** : procédure écrite décrivant l'ensemble des moyens et modes opératoires nécessaires pour effectuer l'analyse de l'analyte, c'est-à-dire : domaine d'application, principe et/ou réactions, définitions, réactifs, appareillage, modes opératoires, expression des résultats, fidélité, rapport d'essai.
- **Méthode d'analyse de référence** : méthode qui donne la valeur de référence acceptée de la grandeur de l'analyte à mesurer.
- **Valeur de référence acceptée** : valeur qui sert de référence, agréée pour une comparaison, et qui résulte :
 - a) d'une valeur théorique ou établie, fondée sur des principes scientifiques ;
 - b) d'une valeur assignée ou certifiée, fondée sur les travaux expérimentaux d'une organisation nationale ou internationale ;
 - c) d'une valeur de consensus ou certifiée, fondée sur un travail expérimental en collaboration et placé sous les auspices d'un groupe scientifique ou technique ;
 Dans le cadre particulier du présent document, la valeur de référence acceptée (ou valeur conventionnellement vraie) du matériau d'essai est fournie par la moyenne arithmétique des valeurs de mesures répétées selon la méthode de référence.
- **Validation** : opération destinée à démontrer, documents à l'appui, qu'une procédure, un procédé ou une activité conduit effectivement aux résultats escomptés. Elle comprend la qualification des systèmes et des équipements.
- **Variance** : carré de l'écart type.

Liste des abréviations

a: ordonnée à l'origine.

AFNOR: Association Française de Normalisation.

AOAC: Association of Official Analytical Chemists.

AMM: Autorisation de Mise sur le Marché.

ANDA: Abbreviated New Drug Applications

b: pente.

BLA: Biologics License Applications.

BPF: Bonnes Pratiques de Fabrication.

BPL : Bonnes Pratiques de Laboratoire.

CEE: Communauté Economique Européenne.

CFR: Federal Code of Regulation.

CGMP: Current Good Manufacturing Practice.

EEPA: Ecole Européenne des Philosophies et Psychothérapie Appliquées.

EFPIA : Fédération Européenne des Industries et Associations Pharmaceutiques.

EI : Etalon Interne.

EMA: European Medicines Agency.

EPA: Agence américaine de protection de l'environnement.

FDA: Food and Drug Administration.

ICH: International Council for Harmonization.

ISO: International Organization for Standardization.

IUPAC : Union internationale de chimie pure et appliquée.

NDA: New Drug Applications.

NF: National Formulary.

QC: Contrôle Qualité.

SCR: Substance Chimique de Référence.

SFSTP : Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques.

SOP: Standard Operating Procedure.

USP: United States Pharmacopeia.

Table de tableaux

Tableau	Page
Tableau 1 : Critères de validation	71
Tableau 2 : Éléments de données requis pour la validation	106

Table de figures

Figure	Titre	Page
Figure1	Problème analytique (adapté par Valcarcel et al 1997)	28
Figure2	Principaux objectifs (rectangles verts) poursuivis lors d'une étude inter laboratoires pour les trois entités impliquées (cercle) en se servant des critères définis (rectangle blanc).	32
Figure 3	Cycle de vie d'une méthode d'analyse.	34
Figure 4	Processus de fabrication d'un résultat.	41
Figure 5	Critères et procédures de validation liés au cycle de vie d'une méthode d'analyse.	42
Figure 6	Les procès d'évaluation pour contrôler les méthodes d'analyse durant l'utilisation en routine.	51
Figure 7	stratégie statistique selon STP 1992.	74
Figure 8	Domaine de quantification.	80
Figure 9	Profil d'exactitude	94

Sommaire

Glossaire.

Liste des abréviations.

Table des tableaux.

Table des figures.

Introduction.....	1
Chapitre I : Contextes réglementaires	4
I. Historique.....	5
1. USP XXII et FDA	5
2. Note explicative CEE	5
3. ICH	5
II- Bases réglementaires en vigueur	6
1. Bonnes pratiques de fabrication (BPF) européenne.....	6
1.1. Présentation	6
1.2. BPF et la validation.....	7
2. Bonnes pratiques de fabrication(BPF) algérienne	10
3. Conseil international d'harmonisation (ICH)	11
3.1. Présentation	11
3.2. Relation entre l'ICH et les exigences régionales en matière de BPF, les normes ISO	12
3.3. ICH et validation des méthodes analytiques	12
4. Agence européenne des médicaments (EMA).....	15
4.1. Présentation	15
4.2. Organisation	15
4.3. Ligne directrice sur la validation de la méthode bioanalytique (21juillet 2011)	16
5. Food and drugs administration (FDA).....	19
5.1. Présentation	19
5.2. FDA et validation des méthodes analytiques.....	19
6. Current Good Manufacturing Practice (CGMP) américaine	22
6.1. Présentation	22
6.2. GMP et validation des méthodes d'analyse	22
Bibliographie.....	24
Chapitre II : généralités sur la validation.....	25
I. Cycle de vie d'une méthode d'analyse.....	26
1. La sélection.....	29
2. Développement.....	31
3. La validation.....	31
4. Utilisation en routine	33
5. Revalidation.....	34
II. Développement et optimisation	34
1. Principes de planification des expériences	35
2. Robustesse	37
III. La validation.....	38
1. Définition.....	38
2. Critères de validation.....	42
3. Objectifs de la validation	46
4. Concept de « fitness-for-purpose »	47
5. Place de la validation analytique dans l'autorisation de mise sur le marché des médicaments.....	49

IV. L'utilisation en routine.....	50
1. les cartes de contrôle	51
2. les essais d'aptitude.....	52
Bibliographie	54
Chapitre III : Validation des méthodes analytiques.....	55
I. Introduction.....	56
II. Validation analytique selon l'ICH.....	56
Partie I : Texte sur la validation des procédures analytiques.....	57
1. Types de procédures analytiques validées.....	57
2. Critères de validation	58
2.1. Spécificité.....	59
2.2. Exactitude.....	59
2.3. Fidélité.....	59
2.3.1. Répétabilité.....	60
2.3.2. Fidélité intermédiaire.....	60
2.3.3. Reproductibilité.....	60
2.4. Limite de détection.....	60
2.5. Limite de quantification.....	60
2.6. Linéarité	60
2.7. Gamme	61
2.8. Robustesse.....	61
Partie II : validation des procédures analytiques : Méthodologie.....	61
1. Spécificité	61
1.1. Identification	62
1.2. Dosage et Impuretés Test (s).....	62
2. Linéarité.....	63
3. Gamme	64
4. Exactitude.....	64
4.1. Essai	65
4.2. Impuretés (Quantification)	65
5. Fidélité	66
5.1. Répétabilité.....	66
5.2. Fidélité intermédiaire.....	66
5.3. Reproductibilité.....	66
5.4. Données recommandées.....	66
6. Limite de détection.....	66
6.1. Sur la base de l'évaluation visuelle	67
6.2. Sur la base du signal-bruit	67
6.3. Sur la base de l'écart-type de la réponse et la pente	67
7. Limite de quantification	67
7.1. Sur la base de l'évaluation visuelle	68
7.2. Sur la base du signal-bruit	68
7.3. Sur la base de l'écart-type de la réponse et la pente	68
8. Robustesse.....	68
9. Vérification du système de suitability	69
III. Validation analytique selon STP1992	70
1. Guide STP1992.....	70
2. Critères de validation analytique.....	70
2.1. Spécificité	71
2.1.1. Principe actif	71

2.1.2-Produit fini	72
2.2-Linéarité, Exactitude et Fidélité.....	72
2.2.1-Définitions (selon la note explicative CEE III/844/87)	72
2.2.2-Protocole opératoire commun pour l'étude de la linéarité, de l'exactitude, et de la fidélité.....	73
2.2.2.1. Protocole.....	73
2.2.2. Linéarité et exactitude.....	73
2.2.2.2.1. Principe de protocole.....	73
2.2.2.2.2. Linéarité	74
A. Calcul de la pente (b).....	75
B. Calcul de l'ordonnée à l'origine (a).....	75
C. Calcul de coefficient de corrélation	75
D. Comparaison de l'ordonnée à l'origine (a) avec 0.....	75
E. Comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine des droites D_1 et D_2	75
F. Changement de variable	75
G. Test d'homogénéité des variances.....	76
H. Test de l'existence d'une pente significative.....	76
I. Test de la validité de régression.....	76
J. Méthodes de linéarisation.....	76
2.2.2.2.3. Exactitude.....	76
A. Système de référence.....	76
B. Vérification de l'homogénéité des variances liées.....	77
C. Test de validité des moyennes.....	77
D. Estimation du recouvrement moyen.....	77
2.2.2.2.4. Fidélité	77
2.2.2.2.4.1- Principe de protocole déterminant les critères de fidélité.....	77
A. Le plan expérimental	77
B. Condition de répétabilité	78
C. Condition de reproductibilité	78
D. Conditions minimales.....	78
2.2.2.2.4.2-Algorithmes	78
A- Transformation des données brutes en pourcentages de recouvrement.....	78
B- Moyenne des groupes	78
C- Dispersion à l'intérieur des groupes de mesure	78
D- Variance de répétabilité	79
E- Variance inter-groupe	79
F- Variance de reproductibilité.....	79
G- Expression des résultats	79
2.3- Sensibilité	79
2.4- Seuil de détection.....	79
2.4.1- Définition	79
2.4.2- Estimation de seuil de détection (SD)	80
2.5- Le seuil de quantification	80
2.5.1- Définition.....	80
2.5.2- Estimation de seuil de quantification (SQ).....	80
2.5.3- Domaine de quantification.....	80

3. Robustesse	81
3.1- Introduction	81
3.2- Définition	81
3.3- Conditions expérimentales et paramètres opératoires.....	81
3.4- Choix des paramètres opératoires.....	82
3.5- Champ d'application	82
3.6- Intérêt de l'étude de la robustesse	82
IV. Validation analytique selon STP2003-2006.....	83
1. Domaines d'application	84
2. Critères de validation	84
2.1.Spécificité-sélectivité.....	85
2.2.Fonction de réponse (courbe de d'étalonnage).....	85
2.3.Justesse.....	86
2.4. Fidélité.....	86
2.5.Exactitude.....	87
2.6.Linéarité	88
2.7.Limites de détection (LD).....	88
2.8.limite de quantification (LQ).....	88
2.9.Intervalle de dosage.....	88
2.10. Sensibilité	89
2.11. Stabilité	89
2.12. Rendement d'extraction	89
2.13. Effet de la dilution	90
3. Les règles de décision	90
4. Profil d'exactitude	90
4.1. Méthode du profil d'exactitude	90
4.2.Critères de validation et intervalles de tolérance	91
A. Justesse et fidélité par niveau	91
B. Intervalle de tolérance par niveau.....	92
4.3.Construction du profil d'exactitude et interprétation des résultats ...	93
4.4.La limite de quantification	94
V. Validation analytique selon l'USP chapitres 1225 et 1226.....	96
1. Introduction	96
2. Chapitre <1225> : Validation des méthodes officinales.....	97
2.1. Définition de la validation d'une méthode.....	97
2.2. Caractéristiques de la validation d'une méthode.....	97
2.2.1. Exactitude.....	98
2.2.1.1. Définition	98
2.2.1.2. Détermination	98
2.2.2. Fidélité.....	100
2.2.2.1. Définition.....	100
2.2.2.2. Détermination.....	100
2.2.3. Spécificité	100
2.2.3.1. Définition.....	100
2.2.3.2. Détermination.....	101
2.2.4- Limite de détection.....	101
2.2.4.1- Définition	101
2.2.4.2- Détermination.....	101
2.2.5- Limite de quantification	102
2.2.5.1- Définition.....	102

2.2.5.2- Détermination.....	103
2.2.6- linéarité et gamme.....	103
2.2.6.1- Définition de linéarité.....	103
2.2.6.2- Définition de la gamme.....	104
2.2.6.3- Détermination de la linéarité et de la gamme.....	104
2.2.7- Robustesse.....	104
2.2.8- capabilité du système.....	104
2.3.Éléments de données requis pour la validation.....	105
3. Chapitre «1226» : Vérification des procédures officinales.....	107
3.1. Processus de vérification.....	107
3.2. Exigences de vérification.....	108
Conclusion.....	110
Bibliographie.....	112

Introduction

Introduction

La qualité du médicament est évidemment de la plus haute importance du point de vue de la santé publique. Lorsqu'on crée un médicament nouveau, il faut commencer par en établir la qualité. Par ailleurs, le contrôle de la qualité d'un médicament constitue le premier indicateur, relativement facile à établir, que les caractéristiques du produit peuvent avoir évolué de manière à en avoir peut-être altéré aussi l'innocuité et l'efficacité.

La qualité du médicament dépend de deux groupes de deux facteurs qu'un médicament convienne à l'usage auquel on le destine:

- a) son efficacité et son innocuité « celle-ci limitant celle-là » ;
- b) sa conformité aux spécifications: identité, activité, pureté et autres caractéristiques.

Bien qu'il soit possible d'envisager séparément ces deux groupes de facteurs, ils sont, dans une certaine mesure interdépendante.

La qualité du médicament fait l'objet de nombreux contrôles tout au long de sa production puis de son cycle de vie. De l'arrivée des matières premières dans l'usine avant la formulation au contrôle post-commercial de stabilité, de nombreux protocoles et méthodes analytiques sont mis en œuvre pour garantir la conformité réglementaire des produits et en avoir une connaissance plus intime, en traquant les moindres variations. [1]

Le contrôle analytique d'un médicament ou de certains de ses constituants (conservateur par exemple) est indispensable pour garantir que le médicament en question restera sûr et efficace pendant toute sa durée de validité proposée, c'est-à-dire pendant les phases de stockage, de distribution et d'utilisation. Ce contrôle doit autant que possible être effectué selon des spécifications élaborées et validées lors de la mise au point du produit. Ainsi, on aura l'assurance que les spécifications de qualité sont applicables non seulement à la préparation pharmaceutique qui a servi à établir les caractéristiques biologiques des principes actifs, mais aussi aux formes galéniques mises sur le marché. A partir du moment où l'évaluation biomédicale du produit est terminée, les spécifications constituent la seule base d'acceptabilité de tous les lots ultérieurs. [2]

La validation d'une méthode est le procédé par lequel on confirme que la procédure analytique employée pour mener un test en particulier répond aux exigences de

Introduction

l'usage auquel elle est destinée. Les résultats de la validation de méthodes peuvent être utilisés pour juger la qualité, la fiabilité et la cohérence des résultats analytiques. Ce procédé fait partie intégrante de toute bonne pratique analytique. [3]

La validation des méthodes analytiques a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée. Ces principes s'appliquent à toutes les méthodes utilisées par un fabricant de produits pharmaceutiques, qu'elles soient ou non décrites dans une pharmacopée. [2]

L'objectif principal de notre travail est d'étudier les méthodologies de validation analytique en industrie pharmaceutique les plus couramment employés par les laboratoires de contrôle qualité et développement pharmaceutique à savoir le guide proposé par La Conférence Internationale sur l'Harmonisation des Exigences Techniques pour l'Enregistrement des Produits Pharmaceutiques à Usage Humain communément appelé ICH au travers de son guides qualité ICH Q2 (R1), les deux guides SFSTP 1992 et SFSTP 2003-2006 de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques. L'étude est menée sur la méthodologie de validation et les critiques objectives de chaque guide.

Nous avons considéré très utile d'exposer la méthodologie de la validation des méthodes analytique suivant la Pharmacopée des états unies (USP) selon les chapitres 1225 et 1226, car forcé de constater l'engouement des laboratoires de contrôles qualités et développements pharmaceutiques pour cette dernière.

Chapitre I

Contextes réglementaires

I. Historique :

1. USP XXII et FDA :

En 1985 une conférence rassemblant des industriels du médicament regroupés au sein d'une association la PMA (Pharmaceutical Manufacturers Association. Quality Control section) et des représentants de la pharmacopée américaine mit sur pied un processus d'élaboration de recommandations concernant la validation analytique.

En Avril 1986 un texte intitulé « current concept for the validation of compendial assays » fut publié dans pharmacopeial forum ; lequel texte fut discuté de l'automne 1987 jusqu'en 1988. le besoin se fit alors sentir d'inclure un chapitre sur la validation dans l'USP de façon à préciser les règles générales régissant tout changement de procédure analytique appliqué à un médicament.

En juillet 1988 ; un texte fut publié dans pharmacopeial Forum intitulé « <1225> validation of compendial assays guidelines » (p4129). Ce texte étudia les propositions de révision des procédures analytiques mentionnés dans la pharmacopée. Ce même texte inclus dans l'USP XXI ; supplément N°9 ; en juillet 1989 sous le titre « <1225> validation of compendial methods » et repris dans l'USP XXII pour application officielle à partir du 1^{er} janvier 1990.

Parallèlement ; dès février 1987 les « Guidelines for submitting samples and analytical data for methods evaluation » furent étudiées au niveau de Federal Code of Regulation (CFR) sous la référence 21 CFR 10.90 pour aider les demandeurs d'autorisation de mise sur le marché à suivre et la présentation des données rendus obligatoires (21 CFR 314.50).

2. Note explicative CEE :

Dès 1987 l'EFPIA a rassemblé les différents commentaires émanant des industries européens de la pharmacie sur les révisions successives du projet de note explicative élaboré par le comité des spécialités pharmaceutiques de la commission de la CEE (groupe qualité des médicaments). Le texte final fut adopté en août 1989 sous la référence III/844/87-FR.FINAL ; août 1989. [4]

3. ICH :

Directive parent: Texte sur la validation des procédures analytique :

La ligne directrice harmonisée tripartite sur le texte de l'ICH (précédemment codée Q2A) a été finalisée à l'étape 4 en octobre 1994. Elle identifie les paramètres de

validation nécessaires pour une variété de méthodes d'analyse. Il aborde également les caractéristiques qui doivent être prises en compte lors de la validation des procédures analytiques incluses dans les demandes d'enregistrement.

La ligne directrice harmonisée tripartite ICH sur la méthodologie (précédemment codée Q2B) a été finalisée à l'étape 4 en novembre 1996. Elle étend la ligne directrice Q2A pour inclure les données expérimentales réelles requises, ainsi que l'interprétation statistique, pour la validation des procédures analytiques.

La ligne directrice sur la méthodologie a été incorporée dans la ligne directrice sur le texte en novembre 2005, puis renommée Q2 (R1), sans aucun changement dans le contenu des deux lignes directrices. [5]

II. Bases réglementaires en vigueur :

La validation des méthodes analytiques a été largement discutée et critiquée par l'industrie pharmaceutique au cours des 20-30 dernières années ce qui a conduit à l'apparition des lignes directrices réglementaires aux États-Unis et en Europe qui ont été lentement modernisées pour fournir aux industries les outils nécessaire pour construire une approche de validation assurant la composition, la qualité, l'efficacité, et la pureté des produits fabriqués.[6]

1. Bonnes pratiques de fabrication (BPF) européenne:

1.1. Présentation :

Établies par des États ou la Commission européenne dans le cadre du développement des "démarches qualité", les BPF sont la traduction française de Good Manufacturing Practice - GMP - et s'appliquent à la fabrication de médicaments à usage humain ou vétérinaire.

Sont définies comme une partie de l'assurance qualité, qui assure que les médicaments sont produits et contrôlés de manière cohérente et systématique, conformément aux standards de qualité appropriés pour leur usage.

En France, le secteur pharmaceutique doit se conformer au guide des BPF publié en 2017, qui est constitué de 09 chapitres et de 20 Lignes Directrices. [7]

1.2. BPF et la validation:

Les réglementations relatives aux bonnes pratiques de fabrication de la validation analytique sont principalement :

CHAPITRE 6 : CONTRÔLE DE LA QUALITÉ**Contrôle**

6.15. Les méthodes d'analyse doivent être validées. Un laboratoire ayant recours à une méthode d'analyse et n'ayant pas procédé à la validation initiale est tenu de vérifier le caractère approprié de la méthode d'analyse. Toutes les opérations de contrôle décrites dans l'autorisation de mise sur le marché ou le dossier technique doivent être réalisées conformément aux méthodes approuvées.

ANNEXE 15 : QUALIFICATION ET VALIDATION**GENERALITES :**

Une approche de gestion du risque qualité doit s'appliquer tout au long du cycle de vie du médicament. Dans le cadre de ce système de gestion du risque qualité, les décisions concernant le champ d'application et le périmètre de la qualification et de la validation doivent être fondées sur une évaluation justifiée et documentée des risques en lien avec les installations, les équipements les utilités et les procédés. Une validation rétrospective n'est plus considérée comme une approche acceptable. Les données soutenant les études de qualification et/ou de validation obtenues de source externe aux fabricants peuvent être utilisées à la condition qu'une telle approche ait été justifiée et qu'il existe une garantie suffisante concernant la mise en place de contrôles tout au long du processus d'acquisition de ces données.

1. ORGANISATION ET PLANIFICATION DE LA QUALIFICATION ET DE LA VALIDATION :

1.1. Toutes les activités de qualification et de validation doivent être planifiées et prendre en considération le cycle de vie des installations, des équipements, des utilités, des procédés et du produit.

1.2. Les activités de qualification et de validation ne doivent être effectuées que par du personnel dûment formé et se conformant aux procédures approuvées.

1.3. Le personnel de qualification/validation doit rendre compte, selon les dispositions décrites dans le système qualité pharmaceutique, même si ce personnel n'en relève pas nécessairement, au service en charge du management de la qualité ou de l'assurance de la qualité. Toutefois, une supervision qualité appropriée doit être effective tout au long du cycle de vie de la validation.

1.4. Les éléments clés du programme de qualification et de validation du site doivent être clairement définis et documentés dans un plan directeur de validation (PDV) ou document équivalent.

1.5. Le PDV ou document équivalent doit définir le système de qualification /validation et inclure ou référencer au minimum des informations sur les éléments suivants :

I. La politique de qualification et de validation.

II. La structure organisationnelle incluant les rôles et responsabilités pour les activités de qualification et de validation.

III. Le récapitulatif des installations, des équipements, des systèmes et des procédés du site et leur statut de qualification et de validation.

IV. La maîtrise des changements et la gestion des déviations appliquées à la qualification et la validation.

V. Les recommandations pour la détermination des critères d'acceptation.

VI. Les références aux documents existants.

VII. La stratégie de qualification et de validation, incluant la re-qualification, le cas échéant.

1.6. Pour les projets de grande envergure et complexes, la planification revêt une plus grande importance et des programmes de validation distincts peuvent en faciliter la compréhension.

1.7. Une approche de gestion du risque qualité doit être utilisée pour les activités de qualification et de validation. Compte tenu de l'accroissement des connaissances et de l'expérience acquise au travers des changements rencontrés durant le développement ou la production commerciale, les évaluations des risques doivent être répétées selon le besoin. Le mode d'appréciation du risque utilisé pour soutenir les activités de qualification et de validation doit être clairement documenté.

1.8. Des vérifications appropriées doivent être intégrées dans les activités de qualification et validation pour garantir l'intégrité de toutes les données obtenues.

2. DOCUMENTATION, INCLUANT LE PDV :

2.1. De bonnes pratiques documentaires sont importantes pour appuyer la gestion des connaissances tout au long du cycle de vie du produit.

2.2. Tous les documents générés au cours de la qualification et la validation doivent être approuvés et autorisés par le personnel compétent tel que défini dans le système qualité pharmaceutique.

2.3. Les liens entre les documents dans les projets complexes de validation doivent être clairement définis.

2.4. Des protocoles de validation doivent être préparés en définissant les systèmes, les attributs et les paramètres critiques, ainsi que les critères d'acceptation associés.

2.5. Les documents de qualification peuvent être fusionnés, le cas échéant, par exemple une qualification d'installation (QI) et une qualification opérationnelle (QO).

2.6. Lorsque des protocoles de validation et d'autres documents sont fournis par un tiers prestataire de services de validation, le personnel compétent du site de fabrication doit confirmer leur adéquation et leur conformité aux procédures internes avant approbation. Les protocoles des fournisseurs peuvent être complétés par des documents ou des protocoles de tests supplémentaires avant utilisation.

2.7. Tout changement significatif au protocole approuvé pendant son exécution, (par exemple, concernant des critères d'acceptation, des paramètres de fonctionnement, etc.), doit être documenté comme une déviation et justifié selon une approche scientifique.

2.8. Les résultats qui ne satisfont pas aux critères d'acceptation préalablement définis doivent être enregistrés comme une déviation et faire l'objet d'investigation complète conformément aux procédures. Toute répercussion sur la validation doit être argumentée dans le rapport.

2.9. La revue et les conclusions de la validation doivent faire l'objet d'un rapport, et les résultats obtenus être confrontés aux critères d'acceptation. Tout changement ultérieur des critères d'acceptation doit être justifié selon une approche scientifique, et une recommandation finale formulée à l'issue de la validation.

2.10. Une libération formelle autorisant à procéder à la prochaine étape du processus de qualification et de validation doit être obtenue de la personne responsable concernée soit au travers de l'approbation du rapport de validation, soit dans un document de synthèse distinct. L'accord conditionnel autorisant à passer à la prochaine étape de la qualification peut être donné même si certains critères d'acceptation ou certaines déviations n'ont pas été entièrement traités et, dans ce cas, il existe une évaluation documentée confirmant l'absence d'incidence significative sur l'activité suivante.

9. VALIDATION DES MÉTHODES D'ANALYSE :

9.1. Toutes les méthodes analytiques utilisées dans pour la qualification, la validation ou les opérations de nettoyage doivent être validées avec une limite de détection et de quantification appropriée, si nécessaire, comme défini dans le chapitre 6 d'EudraLex, Volume 4, Partie I, tel que transcrit en droit national par décision du directeur général de l'Agence nationale de sécurité du médicaments et des produits de santé (ANSM).

9.2. En cas d'analyse microbiologique du produit, la méthode doit être validée pour confirmer que le produit n'a pas d'incidence sur la croissance des micro-organismes.

9.3. En cas d'analyse microbiologique des surfaces dans une salle propre, la validation doit être effectuée sur la méthode de prélèvement pour confirmer que les agents désinfectants n'ont pas d'incidence sur la croissance des micro-organismes. [8]

2. *Bonnes pratiques de fabrication(BPF) algérienne :*

➤ Contrôle de qualité :

5.3. Le laboratoire de contrôle a aussi pour tache la validation et la mise en œuvre des procédures de contrôle de qualité, la tenue de l'échantillonnage, la vérification de l'étiquetage des récipients, le contrôle de la stabilité des produits, une participation aux enquêtes effectuées à la suite de plaintes concernant la qualité des produits, etc. toutes ces opérations doivent suivre des procédures écrites.

5.6. Tout document de contrôle de la qualité concernant un lot doit être conservé un an après la date de péremption du lot et au moins 5 ans après la libération du lot.

5.9. Les méthodes d'analyse doivent être validées. Tous les contrôles décrits dans l'autorisation de mise sur le marché doivent être effectués conformément aux méthodes approuvées.

➤ **Document :**

6.19. Des procédures écrites des mesures prises et des résultats obtenue doivent être établies pour :

- les validations.
- le montage des appareils.
- l'entretien, le nettoyage et la désinfection.
- les questions de personnel y compris la formation.
- les réclamations.
- les retraits.
- les retours. [9]

3. Conseil international d'harmonisation (ICH) :

3.1. Présentation :

Le Conseil international pour l'harmonisation des exigences techniques pour les produits pharmaceutiques à usage humain (ICH), en anglais : International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human, est unique en ce qu'il rassemble les autorités de réglementation et l'industrie pharmaceutique pour discuter des aspects scientifiques et techniques de l'enregistrement des médicaments.

Depuis sa création en 1990, l'ICH a progressivement évolué pour répondre à l'aspect de plus en plus mondial du développement de médicaments. La mission de l'ICH est de parvenir à une plus grande harmonisation dans le monde entier pour garantir que des médicaments sûrs, efficaces et de haute qualité soient développés et enregistrés de la manière la plus efficace possible. Le 23 octobre 2015, l'ICH a annoncé des changements organisationnels, marquant 25 années d'harmonisation réussie.

Les objectifs des ICH sont regroupés en 4 catégories majeures et les codes sont désigner selon ces catégorie :

- **Q** : objectif qualité relatif à l'assurance qualité chimique et pharmaceutique.

Exemple :

Q1 désigne un test de stabilité.

Q3 désigne un test d'impuretés

– **S** : objectif sécurité relatif aux études précliniques in-vitro et in-vivo. Exemple :

S1 est un test de carcinogénéicité.

S2 est un teste de génotoxicité.

– **E** : objectif efficacité relatif aux études cliniques sur l’Homme.

Exemple :

E4 est relatif aux études des doses.

– **M** : objectif multidisciplinaire où des experts de plusieurs disciplines collaborent dans le développement de guides qui ne sont pas relatifs à une des catégories précédentes.

Exemple :

M1 concerne la terminologie médicale utilisée en pharmacovigilance. [10]

3.2. Relation entre l'ICH et les exigences régionales en matière de BPF, les normes ISO :

Les exigences régionales en matière de BPF «Guide des bonnes pratiques de fabrication pour les ingrédients pharmaceutiques actifs» et les lignes directrices d’ISO forment la base d’ICH. Pour atteindre les objectifs décrits ci-dessous, ICH augmente les BPF en décrivant des éléments spécifiques du système de qualité et des responsabilités de gestion. L’ICH fournit un modèle harmonisé pour un système de qualité pharmaceutique tout au long du cycle de vie d'un produit et est destiné à être utilisé conjointement avec les exigences GMP régionales. [11]

3.3. ICH et validation des méthodes analytiques :

Q2 (R1): « Validation des procédures analytiques: Texte et méthodologie».

Il est composé de deux parties :

Partie I: Texte sur la validation des procédures analytiques.

Ce document présente une analyse des caractéristiques à prendre en considération lors de la validation des procédures analytiques incluses dans le cadre des demandes d'enregistrement présentées dans la CE, le Japon et Etats-Unis. Le présent document ne cherche pas nécessairement à couvrir les tests qui peuvent être nécessaires pour l'enregistrement, ou l'exportation vers, d'autres régions du monde. En outre, cette présentation de texte sert une collection de termes et leurs définitions, et ne vise pas à donner des directives sur la façon d'accomplir la validation. Ces termes et définitions

sont destinés à combler les différences qui existent souvent entre les différents régulateurs et compendium de la CE, le Japon et Etats-Unis.

L'objectif de la validation d'une méthode analytique est de démontrer qu'il est adapté à sa destination. Un résumé tabulaire des caractéristiques applicables à l'identification, le contrôle des impuretés et des procédures de dosage est compris. D'autres procédures analytiques peuvent être prises en compte dans les futurs ajouts à ce document.

La discussion de la validation des méthodes d'analyse est dirigé vers les quatre types les plus courants de procédures analytiques:

- Tests d'identification.
- Les tests quantitatifs pour le contenu des impuretés.
- Essais limites pour le contrôle des impuretés.
- Les tests quantitatifs de la fraction active dans les échantillons de la substance médicamenteuse ou du produit médicamenteux ou d'un autre composant choisi (s) dans le produit pharmaceutique.

Bien qu'il existe de nombreuses autres procédures analytiques, telles que les tests de dissolution pour la détermination de la taille des produits pharmaceutiques ou des particules pour la substance médicamenteuse, ceux-ci ne sont pas traités dans le texte initial sur la validation des procédures analytiques. La validation de ces procédures analytiques supplémentaires est tout aussi important pour ceux qui sont énumérés ici et peut être traitée dans les documents suivants. Une brève description des types de tests examinés dans le présent document est fourni ci-dessous.

L'objectif de la procédure d'analyse doit être clairement compris puisque ce régira les caractéristiques de validation qui doivent être évalués. Les caractéristiques de validation typiques qui doivent être considérées sont énumérées ci-dessous:

- Spécificité (Specificity).
- linéarité (linearity).
- Exactitude (Justesse) (Accuracy).
- Fidélité (Precision).
- Répétabilité (Repeatability).
- Répétabilité intermédiaire (Intermediate precision)

- Limite de quantification (Quantification limit).
- Limite de détection (Detection limit).
- Intervalle de validité (Range).

Partie II: «validation des procédures analytiques : Méthodologie»

ICH Directive tripartite harmonisée Après avoir atteint l'étape 4 du processus de l'ICH lors de la réunion du Comité directeur de l'ICH le 6 Novembre 1996, et incorporé dans la ligne directrice de base en Novembre 2005, directive est recommandé pour adoption aux trois organismes de réglementation à l'ICH.

Ce document est complémentaire du document parent qui présente une discussion des caractéristiques qui doivent être pris en compte lors de la validation des procédures analytiques.

Son but est de fournir des conseils et des recommandations sur la façon de prendre en compte les différentes caractéristiques de validation pour chaque procédure d'analyse. Dans certains cas (par exemple, la démonstration de la spécificité), les capacités globales d'un certain nombre de procédures analytiques en combinaison peuvent être étudiées afin d'assurer la qualité de la substance médicamenteuse ou du produit médicamenteux.

De plus, le document donne une indication des données qui doivent être présentées dans une demande d'enregistrement.

Toutes les données pertinentes collectées lors de la validation et les formules utilisées pour le calcul des caractéristiques de validation doivent être présentées et discutées, selon le cas. Les approches autres que celles énoncées dans la présente ligne directrice peuvent être applicables et acceptable. Il est de la responsabilité du demandeur de choisir la procédure de validation et le protocole le plus approprié pour leur produit. Cependant, il est important de se rappeler que l'objectif principal de la validation d'une procédure d'analyse est de démontrer que la procédure est adaptée à sa destination. En raison de leur complexité, les procédures d'analyse pour les produits biologiques et biotechnologiques dans certains cas, peuvent être abordés différemment que dans le présent document.

Les matériaux de référence bien caractérisés, avec une pureté documentée, doivent être utilisés tout au long de l'étude de validation. Le degré de pureté nécessaire dépend de l'utilisation prévue.

Conformément au document parent, et par souci de clarté, ce document prend en compte les différentes caractéristiques de validation dans des sections distinctes. La disposition de ces sections reflète le processus par lequel peut être mis au point une procédure d'analyse et d'évaluation.

Dans la pratique, il est généralement possible de concevoir les travaux expérimentaux tels que les caractéristiques de validation appropriées peuvent être considérés simultanément pour fournir un son, la connaissance globale des capacités de la procédure d'analyse, par exemple: la spécificité, la linéarité, la fidélité et l'exactitude. [5]

4. Agence européenne des médicaments (EMA) :

4.1.présentation :

Est une agence communautaire créée en 1995.

Son organisation est inspirée par celle de l'Agence équivalente des États-Unis : Food and Drug Administration (FDA) qui a régulièrement travaillé à améliorer la transparence et l'indépendance face aux entreprises transnationales de la pharmacie. [7]

4.2.Organisation :

L'EMA est dirigée par un directeur exécutif et est dotée d'un secrétariat d'environ 440 personnes depuis 2007.

Le conseil d'administration est son organe de tutelle, chargé notamment des questions budgétaires.

L'EMA comprend en 2013 sept comités scientifiques :

- Comité des médicaments à usage humain (CHMP)
- Comité d'évaluation des risques en pharmacovigilance (PRAC)
- Comité des médicaments à usage vétérinaire (CVMP)
- Comité pour les médicaments orphelins (COMP)

- Comité pour les médicaments à base de plantes (HMPC)
- Comité pédiatrique (PDCO)
- Comité pour les thérapies avancées (CAT)

4.3. Ligne directrice sur la validation de la méthode

bioanalytique (21 juillet 2011) :

Cette directive définit les éléments clés nécessaires à la validation des méthodes bioanalytiques. La ligne directrice met l'accent sur la validation des méthodes de bioanalyse de génération de données de concentration quantitatives utilisées pour les déterminations de paramètres pharmacocinétiques et toxicocinétiques. Conseils et critères sont donnés sur l'application de ces méthodes validées dans l'analyse de routine des échantillons d'étude de l'animal et chez l'homme.

On peut appliquer ces éléments à la validation des méthodes analytiques.

➤ *Validation des méthodes :*

- ***La validation complète d'une méthode d'analyse :***

Une validation complète de la méthode doit être effectuée pour une méthode d'analyse neuve ou en fonction de la littérature.

L'objectif principal de validation de la méthode est de démontrer la fiabilité d'une méthode particulière pour la détermination d'une concentration d'analyte dans une matrice biologique spécifique, tel que le sang, le sérum, le plasma, l'urine ou la salive. De plus, si un anticoagulant est utilisé, la validation doit être effectuée en utilisant le même anticoagulant que pour les échantillons d'étude. En général, une validation complète doit être effectuée pour chaque espèce et la matrice concernée.

Dans certains cas, il peut être problématique à des fins de validation pour obtenir une matrice identique par rapport à la matrice des échantillons d'étude. Une matrice alternative appropriée peut être utilisée, par exemple, préparés par synthèse du liquide céphalorachidien, si cela est justifié.

Les principales caractéristiques d'un procédé bioanalytique qui sont essentielles pour assurer l'acceptabilité de la performance et la fiabilité des résultats d'analyse sont les suivants: sélectivité, limite inférieure de quantification, la fonction de réponse et de la plage d'étalonnage (performance de la courbe d'étalonnage), l'exactitude, la précision,

les effets de matrice, la stabilité de l'analyte (s) dans la matrice biologique et la stabilité de l'analyte (s) et de l'étalon interne dans les solutions mères et de travail et dans les extraits de moins toute la durée des conditions de stockage et de traitement.

Habituellement, un analyte ou d'un médicament doit être déterminé, mais parfois, il peut être approprié de mesurer plus d'une substance à analyser. Cela peut impliquer deux médicaments différents, mais peut également impliquer un médicament parent avec ses métabolites, ou les énantiomères ou isomères d'un médicament. Dans ces cas, les principes de validation et d'analyse appliquent à tous les analytes d'intérêt.

Normes de référence :

Lors de la validation et l'analyse Procédé d'échantillons d'étude, une matrice biologique vierge est dopée avec l'analyte (s) d'intérêt en utilisant des solutions de référence standard (s) pour préparer des étalons, des échantillons de contrôle de qualité et des échantillons de stabilité. En outre, un étalon interne approprié (s) (EI) peut être ajouté pendant le traitement d'échantillons dans des procédés chromatographiques.

Il est important que la qualité de la norme de référence et est assurée, la qualité (pureté) puisse influencer sur le résultat de l'analyse, et par conséquent les résultats des données de l'étude. Par conséquent, les normes de référence utilisées lors de la validation et l'analyse des échantillons étude devraient être obtenues à partir d'une source authentique et la traçabilité.

Normes de références appropriées comprennent les normes officinales, les normes disponibles dans le commerce, ou des normes suffisamment caractérisées préparées en interne ou par une organisation non commerciale externe.

Un certificat d'analyse est nécessaire pour garantir la pureté et fournir des informations sur les conditions de stockage, la date d'expiration et le numéro de lot de la norme de référence.

L'utilisation de ces normes n'est pas nécessaire pour EI, aussi longtemps que l'aptitude à l'emploi est démontrée, par exemple l'absence d'interférence analytique est montrée pour la substance elle-même ou toute impureté de celui-ci. Un certificat d'analyse n'est pas nécessaire.

Lorsque la détection spectrométrie de masse (MS) est utilisé dans la méthode bioanalytique, il est recommandé d'utiliser un isotope stable marqué IS lorsque cela est possible. Cependant, il est essentiel que la norme soit étiquetée de la pureté de l'isotope le plus élevé et qu'aucune réaction d'échange isotopique ne se produise. La présence d'un analyte non marqué doit être vérifiée et si les quantités relatives de l'analyte non marqué sont détectées l'influence potentielle doit être évaluée lors de la validation de la méthode.

- ***Validation partielle :***

Dans les cas où des modifications mineures sont apportées à une méthode d'analyse qui a déjà été validé, une validation complète peut ne pas être nécessaire, en fonction de la nature des modifications appliquées. Les modifications pour lesquelles une validation partielle peut être nécessaire comprennent le transfert de la méthode bioanalytique à un autre laboratoire, le changement dans le matériel, la gamme de concentration d'étalonnage, le volume d'échantillon limité, une autre matrice ou d'une espèce, le changement dans anticoagulant, la procédure de traitement de l'échantillon, les conditions de stockage, etc. Toutes les modifications devraient être déclarés et la portée de revalidation ou validation partielle justifiée. validation partielle peut varier d'aussi peu que la détermination de la précision intra-série et de précision, à une validation presque plein.

- ***Validation croisée :***

Lorsque les données sont obtenues à partir de méthodes différentes à l'intérieur et à travers des études ou lorsque les données sont obtenues dans une étude de différents laboratoires, en appliquant la même méthode, la comparaison de ces données est nécessaire et une validation croisée des méthodes analytiques appliquées doit être effectuée. Les différences dans la préparation de l'échantillon ou l'utilisation d'une autre méthode d'analyse peuvent aboutir à des résultats différents entre les sites d'étude. Validation croisée doit être effectuée à l'avance des échantillons d'étude en cours d'analyse, si possible. Pour la validation croisée, le même ensemble d'échantillons de CQ ou d'échantillons d'étude doit être analysé par les deux méthodes d'analyse. Pour les échantillons QC, le obtenu signifie précision par les différentes méthodes devraient être à 15% et peut être plus large, si cela est justifié. Pour les échantillons de l'étude, la différence entre les deux valeurs obtenues doit être

comprise dans 20% de la moyenne d'au moins 67% des unités répétées. Le résultat de la validation croisée est essentiel pour déterminer si les données obtenues sont fiables et si elles peuvent être comparées et utilisées. [12]

5. Food and drugs administration (FDA):

5.1. Présentation :

Food and Drug Administration FDA, « Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux » est chargée de protéger la santé publique en assurant la sûreté, l'efficacité et la sécurité des médicaments humains et vétérinaires, des produits biologiques, des dispositifs médicaux, de l'approvisionnement alimentaire de notre nation, des cosmétiques et des produits émettant des radiations.

La FDA est également chargée de promouvoir la santé publique en accélérant les innovations qui rendent les médicaments plus efficaces, plus sûrs et plus abordables et en aidant le public à obtenir les informations scientifiques précises dont ils ont besoin pour utiliser les médicaments et les aliments.

La FDA est également chargée de réglementer la fabrication, la commercialisation et la distribution des produits du tabac pour protéger la santé publique et réduire l'usage du tabac par les mineurs.

Enfin, la FDA joue un rôle important dans la capacité antiterroriste de la nation. La FDA assume cette responsabilité en assurant la sécurité de l'approvisionnement alimentaire et en favorisant le développement de produits médicaux pour répondre aux menaces délibérées et émergentes de santé publique.

La FDA est organisée en un certain nombre de bureaux et de centres dirigés par un commissaire nommé par le président. Les entités les plus connues sont les cinq centres: le Centre d'évaluation et de recherche sur les médicaments (CDER), le Centre d'évaluation et de recherche en biologie (CBER), le Centre de recherche sur les médicaments et la santé radiologique (CDRH), le CFSAN et le Centre de médecine vétérinaire (CVM). [13]

5.2. FDA et la validation des méthodes analytiques:

➤ Procédures analytiques non statistiques :

La validation de la méthode analytique est le processus consistant à démontrer qu'une procédure analytique est adaptée à l'usage auquel elle est destinée.

La méthodologie et l'objectif des procédures analytiques doivent être clairement définis et compris avant d'entreprendre des études de validation.

Cette compréhension est obtenue à partir d'études de développement et d'optimisation de méthodes scientifiquement fondées.

Les données de validation doivent être générées selon un protocole approuvé par le promoteur conformément aux bonnes pratiques de fabrication actuelles avec la description de la méthodologie de chaque caractéristique de validation et des critères d'acceptation prédéterminés et justifiés, en utilisant une instrumentation qualifiée.

Protocoles pour la substance médicamenteuse et les analytes ou mélange d'analytes dans les matrices respectives devraient être développées et exécutées.

Vous devez inclure les détails des études de validation et des résultats avec votre application.

➤ *Caractéristiques de validation :*

Bien que toutes les caractéristiques de validation ne soient pas applicables à tous les types de tests, les caractéristiques de validation typiques sont les suivantes :

- Spécificité.
- Linéarité.
- Exactitude.
- Fidélité (Répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité).
- Gamme.
- Limite de détection.
- Limite de quantification.

Si une procédure est une procédure analytique quantitative validée qui peut détecter des changements dans un ou plusieurs attributs de qualité de la substance médicamenteuse et du produit médicamenteux pendant le stockage, elle est considérée comme un test indicateur de stabilité.

Pour démontrer la spécificité d'un test indiquant la stabilité, une combinaison de défis doit être effectuée. Certains défis comprennent l'utilisation d'échantillons dopés avec des analytes cibles et toutes les interférences connues; des échantillons ayant

subi diverses conditions de stress en laboratoire; et des échantillons de produits réels (produits par le processus de fabrication final) qui ont vieilli ou ont été stockés dans des conditions de température et d'humidité accélérées.

En tant que détenteur de la NDA, ANDA ou BLA, vous devez: (1) soumettre les données utilisées pour établir que les procédures analytiques utilisées dans les tests répondent aux normes d'exactitude et de fiabilité, et (2) informer la FDA de chaque changement dans chaque condition établie dans une demande approuvée au-delà des variations déjà prévues dans la demande, y compris les modifications aux procédures analytiques et autres contrôles établis.

Les données soumises doivent inclure les résultats de l'évaluation de la robustesse de la méthode, qui est généralement réalisée pendant l'élaboration de la méthode ou dans le cadre d'une étude de validation planifiée.

➤ ***Procédures analytiques officinales :***

L'adéquation d'une procédure analytique (par exemple, USP / NF, les méthodes officielles d'analyse de l'AOAC International, ou d'autres références normalisées reconnues) doit être vérifiée dans des conditions d'utilisation réelles. L'information démontrant que les procédures d'analyse USP / NF sont appropriées pour le produit médicamenteux ou la substance médicamenteuse doit être incluse dans la soumission et produite selon un protocole de vérification.

Le protocole de vérification devrait inclure, sans s'y limiter:

(1) la méthodologie officinale à vérifier avec des critères d'acceptation prédéterminés, (2) les détails de la méthodologie (par exemple, adéquation du ou des réactifs, de l'équipement, des composants, conditions chromatographiques, colonne, type (s) de détecteur, sensibilité de la réponse du signal du détecteur, aptitude du système, préparation de l'échantillon et stabilité). La procédure et l'étendue de la vérification devraient dicter quels tests de caractéristiques de validation devraient être inclus dans le protocole (p. Ex. Spécificité, LD, LQ, exactitude, fidélité). Les considérations qui peuvent influencer les tests caractéristiques dans le protocole peuvent dépendre de situations telles que si les limites de spécification sont plus strictes que les critères d'acceptation officinale, ou si les profils RT ou RRT changent dans les méthodes chromatographiques en raison de la voie de synthèse de la substance médicamenteuse

ou des différences dans le processus de fabrication ou la matrice de produit médicamenteux.

Les études de robustesse des analyses officinales n'ont pas besoin d'être incluses, si les méthodes sont suivies sans déviations. [14]

6. *Current Good Manufacturing Practice (CGMP) américaine :*

6.1. *Présentation :*

La FDA s'assure de la qualité des médicaments en surveillant de près la conformité des fabricants de médicaments à ses règlements sur les bonnes pratiques de fabrication (CGMP). Les règlements CGMP pour les médicaments contiennent des exigences minimales pour les méthodes, les installations et les contrôles utilisés dans la fabrication, la transformation et l'emballage d'un produit pharmaceutique. Les règlements font en sorte qu'un produit est sûr pour l'usage, et qu'il a les ingrédients et la force qu'il prétend avoir.

Le code régissant les Bonnes Pratiques de Fabrication est Code of Federal Regulations (CFR). FDA partie de la CFR est dans le titre 21, qui interprète la Loi fédérale sur les aliments, drogues et cosmétiques et les lois connexes, y compris la Loi sur le Service de santé publique. Les réglementations relatives à la qualité pharmaceutique ou aux médicaments figurent dans plusieurs parties du Titre 21, y compris les sections des parties 1-99, 200-299, 300-499, 600-799 et 800-1299.

6.2. *GMP et validation des méthodes d'analyse :*

21 CFR Part 211. Current Good Manufacturing Practice for Finished Pharmaceuticals.

➤ Sous-partie I : Contrôles de laboratoire

§ 211.160 : Exigences générales.

(4) Calibrage des instruments, appareils, jauges et dispositifs d'enregistrement à des intervalles appropriés conformément à un programme écrit établi contenant des instructions précises, des calendriers, des limites d'exactitude et de précision et des dispositions correctives pour l'exactitude et / ou la précision des événements les limites ne sont pas respectées. Les instruments, appareils, jauges et dispositifs

d'enregistrement ne répondant pas aux spécifications établies ne doivent pas être utilisés.

➤ **Sous-partie J** : Dossiers et rapports.

§ 211.194 : Dossiers de laboratoire.

(2) Une déclaration de chaque méthode utilisée pour tester l'échantillon. La déclaration doit indiquer l'emplacement des données qui établissent que les méthodes utilisées pour les essais de l'échantillon répondent aux normes d'exactitude et de fiabilité applicables au produit testé. (Si la méthode employée est dans la version actuelle de la pharmacopée des États-Unis, du National Formulary, de l'AOAC INTERNATIONAL, du livre des méthodes ou dans d'autres références normalisées reconnues, ou est détaillée dans une nouvelle demande approuvée, une déclaration indiquant la méthode et la référence suffira). L'adéquation de toutes les méthodes d'essai utilisées doit être vérifiée dans les conditions d'utilisation réelles. **[15]**

Bibliographie

[1] Rapport du Comité OMS d'experts sur les politiques pharmaceutiques nationales, Genève, 19-23 juin 1995: Contribution à la mise à jour des directives de l'OMS pour l'élaboration des politiques pharmaceutiques nationales(1995; 96 pages)

[2] Assurance de la qualité des produits pharmaceutiques - Recueil de directives et autres documents - Volume 1(1998; 278 pages)

[3] validation des méthodes : définition trouvé sur : <https://www.greenfacts.org/fr/glossaire/tuv/validation.htm> . Consulter le 02/06/2018

[4] J. Caporal-Gautier, J.M. Nivet, P. Algranti, M. Guilloteau, M. Histe, M. Lallier, J.J. N'guyen-Huu, R. Russoto. - Guide de validation analytique : Rapport d'une commission SFSTP. –I. Méthodologie, 205-226, 1992.

[5] ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION ANALITICAL PROCEDURE : texte et méthodologie Q2 (R1) novembre 2006

[6] Jouko Yliruusi, A literature review of pharmaceutical process validation, 2012.Disponible sur «<http://www.pharmtech.com>».

[7] P. WEHRLE pharmacie galénique : Formulation et technologie pharmaceutique.

[8] Journal officiel de la République française, -GUIDE DES BONNES PRATIQUES DE FABRICATION- décision du 29 décembre 2015, modifiée par la décision du 30 décembre 2016 et publier en aout 2017.

[9] Pharmacie documentation juridique 1997 Saidal.

[10] présentation de l'ICH disponible sur The ICH official website: <https://www.ich.gov>

[11] ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q8 (R2) 2009.

[12] EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2** Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) -Guideline on bioanalytical method validation-21 July 2011

[13] David Mantus Douglas, J. Pisano, FDA Regulatory Affairs Third Edition, 3-18.

[14] Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics-Guidance for Industry- July 2015. Disponible sur <https://www.fda.gov>

[15] Current Good Manufacturing Practice (CGMP) Regulations, disponible sur <https://www.fda.gov>

Chapitre II

Généralités sur la validation

Le principe de la validation des procédures analytiques est, aujourd'hui largement, répandu dans tous les domaines d'activités où des mesures sont réalisées.

Le champ d'application de la validation analytique s'étend à toute procédure d'analyse utilisée dans le contrôle de la matière première, le développement galénique, le contrôle en cours de fabrication, le contrôle des produits intermédiaires et finis et aussi les essais de stabilité de tous les produits chimiques. Dans le domaine pharmaceutique, son exigence est avant tout une pratique réglementaire.

La validation d'une méthode analytique n'est pas seulement une exigence des autorités réglementaires ou un moyen d'accéder à l'accréditation, mais aussi la phase ultime avant l'utilisation de la méthode en question dans la routine.

La validation des méthodes analytiques a pour objectif principal de s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu le but de l'analyse. Il faut donc définir à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but pour lequel elle sera employée. La validation est fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables.

Une méthode d'analyse est une description détaillée des différentes opérations nécessaires pour effectuer l'analyse de la substance à examiner.

Cependant il faut faire la distinction entre l'analyte qui représente le composant mesuré à l'aide de la méthode d'analyse et la matrice qui représente l'ensemble des constituants du matériau d'essai autres que l'analyte.

I. Cycle de vie d'une méthode d'analyse :

Une méthode analytique est un moyen indispensable ayant pour but de concrétiser un besoin bien exprimé, ou encore c'est la réponse matérialisée à un problème donné.

On est trop souvent porté à présenter les méthodes d'analyse comme des procédures figées et qui n'est pas sujette au changement, C'est un peu l'impression que donnent les manuels et autres recueils de normes techniques.

Or, les méthodes d'analyse naissent, évoluent et meurent, comme tout procédé de production.[16]

Pour bien éclaircir et apprécier le rôle et la place de la validation dans la vie d'une méthode d'analyse, il est intéressant de présenter son cycle de vie depuis le moment où elle est choisie jusqu'au moment où on la délaisse.

Les méthodes d'analyse sont appliquées dans différents domaines : contrôle des médicaments, la bioanalyse dans le cadre des études cliniques et des études de bioéquivalence, études environnementales, études agro-alimentaires

- Le laboratoire doit assurer des résultats fiables lors de l'exécution de l'analyse pour un client ou pour des fins réglementaires afin que le problème analytique sera traité, ainsi que le problème socio-économique, dans n'importe quel domaine et quelle que soit la méthode utilisée, comme le montre la figure 1.
.[17]

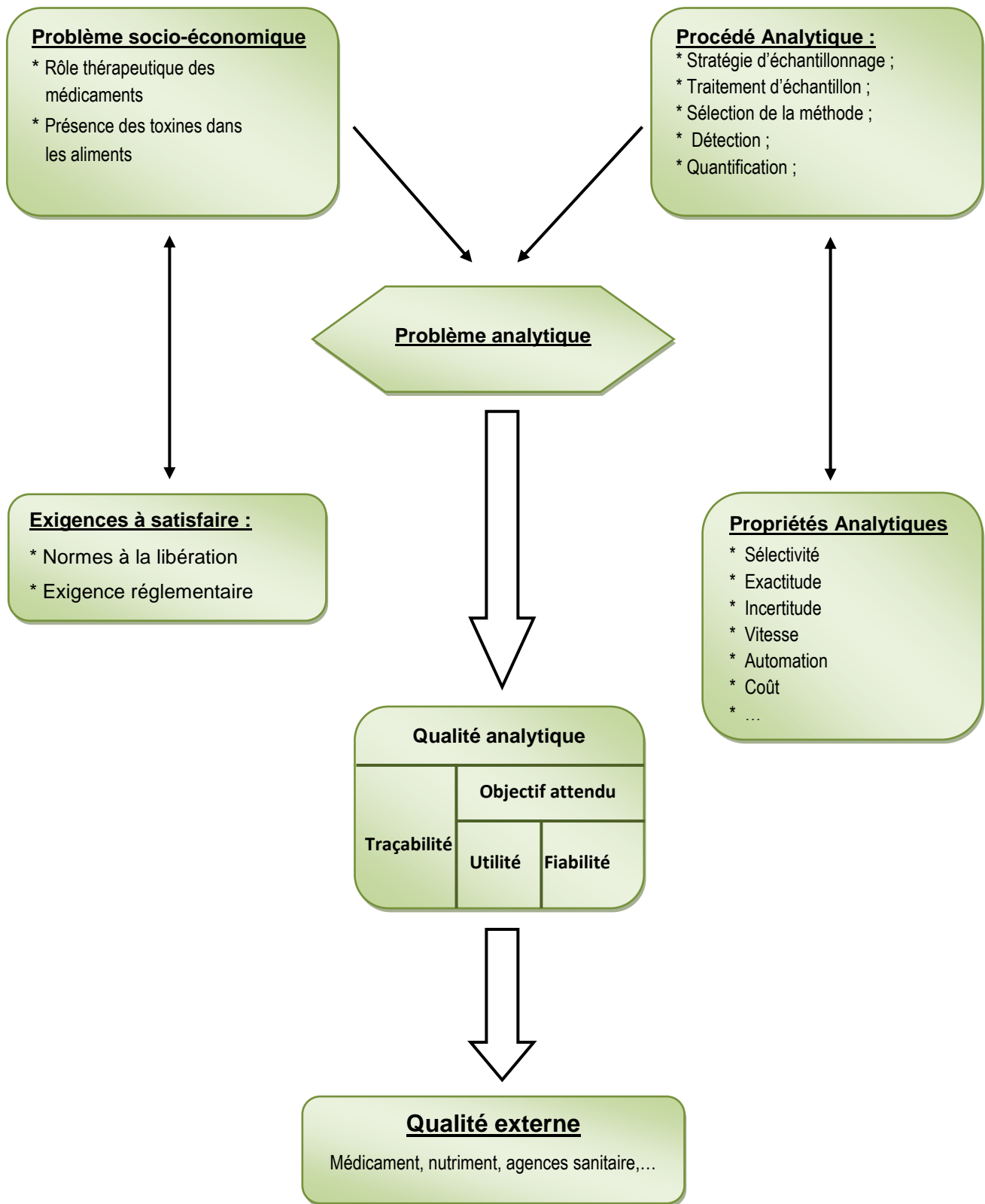


Figure 1: Problème analytique (adapté par Valcarcel et al 1997)

La mise en œuvre d'une méthode peut se décomposer en quatre grandes phases généralement successives :

1. La sélection :

D'abord on va sélectionner la méthode, c'est-à-dire l'analyste choisit parmi toutes les diverses méthodes physico-chimiques connues ou maîtrisées par le laboratoire la plus pertinente et qui permet de déterminer et doser un ou plusieurs analytes représentatifs du problème analytique à traiter.[16]

Cette étape est critique pour l'analyste. En effet, étant le point de départ d'une méthode, les étapes suivantes et plus particulièrement les décisions qui seront prises dépendent d'elle. De ce fait, on doit bien circonscrire la problématique en vue de définir clairement les objectifs afin de proposer des solutions appropriées, matérialisées en termes de conditions opératoires.[17]

Un problème mal cerné donne des décisions inadéquates, et par conséquent, une perte de temps, de réactifs et d'argent. Donc une bonne expertise de l'analyste et les informations pertinentes doivent exister.

Si l'analyse est quantitative, des critères intéressants tels que la spécificité/sélectivité de la méthode concernant les interférences possibles, la limite de détection, l'intervalle de dosage, le seuil de quantification, la fidélité, la justesse, l'exactitude, les méthodes d'échantillonnage (gaz, liquide, solide), la préparation des échantillons (extraction en phase solide, la digestion, etc.), la vitesse, l'automatisation, la facilité d'utilisation, l'efficacité, le coût, la résolution temporelle et spatiale, la réglementation (FDA, EPA, BPL, ISO) peuvent être utiles pour diriger le choix de la méthode.

Et afin de sélectionner la méthode adéquate, des questions triviales doivent être posées, par exemple :

- Qu'est ce que l'analyte(s) ?
- Quelle est la nature de l'échantillon tel que les propriétés physiques et chimiques ?
- Quelles sont les informations nécessaires (qualitative, quantitative) ?
- Quel est le niveau (s) de concentration de l'analyte (s) à chercher?
- Quel est le niveau d'exactitude nécessaire?
- Quelles sont les limites d'acceptation de la méthode ?

- Qui d'autres constituants de l'échantillon sont généralement présentes ?
- Le nombre d'échantillons devront être analysé?

En effet, il est de première importance de connaître le maximum d'informations sur l'échantillon qui sera analysé.[18]

La sélection de la méthode étant faite, il est indispensable d'effectuer des expériences complémentaires en vue de s'assurer du bien fondé de la méthode et de la capacité de sa mise en œuvre par le laboratoire par rapport à l'usage requis.

La norme ISO 17025 précise que :

« Le laboratoire doit utiliser des méthodes d'essai et / ou d'étalonnage, y compris des méthodes d'échantillonnages, qui répondent aux besoins du client et qui conviennent aux essais et/ ou étalonnages qu'il effectue, de préférence les méthodes publiées comme normes internationales, régionales ou nationales ». Et que « si la méthode proposée par le client est jugée inappropriée ou périmée, le laboratoire doit le lui indiquer ».

Lorsque le recours à des méthodes non normalisées est nécessaire, « elles doivent avoir été dument validées avant l'emploi » et surtout pleinement renseignées. D'après ce texte, utiliser des méthodes officielles est préférable, lorsque cela est possible, mais, l'usage des méthodes développées par le laboratoire est approuvé.

Et il faudra choisir la méthode d'analyse qui réalise le bon arrangement technique et économique, celle qui a le rapport coût / bénéfice le plus favorable, mais malheureusement ces données ne sont pas facilement disponibles.

Souvent elles deviennent possibles à obtenir lorsque la méthode est connue et sa validation ne pose pas un vrai problème. [19]

- **Exemple :** des centaines de méthodes sont publiées sur la détermination des vitamines dans les aliments, alors que seulement quelques unes qui sont reconnues comme pouvant être utilisables en routine.

La figure 3 résume les différentes étapes du cycle de vie d'une méthode analytique.

2. Développement :

Ensuite, il convient de développer la méthode, c'est la mise au point du mode opératoire approprié et l'adaptation de la méthode aux conditions pratiques où elle va être appliquée.

Cette étape doit être confiée à du personnel qualifié, fournis par les ressources nécessaires adéquates, pour que la démarche ainsi que les résultats obtenus soient et doivent être correctement renseignés.

En général, le développement d'une méthode est synonyme d'optimisation.

Lorsque la mise au point est achevée, on dispose de ce que l'on appelle dans le cadre BPL un mode opératoire normalisé ou Standard Operating Procédure (SOP). Notamment, il faut indiquer le domaine d'application de la méthode avec précision, c'est-à-dire l'ensemble des matrices auxquelles elle s'emploie ainsi que la gamme de concentrations utilisables.[16]

3. La validation :

C'est à ce moment, après le développement de la nouvelle procédure d'analyse, que doit intervenir l'étape de validation. On distingue deux types de validation : la validation intra-laboratoire et la validation inter-laboratoires.

La validation intra-laboratoire est une validation interne, universelle et obligatoire, concerne l'ensemble des méthodes analytiques développées par un laboratoire.

La validation inter-laboratoire – souvent plus lourde – n'intéresse en principe que les méthodes analytiques destinées à être utilisées par plusieurs laboratoires ou dont les résultats peuvent servir à des échanges commerciaux ou des contrôles officiels. C'est pourquoi on peut la considérer comme optionnelle.

On prend l'exemple de l'industrie pharmaceutique, il ne sert à rien de procéder à une validation inter-laboratoire d'une méthode qui n'est destinée en interne qu'à l'étude d'une molécule, non encore mise sur le marché, contrairement aux industries agroalimentaires, qui exigent toujours une validation inter-laboratoire .

Ce type de validation permet en outre de calculer les limites de reproductibilité de la méthode.[20]

Une étude collaborative (ou inter-laboratoire) peut être définie comme un ensemble d'essais réalisés momentanément dans des laboratoires différents représentatifs de la population de laboratoires susceptibles d'utiliser la méthode en routine.

Elle fait agir surtout trois entités « laboratoire », « méthode » et « substance », comme le montre la figure 2.

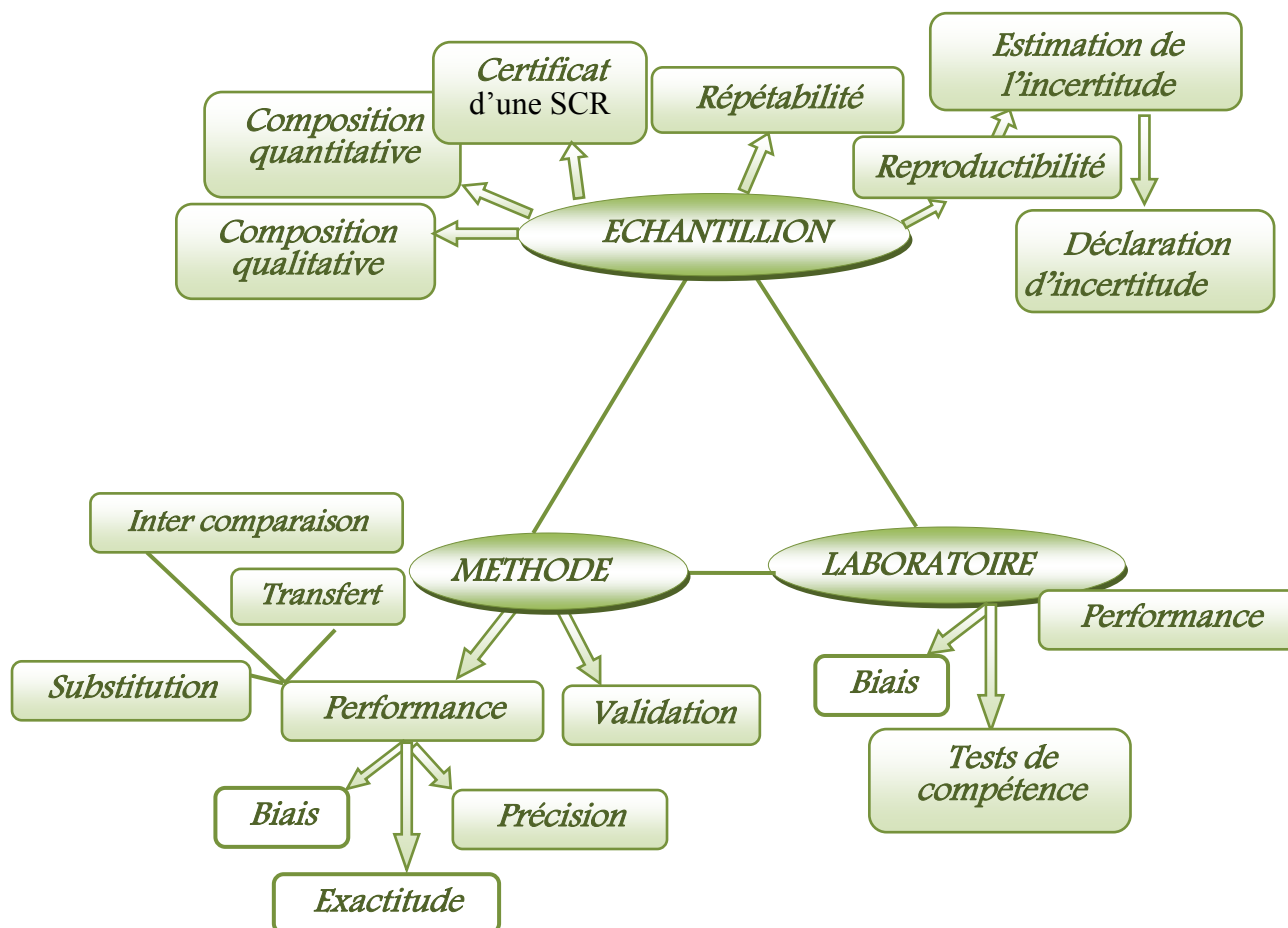


Figure 2 : Principaux objectifs (rectangles verts) poursuivis lors d'une étude inter laboratoires pour les trois entités impliquées (cercle) en se servant des critères définis (rectangle blanc).

Au niveau de l'entité « méthode », l'étude inter-laboratoire permettra d'évaluer les performances en termes d'exactitude, de biais et de précision (répétabilité et reproductibilité) dans un but d'inter comparaison ou de substitution de méthodes. D'autres objectifs consistent à démontrer la capacité de transfert d'une méthode selon des critères bien définis, de valider une nouvelle méthode ou une méthode améliorée

en la comparant avec une autre dont la validité est avérée ou une méthode de référence.

Concernant l'entité « laboratoire », une étude permettra d'évaluer ses performances (biais de laboratoire). Dans ce cas, il sera impliqué dans des tests d'aptitude, dont les résultats seront vérifiés lors d'accréditation(ISO17025).

Enfin, une étude inter-laboratoires pourrait servir à l'identification des composés, à la détermination de la composition quantitative d'un échantillon ou à la certification d'une substance chimique de référence SCR.

De plus, la reproductibilité des résultats peut être déterminée ce qui permettra de calculer l'incertitude des résultats et de pouvoir évaluer l'incertitude associée au futur résultat.

L'étude inter-laboratoires constitue certainement une étape pertinente pour une méthode avant son application à une large échelle.

Par conséquent, il est important qu'elle soit bien préparée et menée convenablement selon un protocole bien défini, judicieusement élaboré pour permettre d'atteindre la plupart des objectifs fixés.

Il peut arriver que cette étude n'aboutit pas à des résultats attendus ou exploitables pour l'établissement de la reproductibilité. Dans ce cas, elle est limitée à la transcription des résultats obtenus et à un report des problèmes survenus et éventuellement des solutions proposées ; et une réévaluation de la méthode sera prévue dans les phases précédentes dans cette situation.[21]

L'objectif d'une méthode analytique n'est pas sa validation, mais bien son usage en routine pour l'analyse d'échantillons de valeur vraie inconnue.

4. Utilisation en routine :

Si la validation se révèle conforme, la vie de la méthode va se poursuivre par son utilisation en routine. Valider une méthode ne représente que la première étape de sa mise sous assurance qualité, alors que le passage en routine de la méthode s'inscrit dans le cadre d'un système de contrôle de la qualité qui a pour objectifs de valider les résultats obtenus sur des échantillons inconnus, et de contrôler les performances de la méthode analytique au fil du temps.

5. Revalidation :

Au bout d'un certain temps, on peut être amené à abandonner la méthode et à engager à un autre cycle car elle est devenue obsolète.

Dans d'autres cas, certaines améliorations peuvent être apportées à la méthode. Ces modifications, et selon leur importance, mènent à appliquer une procédure plus ou moins complète de revalidation. Par un simple test effectué, l'impact de ces modifications sera déterminé. En effet, on doit effectuer une revalidation toutes les fois où l'on introduit une modification « mineure » de la méthode comme par exemple une modification de réglage comme laisser « 20min au bain-marie au lieu de 15 min ».

Par contre, si l'on fait une modification « majeure », affectant le principe de la méthode, une procédure de validation complète devra de nouveau être appliquée.

Toutefois, c'est selon le contexte que l'analyste définit l'échelle exacte de l'importance des modifications, et cette appréciation est laissée à son savoir-faire, quand cela est délicat. [16]

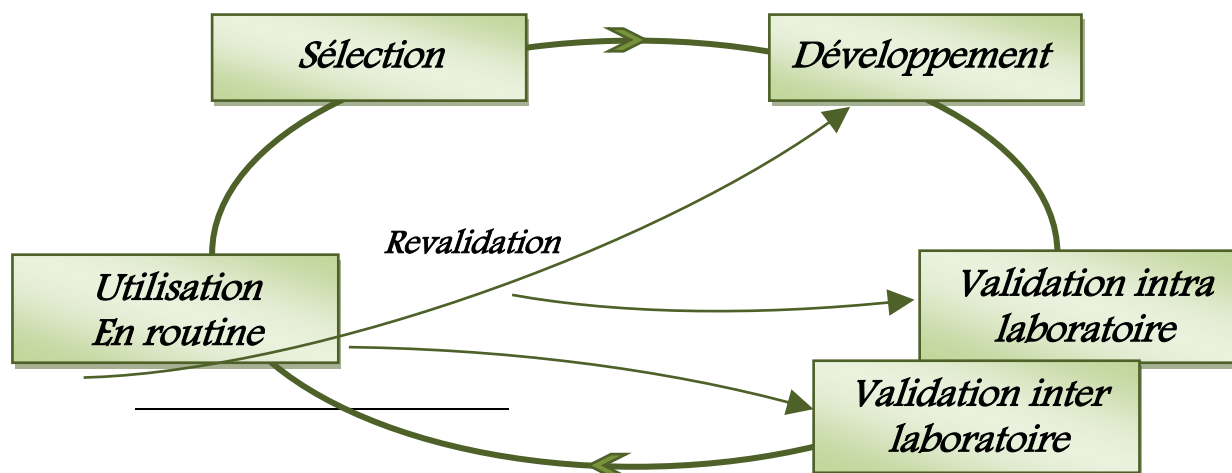


Figure 3 : cycle de vie d'une méthode d'analyse.

II. Développement et optimisation :

La méthode est retenue, sa mise au point ou encore l'étape de développement commence afin d'optimiser les différents paramètres du protocole opératoire pour les

adapter à la matrice des échantillons qui seront dosés ainsi qu'aux conditions opératoires d'utilisation de la méthode.

En particulier il faut mentionner le domaine d'application de la méthode avec précision, c'est à dire l'ensemble des matrices auxquelles elle s'applique, aussi bien que la gamme de concentration utilisable.

En général, le développement d'une méthode a le même sens que l'optimisation et l'application de la méthode des plans d'expériences.

Il est connu qu'un protocole qui tire son origine de la littérature n'offre que peu d'indications sur l'influence de légers changements des conditions expérimentales. Un exemple typique de ce manque d'indication précise, qui est la température, une température ambiante veut dire une température qui peut varier entre 15 et 35 °C selon le lieu ou la saison ; dans ce cas, l'expérimentateur se trouve devant l'obligation de définir l'optimum pratique propre au but fixé.

Même les méthodes normalisées ne sont pas toujours plus claires et précises. Un temps considérable à passer pour effectuer ces adaptations, pour rédiger les parties du mode opératoire normalisé ,par exemple, il faut modifier les volumes de réactifs, les temps de réaction, les températures préconisées par une publication ou une norme ou le réglage de l'appareil de mesure , afin de rendre ces conditions expérimentales conformes au type d'échantillon à traiter ou aux dispositions pratiques du laboratoire , et d'atteindre aussi une sensibilité adaptée au problème ou au type de matrice à traiter. Ces études diverses prennent une place toute particulière lorsqu'il s'agit de valider une méthode, et généralement elles représentent l'étape d'optimisation. [19]

1. Principes de planification des expériences :

Les plans d'expériences font partie de la chimiométrie. [22]

Un plan d'expérience est défini comme un ensemble d'essais effectués dans le contexte d'une étude dont le but est de confirmer ou d'infirmer une hypothèse. Par conséquent, toute série d'essais, qu'elle soit réalisée sans préparation véritable et selon un choix aléatoire des conditions ou, d'une manière opposée, de façon réfléchie en suivant de façon très rigoureuse une séquence prévue à l'avance représente un plan d'expérience. Les plans d'expériences ont pour objectif de fournir à l'analyste, en échange d'un nombre d'expériences restreint, un maximum d'informations

pertinentes et appropriées qui peuvent expliquer certains effets et prédire les réponses étudiées.

Puisque dans la méthodologie des plans d'expériences, tous les facteurs sont étudiés simultanément, la stratégie consiste à réaliser les expériences de manière programmée et raisonnée en faisant varier les niveaux de tous les facteurs à la fois.

Le meilleur moyen pour y parvenir, tout en expliquant les phénomènes observés et en exploitant les résultats obtenus, est l'utilisation des outils mathématiques associés aux outils statistiques ce qui, paradoxalement, rend leur mise en œuvre compliquée.

Cependant, grâce aux moyens informatiques, au développement et à la disponibilité de nombreux logiciels développés à cet effet, leur usage est maintenant rendu plus accessible et surtout plus rapide.

Il y a plusieurs types de plans pour réaliser les expériences et qui sont définis et décrits dans la littérature. Ils sont généralement répartis en plans factoriels complets et fractionnaires.

Pour le choix d'un plan adéquat, il y a un certain nombre de pré requis tels que le but poursuivi par l'analyste, le type et le nombre de facteurs à étudier, les informations à obtenir, et même les exigences de l'expérimentateur et pour la réalisation de ce plan d'expérience, il faut une préparation soignée, comme il s'effectue en prenant en bonne considération les étapes suivantes :

- * Description de l'étude.
- * Définition des objectifs de l'étude.
- * Choix des réponses.
- * Etablissement de la liste des facteurs influents.
- * Choix du domaine de variation des facteurs.
- * Etablir la liste de l'ensemble des contraintes si possible.
- * Choix et construction du plan d'expériences.
- * Expérience aux bornes du domaine d'étude.
- * Eviter les confusions d'effet en recherchant l'orthogonalité entre des facteurs.
- * Utiliser les logiciels de construction de plans d'expériences quand cela est possible.

- * Validation statistique du modèle postulé.
- * Interprétation des résultats.
- * Conclusion de l'étude.

En conclusion, L'application des plans d'expérience pour optimiser des méthodes permet non seulement de trouver les niveaux de facteurs qui répondront bien au problème analytique rencontré, mais Il fournira aussi un moyen pour obtenir l'optimisation robuste de la méthode analytique. Cela s'accorde avec la demande de l'ICH Q2R1: "L'évaluation de la robustesse se fait durant la phase de mise au point; elle dépend du type de méthode considérée. Cette évaluation doit démontrer que la méthode demeure fiable lorsqu'on introduit des variations planifiées de paramètres ".
[21]

2. Robustesse :

La robustesse d'une procédure analytique est la mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des changements faibles mais délibérés des paramètres de la procédure.

Son intérêt est de fournir une indication sur la stabilité des mesures lors de son usage normale.

Le principe du test de robustesse est donc de vérifier si de légères modifications des valeurs sélectionnées pour le mode opératoire normalisé, ont une influence sur le résultat.

En fonction des difficultés classiques de contrôle des paramètres opératoires on définit ces modifications ; et selon le type de méthode, on détermine les paramètres à étudier.

Habituellement, on trouve des paramètres quantitatifs tel que : la température, le pH, un volume ou un débit ; comme on peut aussi considérer des paramètres qualitatifs, comme une marque de réactif ou d'appareil de mesure, au cas où la méthode doit être employée par des laboratoires ayant des équipements différents.

Un point important à considérer est l'interprétation finale qu'on donne à la fin d'un test de robustesse.

Si un seul facteur a un effet significatif, la méthode ne peut pas être validée et il est inutile de mesurer les autres caractéristiques de validation. En effet, si un facteur n'est pas robuste c'est à dire que la méthode n'est pas robuste et non applicable en routine

puisque les niveaux sont choisis de façon à refléter les légères variations que va « normalement » subir la méthode. Il faut alors recommencer l'étape d'optimisation pour parvenir à maîtriser bien le facteur gênant.

A cause du risque lié à l'obtention d'une méthode non robuste (perte de temps, d'argent et parfois frustration des opérateurs), le test de robustesse se situe à l'interface entre le développement et la validation et doit précéder toute validation.[17]

III. La validation :

1. Définition :

- Valider : c'est rendre ou déclarer valide juridiquement.
- Valide : se dit de ce qui répond à des lois et des règles, les une et les autres étant posées préalablement. [23]
- La validation est l'ensemble des opérations effectuées en vue de prouver qu'une procédure est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis pour l'usage prévu .

A cet effet, plusieurs procédures ont été élaborées.

Food and Drug Administration définit la validation comme suit :

- Valider : c'est établir à l'évidence, avec un degré de confiance élevée et sous une forme documentée, qu'un procédé permet d'obtenir un produit (ou un service) qui atteint effectivement spécifications définies à l'avance.

Selon la norme ISO/IEC 17025 [1] :

« Le laboratoire doit valider des méthodes [...] pour confirmer [qu'elles] conviennent à l'emploi prévu. La validation doit être aussi étendue que l'impose la réponse aux besoins dans l'application ou le domaine d'application donné ».

La norme ISO 17025 : 2005 donne une définition de la validation : «La validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies ».

Donc valider, c'est apporter des preuves que la méthode est adaptée à ses objectifs.

En fait, on ne s'intéresse pas à la validation telle quelle est, mais à la procédure qui permettra de conduire cette démonstration.

Comme il est cité dans le texte [1] « le laboratoire doit enregistrer les résultats obtenus et la procédure utilisée pour la validation ».

Et c'est là que les désaccords se manifestent car on a souvent une confusion entre la validation et la procédure de validation.

Une définition de la Pharmacopée américaine [2] l'a fait apparaître :

« La validation d'une méthode d'analyse est une procédure permettant d'établir, par des études expérimentales, que les critères de performance de la méthode satisfont aux exigences prévues par les applications analytiques de la méthode. Les critères de performance sont exprimés en termes de caractéristiques analytiques. Les caractéristiques classiques qui devraient être prises en compte pour la validation des types d'essais décrits dans ce document sont [...] la précision, l'exactitude, la limite de détection, la limite de quantification, la sélectivité, l'intervalle de linéarité, la robustesse ».

La norme Afnor V 03-100 définit le processus de validation d'une méthode d'analyse comme « l'action de confirmer par examen et apport de preuves tangibles obtenues par des études statistiques intra laboratoires et/ou inter laboratoires que les exigences particulières pour un usage spécifique prévu de la méthode d'analyse sont satisfaites. En général, les exigences particulières portent sur le domaine d'application, la linéarité, la spécificité, la fidélité et la justesse ».

Derrière cette définition, il y'a une note qui précise que « le processus de validation d'une méthode d'analyse peut s'appuyer sur : une étude inter laboratoire... ; une étude intra laboratoire menée par comparaison à une méthode de référence... ; une étude intra laboratoire basée sur l'utilisation de matériaux de référence ». [16]

A partir de ces définitions, on peut dire que pour réaliser une validation d'une méthode d'analyse, on la décompose en une séquence d'opérations plus simples et on les valide séparément.

Cette stratégie de décomposition en éléments simples est d'ailleurs traditionnelle lors d'une mise en place d'un système d'assurance de la qualité.

Néanmoins, dans ce cas, elle pose plusieurs problèmes.

C'est une série de huit étapes qui se succèdent ainsi :

- a. ***L'échantillonnage*** : c'est la réception d'un échantillon de travail, réalisé par le client ou par les laboratoires d'analyse.
- b. ***Le prélèvement*** : il a plusieurs noms, comme sous-échantillon, prise d'essais ou aliquote. Souvent, la quantité de l'échantillon est trop importante pour être analysé en entier, il faut alors réaliser un prélèvement. De plus le laboratoire garde fréquemment une partie de l'échantillon initial pour pouvoir répéter l'analyse.
- c. ***La préparation du prélèvement*** : représente le cœur de la méthode, elle est souvent longue, délicate et requiert l'emploi de réactifs parfois dangereux pour l'environnement. Il existe deux grands types d'approches : la minéralisation pour déterminer des éléments minéraux totaux, l'extraction pour les molécules organiques.
- d. ***La mesure d'une réponse instrumentale*** : c'est fournir une mesure physique suite à la passation du minéralisât ou l'extrait dans l'appareil.
- e. ***L'étalonnage*** : c'est une étape et opération fondatrice de la chimie analytique quantitative.
- f. ***La conversion de la mesure en résultats*** : appelée aussi étalonnage inverse.
- g. ***Le traitement statistique d'un ensemble de résultats*** : intervient lors d'une prise de décision un peu compliquée.
- h. ***La prise de décision*** : l'analyste va fournir un résultat et aussi interpréter en termes de conformité ou non-conformité du lot d'où proviennent l'échantillon de travail qu'il a reçu et la décision peut être sous sa responsabilité.

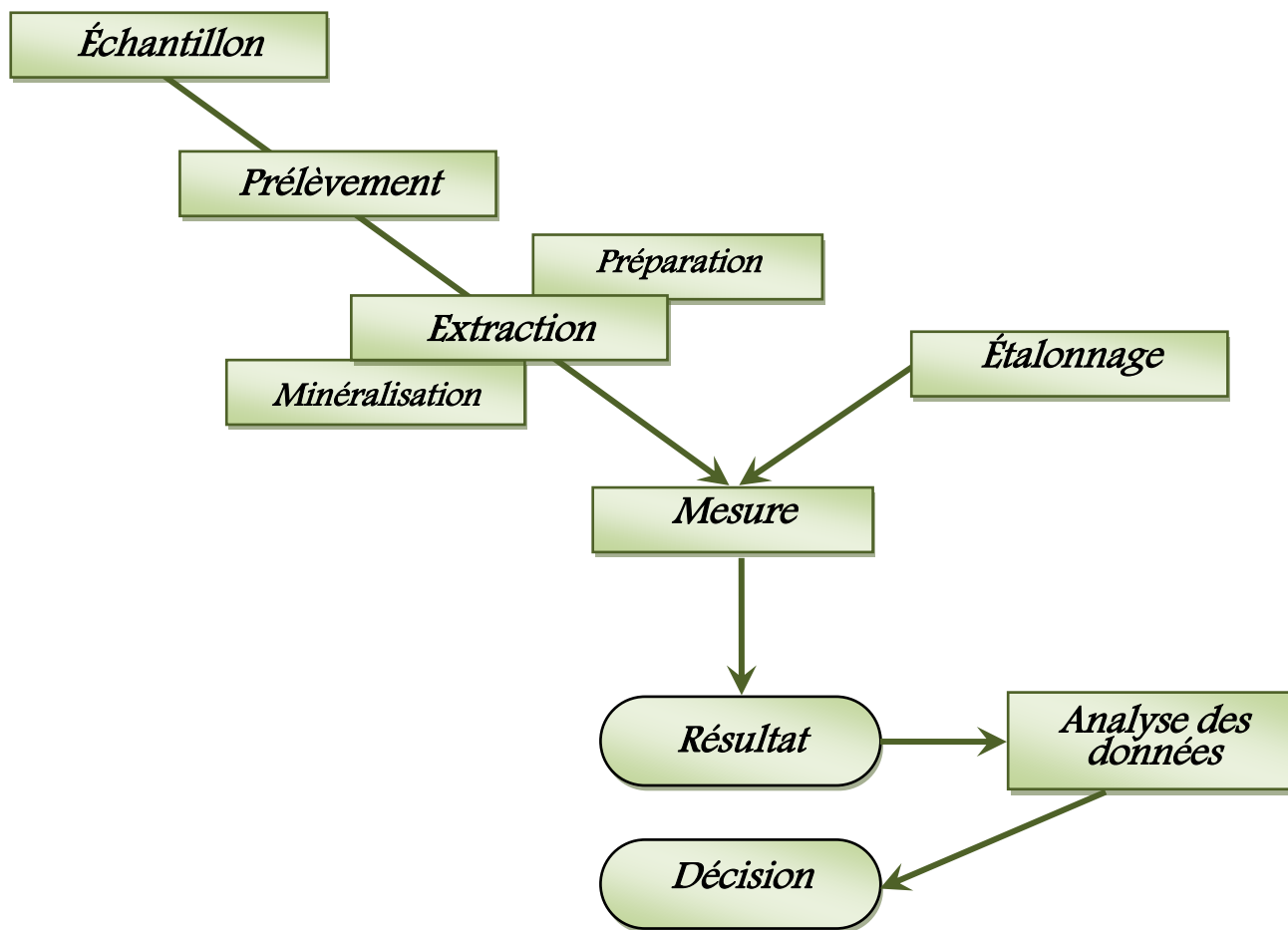


Figure 4: processus de fabrication d'un résultat.

Transposée en termes statistiques, La validation de la méthode se résumerait à évaluer la part relative de chaque étape dans la variance totale observée.

Dés que ces parts relatives seront connues, on pourrait aboutir sur la Maitrise statistique des procédés (MSP), basée, par exemple sur des cartes de contrôle qui permettent la surveillance des étapes les plus critiques. Mais en réalité il est impossible de séparer chaque étape, à cause de ses interdépendances.

Par exemple, l'étalonnage est influencé beaucoup par le mode de préparation de l'échantillon, en éliminant plus ou moins complètement certaines interférences qui biaisent les mesures. [20]

Le domaine de la validation des méthodes analytiques est défini par plusieurs textes réglementaires ou des guidelines tels que l'ICH, la FDA, BPF, IUPAC, AOAC. Ces

derniers définissent les critères de validation à tester, mais ne proposent pas des approches expérimentales et se limitent surtout à des notions générales.

Pour ces raisons, plusieurs méthodologies pratiques ont été proposées afin d'aider les analystes à valider leurs procédures d'analyse. Ces guides ont grandement contribué à faire progresser la validation des procédures de dosage.

2. Critères de validation :

Les principaux critères de validation sont ceux qui sont largement reconnus et couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse comme :

- a. Spécificité ou sélectivité.
- b. Linéarité (des résultats).
- c. Justesse.
- d. Fidélité (Répétabilité et Fidélité intermédiaire).
- e. Exactitude.
- f. Limite de détection (LD).
- g. Limite de quantification (LQ).
- h. Intervalle de dosage.
- i. Sensibilité.

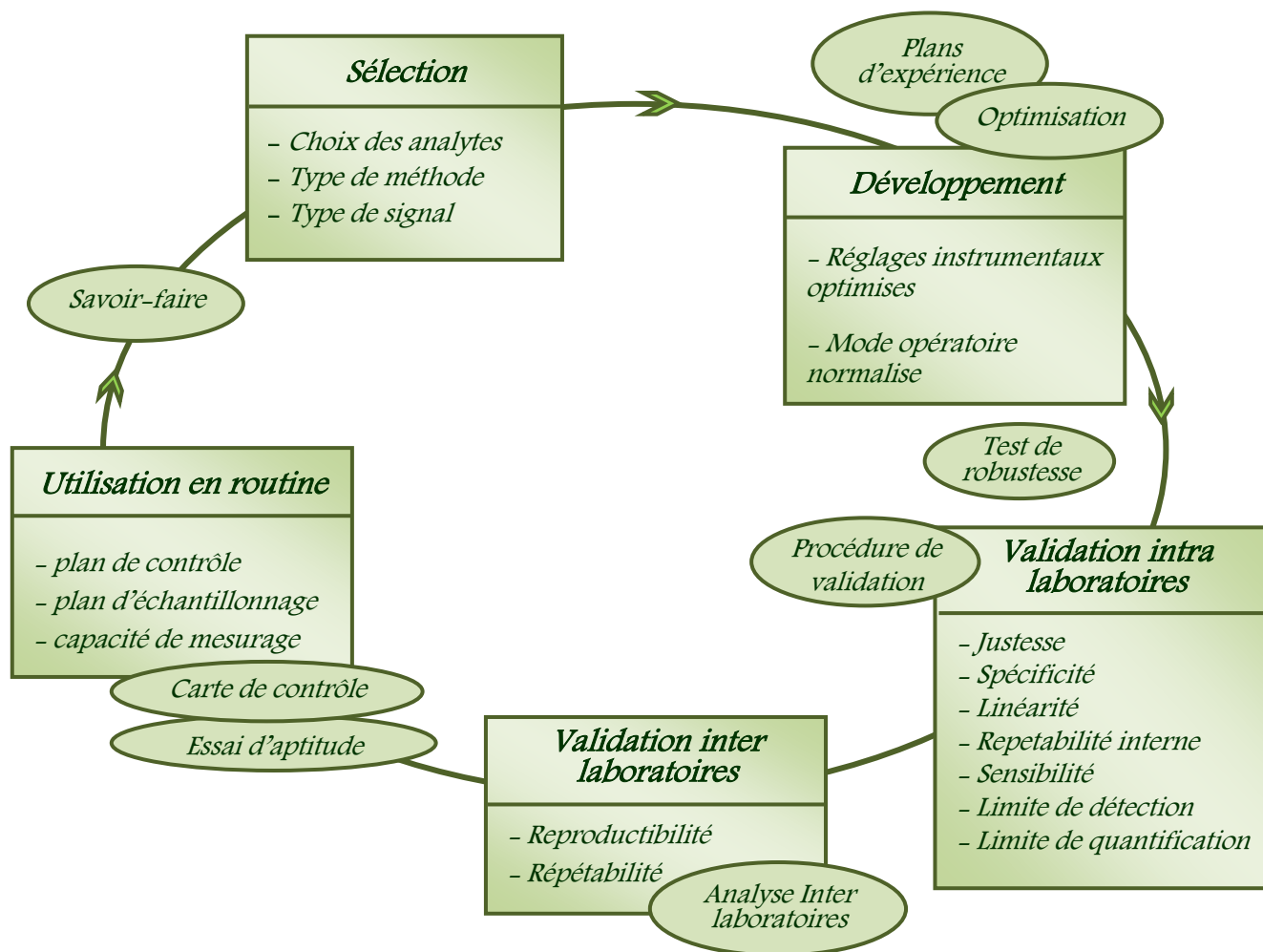


Figure 5 : Critères et procédures de validation liés au cycle de vie d'une méthode d'analyse.

Légende :

- les étapes en gras.
- les critères sous chaque étape.
- les procédures en cercle.

La spécificité ou sélectivité d'une procédure analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents.

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.

- La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (exemple : concentration) en analyte dans l'échantillon.
- La justesse d'une méthode 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 fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Elle est exprimée en termes de coefficient de variation à partir d'une série de mesures.

La fidélité peut être évaluée à trois niveaux :

- la répétabilité exprime la fidélité sous des conditions opératoires identiques et sur un court intervalle de temps.
 - la fidélité intermédiaire exprime les variations intra-laboratoires : jours différents, analystes différents, équipements différents... .
 - la reproductibilité exprime la fidélité inter-laboratoire.
- L'exactitude d'une méthode combine justesse et fidélité d'un mesurage.
 - La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.
 - La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie.
 - L'intervalle de dosage d'une procédure d'analyse est la région entre les niveaux supérieur et inférieur (ces valeurs incluses) pour laquelle il a été démontré que la procédure est appropriée quant à son exactitude

(Justesse + fidélité) et sa linéarité, en utilisant la méthode décrite. (Stp pharma 2003)

- 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. Une procédure est dite « sensible » si une faible variation de la concentration ou de la quantité d'analyte entraîne une variation significative de la réponse. [24]

Un mesurage est un processus consistant à obtenir expérimentalement une ou plusieurs valeurs que l'on peut raisonnablement attribuer à une grandeur

Le terme de répétitions est ici entendu comme des mesurages effectués sur un même prélèvement, c'est-à-dire que les pesées seront prélevées sur un seul échantillon de matière.

En outre, il y'a d'autres critères spécifiques pouvant être indispensables, selon les domaines concernés, comme par exemple : la stabilité de l'analyse, le recouvrement d'extraction, l'effet de dilution, etc.

Il convient d'attirer l'attention que les critères de validation décrites ci-dessus doivent être évalués, autant que possible, dans la même matrice que celle des échantillons à analyser.

Pour chaque type de matrice, toute nouvelle procédure d'analyse devra par ailleurs être validée (par exemple pour chaque type de fluide biologique envisagé et pour chaque espèce animale).

L'étalonnage d'une méthode :

La plupart des méthodes d'analyse quantitatives ne mesure pas directement une quantité absolue de l'analyte recherché, mais procède indirectement par comparaison avec une quantité connue de l'analyte.

La validation de ces méthodes comporte donc obligatoirement une étape d'étalonnage.

L'étalonnage est l'opération qui, dans des conditions spécifiées, établit en une première étape une relation entre les valeurs et les incertitudes de mesures associées qui sont données par des étalons, et les réponses correspondantes avec leurs incertitudes associées. Dans une deuxième étape, ces données sont utilisées pour élaborer une relation permettant d'obtenir un résultat de mesure à partir d'une réponse.

Une fois la méthode est retenue, une première tâche consiste à mettre en place une courbe d'étalonnage qui servira à prédire les concentrations d'échantillons par analogie avec les concentrations d'étalons, après avoir choisi un modèle mathématique qui relie la réponse instrumentale à la concentration.

Généralement la courbe étalon est construite à partir de solutions étalons pures, et il est indispensable de vérifier si la présence de la matrice n'entraîne pas des interférences.

3. Objectifs de la validation :

Sachant que les caractéristiques de « vrai biais » et de « vraie fidélité » sont des paramètres qui resteront toujours inconnus, mais qui pourront être évalués par les mesures qui seront effectuées en phase de validation, quel est donc le but de la validation ?

La validation analytique a pour principal but de démontrer l'aptitude et la fiabilité d'une méthode vis-à-vis des exigences réglementaires et normatives en vigueur.

Il paraît raisonnable de prétendre que l'objectif de la validation est de certifier et d'assurer aux laboratoires ainsi qu'aux autorités compétentes les garanties que chaque mesure qui sera réalisée ultérieurement en routine, une fois la procédure validée, sera suffisamment proche de la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable, en fonction de la finalité de la procédure.

Le but est de réduire le risque au niveau du producteur ainsi que du futur consommateur. Par conséquent et contrairement à ce que la pratique courante pouvait laisser penser, l'objectif de la validation n'est pas simplement, d'obtenir des estimateurs du biais et de la fidélité.

Cependant, il n'en demeure pas moins que ces paramètres, comme nous l'avons déjà signalé, sont des éléments essentiels et obligatoires à l'établissement des garanties citées précédemment.

À la lecture de cet objectif, deux concepts fondamentaux s'émergent, à savoir :

- « Suffisamment proche », Signifiant que la mesure réalisée en routine sera à moins de x% (x se rapporte à la limite d'acceptation) de sa « vraie valeur » inconnue.

- « garanties », signifiant que quelle que soit la mesure, il est très probable qu'elle sera suffisamment proche de la valeur vraie, qui est inconnue.

Dans ces conditions, l'exactitude, la fidélité, la linéarité, etc., ne sont plus que des « Statistiques » ou « éléments de calcul » permettant d'évaluer ces garanties.

En effet, on attend d'une procédure de dosage qu'elle soit capable de quantifier, et non pas tellement qu'elle soit fidèle, même si cette fidélité, admettons le, constitue un gage de réussite. C'est dans ce contexte que l'analyse statistique des résultats de validation trouve sa vraie dimension.

Toutefois, dans cette perspective, il faut encore faire la différence entre les statistiques qui permettent de prendre une décision (quant à l'aptitude d'une procédure à correspondre à l'usage pour lequel elle est prévue) et celles qui aident à poser un diagnostic, c'est à-dire nous renseigner sur un point particulier de ses performances, comme par exemple la linéarité ou le passage de l'ordonnée par 0.

En fait, ce dont on a réellement besoin, c'est d'un bon outil de décision, c'est-à-dire un moyen offrant la garantie que la majorité des futures mesures seront dans les limites d'acceptation. Si les garanties offertes par la règle de décision ne sont pas convenables, alors les outils de diagnostic aideront l'analyste à reconnaître les causes éventuelles du problème ; mais seulement si les garanties ne sont pas satisfaisantes [25].

Pratiquement, la validation est obtenue par la préparation d'un dossier qui comportera deux types d'information :

- une description écrite des moyens (appareils et réactifs) et du mode opératoire à mettre en pratique pour exécuter la méthode d'analyse ;
- les résultats numériques d'un ensemble d'expériences et de calculs statistiques qui serviront à démontrer que ces moyens et ce mode opératoire sont efficaces.

4. Concept de « fitness-for-purpose »:

Il est reconnu que l'objectif principal d'une validation de méthode analytique est de démontrer que la méthode est adaptée à son usage et qu'elle donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles.

Cette affirmation se manifeste dans le concept de « fitness-for-purpose », dont l'IUPAC donne la définition suivante : « degré auquel les données produites par un

processus de mesure permettent à l'utilisateur de prendre des décisions techniques et administratives correctes dans un but spécifié ».

On peut donc exprimer ce concept par l'aptitude d'une méthode à l'usage auquel elle est destinée.

Si les résultats fournis par une méthode analytique sont conformes et correspondent aux exigences requises de son application, elle s'intégrera dans ce concept. [17]

5. Place de la validation analytique dans l'autorisation de mise sur le marché des médicaments :

Encadré 2 : place de la validation analytique dans l'autorisation de mise sur le marché des médicaments (1)

Les demandes d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) des médicaments sont régies par les directives européennes 75.318 et 75.319 et plusieurs règlements, juridiquement opposables. Ils sont complétés par des « Notes explicatives » et « Avis aux demandeurs » dont l'objectif est de guider les demandeurs pour la constitution de leur dossier ; ces documents ne présentent pas un caractère réglementaire obligatoire. Il est vivement conseillé de les suivre pour faciliter l'élaboration des dossiers et leur agrément par les Autorités. Lorsque les firmes ne sont pas en mesure de les appliquer il leur appartient de justifier leur position.

En vue de l'harmonisation internationale des dossiers d'AMM, l'*International Conference on Harmonization* (ICH) a repris les textes de la Communauté européenne (Agence européenne des médicaments), des États-Unis (*Food and Drug Administration*) et du Japon (*Ministry of Health and Welfare*) pour élaborer de nouveaux textes harmonisés, applicables dans ces trois régions. Ces nouveaux textes harmonisés ont été élaborés conjointement par les autorités réglementaires et les partenaires industriels. À la fin du processus de négociation ICH (étape 1), les textes sont mis en application par les autorités d'enregistrement nationales (étape 5) ; ces documents remplacent alors les réglementations antérieures.

Dans le cadre de l'analyse des médicaments, les directives européennes prescrivent la validation analytique des techniques de contrôle. Une première note explicative européenne a été publiée. Cette note a été remplacée par deux notes explicatives issues d'ICH. Ces deux notes ont été publiées en anglais par l'Agence européenne des médicaments et sont respectivement applicables depuis juin 1995 et juin 1997. Une traduction française a été effectuée par la Pharmacopée Européenne et publiée dans *Pharmeuropa*. Ces notes sont également disponibles sur Internet (cf. [Doc. P 224]).

(1) Cet encadré a été rédigé par F. Pellerin, Professeur honoraire à la Faculté de pharmacie de l'université Paris-XI.

Encadré 1 : place de la validation analytique dans l'autorisation de mise sur le marché des médicaments.

Afin d'obtenir une autorisation de mise sur le marché, les industriels valide leurs procédures d'analyse en appliquant les recommandations réglementaires, en se servant des guides de validation analytique.

Le guideline ICH est une exigence réglementaire, toute validation de méthode analytique présentée dans un dossier d'AMM doit répondre à ses exigences. [26]

Aujourd'hui, ce dossier est rédigé dans un format standardisé : CTD (Common Technical Document), ce format est utilisé en zone ICH. [27]

IV. L'utilisation en routine :

La vie de la méthode se poursuit par son utilisation en routine si la validation s'avère conforme.

Une surveillance continue et ininterrompue des performances dans le temps afin de maîtriser la qualité qui est une exigence.

On prend l'exemple de la norme ISO 17025 (2000) qui requiert que les méthodes d'analyse soient vérifiées lors de l'usage de routine pour donner la certitude et l'assurance sur la fiabilité des résultats analytiques qui sont fournis pendant les séries de tous les jours et donc les décisions subséquentes.

De même, la FDA précise qu'afin de s'assurer du bon fonctionnement continu de la méthode, l'exactitude de la méthode d'analyse doit être contrôlée d'une façon régulière, dès que la méthode soit validée. [28]

Pour effectuer ce contrôle, on se sert, bien sûr, des connaissances et du savoir acquis au cours des étapes du développement et de la validation de la méthode, ainsi que sur des outils spécifiques et efficaces qui sont les cartes de contrôle et les essais d'aptitude.

Pour contrôler la fiabilité d'un système, la méthode classique consiste à répéter l'analyse d'un échantillon de référence à intervalles réguliers et de le surveiller avec les techniques de maîtrise statistique des procédés (MSP).

Le système doit être adapté de manière adéquate, dans la mesure du possible, si un écart dans les résultats existe. En général, la variation dans les résultats de tout système d'analyse peut être interprétée comme la somme de deux composantes: une composante aléatoire et une composante systématique.

La composante aléatoire est due à la variabilité inéluctable de la méthode analytique, et la composante systématique ou non aléatoire qui peut être entraînée par l'usage des

instruments (vieillessement de leurs pièces), par des changements des conditions environnementales, etc., c'est la fonction du temps.

La plupart des systèmes d'analyse réelle contiennent des pièces mécaniques, électriques et /ou optiques, qui peuvent être affectés par un facteur important et déterminant : le temps.

Exemple : Le vieillissement de la lampe du détecteur photométrique, une diminution de la capacité de séparation de la colonne chromatographique, ...

Des changements dans les conditions environnementales, comme la température, l'humidité, ...peuvent provoquer des dérives dans les résultats dans d'autres systèmes d'analyse, c'est-à-dire que des tendances systématiques des résultats sont fonction du temps.

Séparer les variabilités communes (causes aléatoires) des causes spéciales (systématique) est le but de la maîtrise statistique des procédés(MSP).

1. les cartes de contrôle :

Une carte de contrôle est l'outil principal permettant de contrôler la stabilité d'une méthode d'analyse dans le temps. Elle consiste en un graphique représentant la mesure obtenue sur un matériau en fonction du temps.

En effet, elle constitue un élément essentiel d'une démarche préventive dans la gestion de la qualité et également un moyen d'appréciation pour un auditeur dans le cadre d'une démarche d'accréditation. Elle prouve que les mesurages effectués pendant une longue période ont permis d'obtenir des mesures "garanties" correctes.

Une carte de contrôle est faite surtout pour la détection d'anomalies avant que la méthode d'analyse fournisse des valeurs en dehors des limites. Elle a un rôle préventif, à ce titre, si des valeurs de mesures anormales apparaissent, une action correctrice est absolument nécessaire.

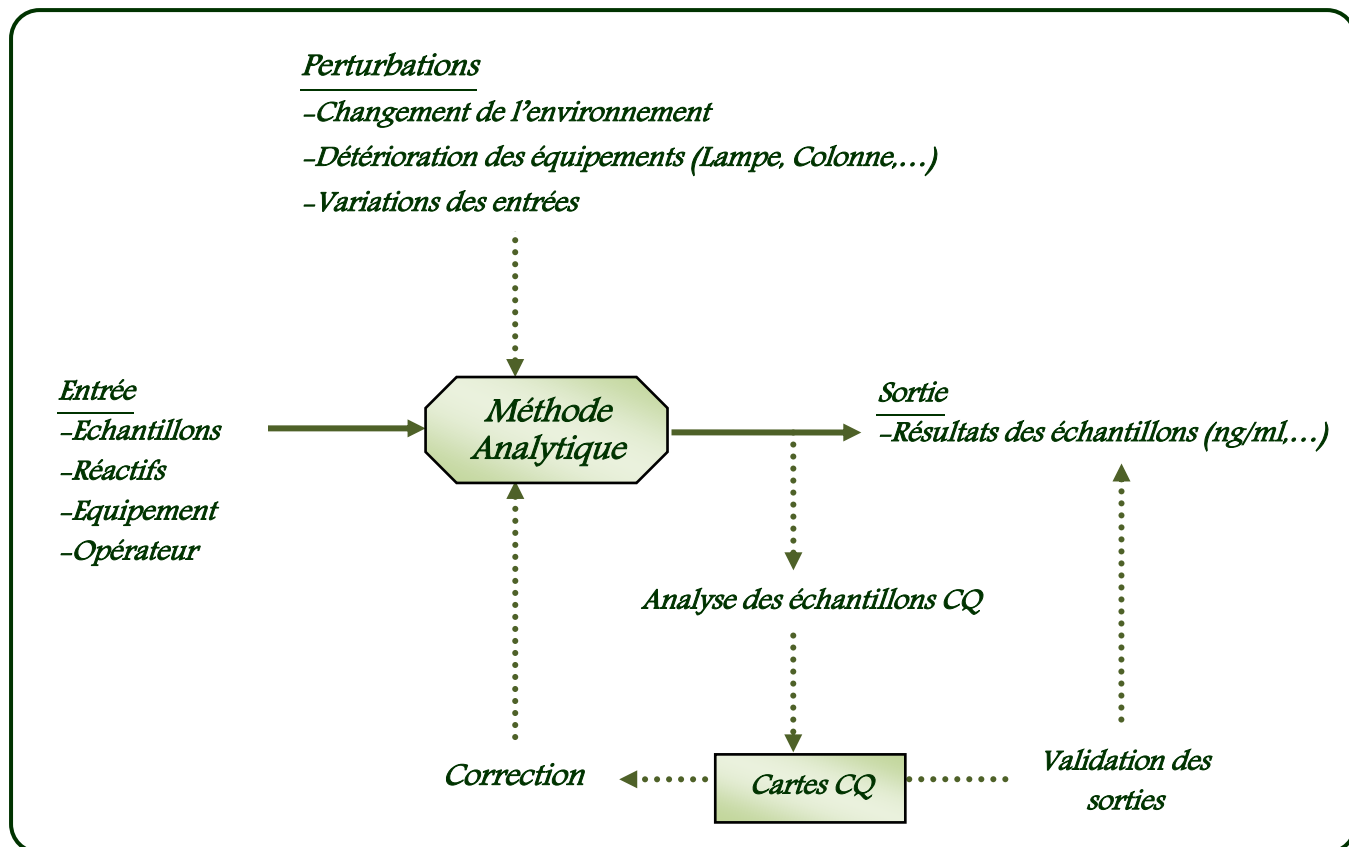


Figure 6 : Les procès d'évaluation pour contrôler les méthodes d'analyse durant l'utilisation en routine.

En outre, son but est de tester les deux hypothèses suivantes ; celle qui précise que ces écarts proviennent des causes communes contre l'hypothèse alternative qui suppose que ces variations sont d'origine spéciale.

Dans la première situation, le système est dit travailler sous contrôle statistique ou être dans un état contrôlé, et dans la seconde, le système est dit hors contrôle, c'est-à-dire qu'il doit être ajusté.

Toutefois, d'autres types de méthodes de contrôle statistique existent ; les plus courantes sont les cartes de Shewhart, les cartes des sommes cumulées (CUSUM), les cartes des moyennes pondérées exponentielles (EWMA).[21]

2. les essais d'aptitude :

Les essais d'aptitude selon la norme ISO13528 visent à vérifier si un laboratoire est compétent pour exécuter un type d'analyse. Ce type d'essais est le plus répandu.

Les essais d'aptitude, comme ceux décrits dans la norme X 06-049 ou le Guide ISO/IEC 43, rassemblent de nombreux laboratoires, parfois plusieurs milliers.

Les participants n'auront pas à faire de répétition sur le ou les échantillon(s) qu'ils reçoivent car le but est de calculer par consensus une valeur de référence acceptée qui servira au contrôle de compétence d'un laboratoire pour l'exécution d'un type de détermination. Ce bilan d'aptitude se fera après avoir classé les laboratoires d'après leurs résultats et en vérifiant quels sont ceux qui se trouvent en dehors de limites de tolérance, elles aussi consensuelles.

Généralement, des structures interprofessionnelles organisent ces tests d'aptitude et les laboratoires y participent de façon intentionnelle en fonction d'un programme analytique propre à une branche d'activité. [16]

Bibliographie

- [16] *Feinberg M, Validation interne des méthodes d'analyse*
- [17] *ISABELLE PINGUET Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie, THÈSE pour l'obtention du Diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Bordeaux 2015/2016.*
- [18] *Pharmaceutical Process Validation, Third Edition, Revised and Expanded, edited by Robert A. Nash et Alfred H. Wachter, 2003.*
- [19] *Feinberg M., La validation des méthodes d'analyse – Une approche de l'assurance qualité du laboratoire.*
- [20] *Feinberg M., Labo-stat, Guide de validation des méthodes d'analyse. s.l: Editions Lavoisier, 2009, 384 pages.*
- [21] *Mr. Abderrahim Bouabidi Etude Critique des Différentes Approches de Validation des Méthodes Analytiques THÈSE pour l'obtention du Diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Liège 2012/2013.*
- [22] *Goupy J., Stratégie de recherche, Définition et objectifs des méthodes des plans d'expériences.*
- [23] *Dictionnaire français Larousse : www.larousse.fr.*
- [24] *Hubert P., Nguyen-Huu J.J., Boulanger B. et al., 2003. Validation of quantitative analytical procedures: harmonization of approaches. STP Pharma Pratiques. 2003.*
- [25] *Hubert P., Nguyen-Huu J.J., Boulanger B. et al., 2006. Validation of quantitative analytical procedures: harmonization of approaches. Part II. Statistics. STP Pharma Pratiques. 2006.*
- [26] *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.*
- [27] *Autorisation de mise sur le marché- Wikipédia : https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Autorisation_de_mise_sur_le_marché.*
- [28] *Rozet E., Improvement of the predictive character of test results issued from analytical methods life cycle, Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège, 2007-2008.*
- [29] *Hassania KAOUNI, Etude comparative de la validation d'une méthode de dosage d'amlodipine besilate dans une spécialité pharmaceutique par hplc/uv. Démarche classique vs nouvelle approche, 2010/2011.*

Chapitre III

Validation des méthodes analytiques

I. Introduction :

Le principe de la validation des procédures analytiques est aujourd'hui largement répandu dans tous les domaines d'activité où des mesures sont réalisées et des directives sur la validation des méthodes analytiques sont fournies dans des publications comme les guidelines ICH, notamment le guideline ICH Q2 (R1) paru en 2005 : « Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology ».

Afin d'aider les industriels à appliquer les recommandations réglementaires éditées, par exemple par l'ICH ou dans les BPF, et en raison de l'absence d'une démarche harmonisée pour la validation des méthodes analytiques, une commission d'experts a travaillé et a publié un premier guide: guide de validation analytique de la SFSTP pharma 1992, ce dernier a contribué à faire appliquer et progresser les validations analytiques, mais il présente quelques faiblesses.

Ceci a conduit à l'élaboration d'un nouveau guide qui décrit une nouvelle démarche : le profil d'exactitude, c'est le SFSTP pharma pratique 2003/2006.

II. validation analytique selon l'ICH :

L'ICH (International Conférences Harmonisation), créée en 1990, s'est donné comme mission de réaliser des recommandations pour l'industrie pharmaceutique rédigées sous forme de guides, dans le but d'harmoniser les pratiques. Il fait coopérer au niveau international des acteurs appartenant aux autorités et des acteurs appartenant à l'industrie pharmaceutique.

L'ICH propose une validation de méthode basée sur la validation de nombreux critères qui sont : la justesse confondue avec l'exactitude, la fidélité, la limite de quantification avec une fidélité et une justesse définies, la linéarité et l'intervalle de dosage avec une fidélité et une justesse définies. Pour le calcul de chacun des critères, il est proposé un nombre minimum d'essais et de séries d'essais pour les échantillons de validation, sans préciser comment préparer ces échantillons, ce qui rend le plan de préparation des échantillons incomplet. La reproductibilité est déterminée par des essais inter-laboratoires. Sa détermination permet de proposer des procédures analytiques à harmonisations internationales et de réaliser les monographies de la pharmacopée. Plusieurs approches sont décrites pour déterminer les limites de détection et de quantification. Le calcul du coefficient de corrélation, sur cinq séries, permet de valider la linéarité de la droite d'étalonnage, même si le coefficient de

corrélation n'est pas un critère de linéarité. L'intervalle de dosage proposé doit être compris entre 80 et 120 % de la (des) concentration(s) recherchée(s). Les résultats des calculs sont bruts, ils ne sont pas retravaillés pour permettre une estimation rapportée à une population. Les résultats trouvés sont propres à la méthode utilisée pour préparer les échantillons et au nombre d'essais et de séries d'essais. Autrement dit, en fonction du choix de la méthode de préparation des échantillons et du nombre d'essais, pour une même méthode de dosage, les critères de validation calculés ne sont pas identiques et donc difficilement comparables. A contrario, s'ils avaient été retravaillés pour obtenir une estimation rapportée à une population, ils seraient comparables d'un laboratoire à un autre sans se préoccuper du mode de préparation des échantillons, du nombre d'essais ou de séries d'essais.

L'ICH confond l'exactitude avec la justesse

Ce document présente une liste de critères de performance devant permettre la validation d'une méthode de dosage, leurs définitions, et un mode de calcul de ces critères, basé sur un nombre minimal de séries d'essais et de concentrations.

Une ligne directrice ICH (International Conference on Harmonization) a été dédiée à la validation analytique : Q2 (R1): «Analytical Validation»

- * Partie I : «Text on Validation of Analytical Procedures »
- * Partie II : «Validation of Analytical Procedures: Methodology »

Partie I : Texte sur la validation des procédures analytiques.

Ce document présente une discussion sur les caractéristiques qui doivent être prises en compte au cours de la validation des méthodes analytiques.

1. Types de procédures analytiques validées :

La discussion de la validation des méthodes d'analyse est dirigée vers les quatre types les plus courants de procédures analytiques:

- Tests d'identification.
- Les tests quantitatifs pour le contenu des impuretés.
- Essais limites pour le contrôle des impuretés.

- Les tests quantitatifs de la fraction active dans les échantillons de la substance médicamenteuse ou du produit médicamenteux ou d'un autre composant choisi (s) dans le produit pharmaceutique.

Bien qu'il existe de nombreuses autres procédures analytiques, telles que les tests de dissolution pour la détermination de la taille des produits pharmaceutiques ou des particules pour la substance médicamenteuse, ceux-ci ne sont pas traités dans le texte initial sur la validation des procédures analytiques. La validation de ces procédures analytiques supplémentaires est tout aussi importante pour ceux qui sont énumérés ici et peut être traitée dans les documents suivants. Une brève description des types de tests examinés est fournie ci-dessous.

- Tests d'identification sont destinés à garantir l'identité d'un analyte dans un échantillon. Ceci est normalement obtenu par comparaison d'une propriété de l'échantillon (par exemple, le spectre, le comportement chromatographique, la réactivité chimique, etc.) à celle d'un étalon de référence.
- Test des impuretés peut être un test quantitatif ou un test limite pour l'impureté dans un échantillon. Soit essai est destiné à refléter fidèlement les caractéristiques de pureté de l'échantillon.
- les procédures d'analyse sont conçues pour mesurer l'analyte présent dans un échantillon donné.

Dans le contexte de ce document, le dosage représente une mesure quantitative du composant majeur (s) dans la substance médicamenteuse. Pour le produit médicamenteux, des caractéristiques de validation similaires sont également applicables lorsque le dosage du composant actif ou d'un autre sélectionné (s). Les caractéristiques mêmes de validation peuvent également appliquer des dosages associés à d'autres méthodes d'analyse (par exemple, la dissolution).

L'objectif de la procédure d'analyse doit être clairement compris puisque ce régira les caractéristiques de validation qui doivent être évalués.

2. Critères de validation :

Les caractéristiques de validation typiques qui doivent être considérées sont énumérées ci-dessous:

- Spécificité (Specificity).

- linéarité (linearity).
- Exactitude (Justesse) (Accuracy).
- Fidélité (Precision).
- Répétabilité (Repeatability).
- Répétabilité intermédiaire (Intermediateprecision).
- Limite de quantification (Quantification limit).
- Limite de détection (Detection limit).
- Intervalle de validité (Range).

Ces caractéristiques sont définies comme suit :

2.1. Spécificité :

La spécificité est la capacité d'évaluer sans équivoque l'analyte en présence de composants qui peuvent être censés être présents. En général, ces impuretés peuvent inclure des impuretés, des produits de dégradation, la matrice, etc. Le manque de spécificité d'une méthode d'analyse individuelle peut être compensé par un autre procédé d'analyse de support (s). Cette définition a les conséquences suivantes:

- Identification: pour garantir l'identité d'un analyte.
- Tests de pureté: veiller à ce que toutes les procédures analytiques effectuées permettent une déclaration précise de la teneur en impuretés d'un analyte, essai des substances liées à savoir, les métaux lourds, solvants résiduels de contenu,...etc.
- Dosage (contenu ou puissance): pour fournir un résultat exact qui permet une déclaration précise sur le contenu ou la puissance de l'analyte dans un échantillon.

2.2. Exactitude :

L'exactitude d'une procédure d'analyse exprime la proximité d'un accord entre la valeur qui est acceptée soit en tant que valeur réelle conventionnelle ou une valeur de référence acceptée et la valeur trouvée. Ceci est parfois appelé justesse.

2.3. Fidélité :

La fidélité d'une méthode d'analyse exprime le degré de concordance (degré de dispersion) entre une série de mesures obtenues à partir de plusieurs échantillons du même échantillon homogène dans les conditions prescrites. La fidélité peut être

considérée à trois niveaux: la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité doit être étudiée de précision en utilisant des échantillons homogènes, authentiques. Cependant, s'il est impossible d'obtenir un échantillon homogène, il peut être étudié en utilisant des échantillons préparés artificiellement ou une solution d'échantillon. La précision d'une procédure d'analyse est généralement exprimée en la variance, écart-type ou coefficient de variation d'une série de mesures.

2.3.1. Répétabilité : exprime la fidélité dans les mêmes conditions de fonctionnement sur un court intervalle de temps. Répétabilité est aussi appelée fidélité intra-dosage.

2.3.2. Fidélité intermédiaire : La fidélité intermédiaire exprime intra-laboratoires différents: variations jours, différents analystes, différents équipements, etc.

2.3.3. Reproductibilité : la reproductibilité exprime la fidélité entre les laboratoires (études de collaboration, généralement appliquée à la normalisation de la méthodologie).

2.4. Limite de détection :

C'est la plus faible quantité de substance à analyser dans un échantillon qui peut être détecté, mais pas nécessairement quantifiée comme une valeur exacte.

2.5. Limite de quantification :

C'est la plus faible quantité de substance à analyser dans un échantillon qui peut être déterminée quantitativement avec une précision convenable. La limite de quantification est un paramètre d'essais quantitatifs pour des composés de faibles niveaux dans les matrices échantillon, et est utilisé en particulier pour la détermination des impuretés et / ou des produits de dégradation.

2.6. Linéarité :

C'est sa capacité (dans une plage donnée) pour obtenir des résultats de test qui sont directement proportionnelles à la concentration (quantité) de l'analyte dans l'échantillon.

2.7. Gamme :

C'est l'intervalle entre la concentration supérieure et inférieure de l'analyte dans l'échantillon (les concentrations comprises) pour lesquels la méthode d'analyse a un niveau approprié d'exactitude, de fidélité et de linéarité.

2.8. Robustesse :

C'est une mesure de sa capacité à rester non affecté par les petits, mais les variations délibérées des paramètres de méthode et fournit une indication de sa fiabilité lors de l'utilisation normale.

Partie II : validation des procédures analytiques : Méthodologie :

Ce document est un complément du document principal, son but est de fournir des conseils et recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique. En outre, le document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d'enregistrement.

De plus, il donne une indication des données qui doivent être présentées dans une demande d'enregistrement.

Ce document prend en compte les différentes caractéristiques de validation dans des sections distinctes. La disposition de ces sections reflète le processus par lequel peut être mis au point une procédure d'analyse et d'évaluation. En pratique, il est habituellement possible de suivre un plan d'expérimentation qui permet d'évaluer simultanément les divers attributs à valider, et d'en venir ainsi à bien connaître l'ensemble des propriétés de la méthode d'analyse (par ex., spécificité, linéarité, écart d'utilisation, exactitude et précision).

1. Spécificité :

Une enquête de spécificité doit être effectuée lors de la validation des tests d'identification, la détermination des impuretés et le dosage. Le choix des moyens utilisés pour démontrer la spécificité dépend de l'objectif de la méthode d'analyse.

Il n'est pas toujours possible de démontrer qu'une méthode d'analyse présente une spécificité à une substance donnée. Le cas échéant, il est recommandé d'utiliser au moins deux méthodes pour obtenir le degré de discrimination voulu.

1.1. Identification :

Tests d'identification appropriés devraient être en mesure de distinguer les composés de structures étroitement liées qui sont susceptibles d'être présents. La discrimination d'une procédure peut être confirmée par l'obtention de résultats positifs (peut-être par comparaison avec un matériau de référence connu) à partir d'échantillons contenant l'analyte, couplé avec un résultat négatif à partir d'échantillons qui ne contiennent pas l'analyte. En outre, le test d'identification peut être appliqué à des matériaux de structure similaire ou étroitement liés à l'analyte pour confirmer qu'une réponse positive n'est pas obtenue. Le choix de ces matériaux potentiellement interférant doit être fondé sur un jugement scientifique solide avec une prise en compte des interférences qui pourraient se produire.

1.2. Dosage et Impuretés Test (s) :

Pour démontrer la spécificité des méthodes chromatographiques, on devra utiliser des chromatogrammes représentatifs où chacune des composantes est convenablement identifiée.

Des considérations semblables s'appliquent aux autres techniques de séparation.

L'examen des séparations chromatographiques déterminantes devra être aussi poussé qu'il est nécessaire. On pourra démontrer la spécificité de ces méthodes en les utilisant pour séparer deux des composantes dont les pics d'élution sont les plus proches l'un de l'autre.

Si la méthode de détermination de la teneur n'est pas spécifique, il faudra des tests complémentaires pour démontrer la spécificité totale. Par exemple, si l'on dose une substance médicamenteuse à l'aide d'un titrage, on pourra le compléter en ajoutant un test de dosage approprié pour les impuretés.

➤ Impuretés sont disponibles :

S'il est possible d'obtenir des impuretés, on doit alors démontrer que la méthode de détermination de la teneur permet de faire la distinction entre la substance à analyser, les impuretés et (ou) les excipients. Pour ce faire, on enrichit la substance pure (substance médicamenteuse ou produit fini) en y ajoutant une quantité suffisante d'impuretés et (ou) d'excipients, puis on démontre que ces composantes

additionnelles n'influencent pas les résultats obtenus pour la teneur (par comparaison aux résultats obtenus avec des échantillons non enrichis).

Pour le test des impuretés, on peut mettre en évidence les propriétés de discrimination de la méthode en ajoutant à la substance médicamenteuse ou au produit fini une quantité suffisante d'impuretés pour ensuite démontrer que les différentes impuretés présentes sont séparées les unes des autres et (ou) des autres composantes dans la matrice de l'échantillon.

➤ ***Impuretés ne sont pas disponibles :***

Si les impuretés ou des normes produits de dégradation ne sont pas disponibles, la spécificité peut être démontrée en comparant les résultats d'essai des échantillons contenant des impuretés ou des produits de dégradation à une seconde procédure bien caractérisée, par exemple: méthode de la pharmacopée ou toute autre procédure analytique validée (procédure indépendante). Le cas échéant, ceci devrait inclure des échantillons stockés dans des conditions de stress pertinentes: la lumière, la chaleur, l'humidité, l'acide / hydrolyse et l'oxydation base.

- Pour l'essai, il convient de comparer les deux résultats.
- Pour les tests d'impuretés, les profils d'impuretés doivent être comparés. Les tests de pureté des pics peuvent être utiles pour montrer que l'analyte pic chromatographique n'est pas attribuable à plus d'un composant (par exemple, réseau de diodes, spectrométrie de masse).

2. Linéarité :

Une relation linéaire doit être évaluée à travers la gamme de la procédure d'analyse. Il peut être démontré directement sur la substance médicamenteuse (par dilution d'une solution mère standard) et / ou pesées distinctes de mélanges synthétiques des composants du produit médicamenteux, en utilisant la procédure proposée. Ce dernier aspect peut être étudié au cours de l'enquête de la gamme. La linéarité doit être évaluée par inspection visuelle d'une courbe de signaux en fonction de la concentration d'analyte ou de contenu. S'il existe une relation linéaire, les résultats des tests doivent être évalués par des méthodes statistiques appropriées, par exemple par calcul d'une droite de régression par la méthode des moindres carrés. Dans certains cas, pour obtenir la linéarité entre les dosages et concentrations des échantillons, les données de test peuvent avoir besoin d'être soumis à une transformation

mathématique avant l'analyse de régression. Les données de la ligne de régression lui-même peut être utile de fournir des estimations mathématiques du degré de linéarité.

Le coefficient de corrélation, ordonnée à l'origine, la pente de la droite de régression et la somme des carrés résiduelle doit être soumis. Une parcelle des données doit être incluse. En outre, une analyse de l'écart entre les points de données réelles de la droite de régression peut également être utile pour évaluer la linéarité. Pour la détermination de la linéarité, un minimum de 5 concentrations est recommandé. D'autres approches doivent être justifiées.

3. *Gamme :*

La plage spécifiée est normalement dérivée d'études de linéarité et dépend de l'application prévue de la procédure. Il est établi en confirmant que la procédure d'analyse fournit un degré acceptable de linéarité, l'exactitude et la précision lorsqu'ils sont appliqués à des échantillons contenant des quantités d'analyte à l'intérieur ou aux extrémités de la plage spécifiée de la procédure d'analyse. Les plages minimales spécifiées suivantes devraient être envisagées:

- ***Pour le dosage d'une substance médicamenteuse ou un produit fini (médicament):*** normalement de 80 à 120 pour cent de la concentration d'essai;
- ***Pour l'uniformité du contenu :*** couvrant un minimum de 70 à 130 pour cent de la concentration d'essai, à moins qu'un vaste éventail plus appropriée, en fonction de la nature de la forme posologiques (par exemple, des inhalateurs-doseurs), est justifiée.
- ***Pour les tests de dissolution:*** +/- 20% par rapport à la plage spécifiée; par exemple, si les caractéristiques d'un produit à libération contrôlée couvrent une région de 20%, après 1 heure, jusqu'à 90%, après 24 heures, la plage validée serait 0-110% du libellé d'étiquette.
- ***Pour la détermination d'une impureté:*** à partir du niveau de déclaration d'une impureté 1 à 120% de la spécification; - pour les impuretés connues pour être particulièrement puissant ou pour produire des effets pharmacologiques ou toxiques inattendus, devrait être proportionnel au niveau auquel doivent être contrôlés les impuretés de la limite de détection / quantification.

4. *Exactitude :*

L'exactitude doit être établie sur toute la gamme spécifiée de la procédure d'analyse.

4.1. Essai :

- **Substance médicamenteuse** : Plusieurs méthodes de détermination de l'exactitude sont disponibles:
- a) L'application d'une méthode d'analyse pour un analyte de pureté connue (par exemple, des matériaux de référence).
 - b) La comparaison des résultats de la procédure d'analyse proposée avec ceux d'une deuxième procédure bien caractérisée, dont l'exactitude est indiquée et / ou définie.
 - c) L'exactitude peut être déduite une fois la fidélité, la linéarité et la spécificité ont été établies.
- **Produits pharmaceutiques** : Plusieurs méthodes pour déterminer l'exactitude sont disponibles:
- a) L'application de la méthode d'analyse de mélanges synthétiques des composants du produit médicamenteux à laquelle des quantités connues de la substance médicamenteuse à analyser ont été ajoutées.
 - b) Dans les cas où il est impossible d'obtenir des échantillons de tous les composants du produit pharmaceutique, il peut être acceptable, soit pour ajouter des quantités connues de l'analyte pour le produit médicamenteux ou de comparer les résultats obtenus à partir d'une seconde procédure bien caractérisée, l'exactitude de qui est dit et / ou défini.
 - c) L'exactitude peut être déduite une fois la fidélité, la linéarité et la spécificité ont été établies.

4.2. Impuretés (Quantification) :

L'exactitude doit être évaluée sur des échantillons (substance médicamenteuse / médicament) dopés avec des quantités connues d'impuretés. Dans les cas où il est impossible d'obtenir des échantillons de certaines impuretés et / ou des produits de dégradation, il est considéré comme acceptable pour comparer les résultats obtenus par une procédure indépendante. Le facteur de réponse de la substance médicamenteuse peut être utilisé. Il devrait être clair comment les impuretés individuelles ou totales doivent être déterminées par exemple, le poids / poids ou pourcentage d'aire, dans tous les cas par rapport au grand analyte.

5. *Fidélité :*

Validation des tests de dosage et pour la détermination quantitative d'impuretés comprend une enquête de précision.

5.1. *Répétabilité :*

Pour évaluer la répétabilité, il faut :

a) Au moins neuf mesures englobant l'écart d'utilisation de la méthode (c.-à-d. trois concentrations avec trois échantillons chacune).

Ou

b) Au moins six mesures d'une concentration à 100 % de la teneur escomptée.

5.2. *Fidélité intermédiaire :*

La mesure dans laquelle la fidélité intermédiaire doit être établie dépend des circonstances dans lesquelles le procédé est destiné à être utilisé. Le demandeur doit établir les effets des événements aléatoires sur la fidélité de la procédure d'analyse. Les variations typiques à étudier comprennent les jours, les analystes, l'équipement, etc. Il ne semble pas nécessaire d'étudier ces effets individuellement. L'utilisation d'un modèle expérimental (matrice) est encouragée.

5.3. *Reproductibilité :*

La reproductibilité est évaluée au moyen d'un essai inter-laboratoires. Reproductibilité doit être envisagée en cas de la normalisation d'une procédure d'analyse, par exemple, pour l'inclusion des procédures dans les pharmacopées. Ces données ne font pas partie du dossier d'autorisation de mise sur le marché.

5.4. *Données recommandées :*

L'écart-type, l'écart type relatif (coefficient de variation) et l'intervalle de confiance doit être signalée pour chaque type de fidélité étudiée.

6. *Limite de détection :*

Plusieurs approches pour la détermination de la limite de détection sont possibles, selon que la procédure est non instrumentale ou instrumentale. Les approches autres que celles énumérées ci-dessous peuvent être acceptables.

6.1. Sur la base de l'évaluation visuelle :

L'évaluation visuelle peut être utilisée pour des méthodes non instrumentales, mais peut également être utilisée avec des méthodes instrumentales. La limite de détection est déterminée par l'analyse d'échantillons avec des concentrations connues d'analyte et en établissant le niveau minimum à partir duquel l'analyte peut être détecté de manière fiable.

6.2. Sur la base du signal-bruit :

Cette approche ne peut être appliquée à des procédures analytiques qui présentent un bruit de fond. Détermination du rapport signal-sur-bruit est effectuée en comparant les signaux mesurés à partir d'échantillons avec de faibles concentrations connues d'analyte avec ceux des échantillons témoins et à établir la concentration minimale à laquelle l'analyte peut être détecté de manière fiable. Un rapport signal sur bruit entre 3 ou 2: 1 est généralement considérée comme acceptable pour l'estimation de la limite de détection.

6.3. Sur la base de l'écart-type de la réponse et la pente :

La limite de détection (LD) peut être exprimée sous la forme: $LD = 3.3 \sigma / S$ Où σ = l'écart type de la réponse. S = la pente de la courbe d'étalonnage. La pente S peut être estimée à partir de la courbe d'étalonnage de l'analyte. L'estimation de σ peut être réalisée dans une variété de façons, par exemple:

- **Sur la base de l'écart type du blanc :** La mesure de l'ampleur de la réponse d'arrière-plan d'analyse est effectuée en analysant un nombre approprié d'échantillons blancs et en calculant l'écart-type de ces réponses.
- **Sur la base de la courbe d'étalonnage :** Une courbe d'étalonnage spécifique devrait être étudiée en utilisant des échantillons contenant un analyte dans la gamme de LD L'écart-type résiduel d'une ligne de régression ou l'écart type des ordonnées à l'origine des droites de régression peut être utilisé comme l'écart-type.

7. Limite de quantification :

Plusieurs approches pour déterminer la limite de quantification sont possibles, selon que la procédure est non instrumentale ou instrumentale. Les approches autres que celles énumérées ci-dessous peuvent être acceptables.

7.1. Sur la base de l'évaluation visuelle :

La limite de quantification est généralement déterminée par l'analyse d'échantillons avec des concentrations connues d'analyte et en établissant le niveau minimum à partir duquel l'analyte peut être quantifiée avec une exactitude et une précision acceptable.

7.2. Sur la base de l'approche signal-bruit :

Détermination du rapport signal-sur-bruit est effectuée en comparant les signaux mesurés à partir d'échantillons avec de faibles concentrations connues d'analyte avec ceux des échantillons témoins et en déterminant la concentration minimale à laquelle l'analyte peut être quantifié de manière fiable. Un rapport signal-bruit typique est de 10.

7.3. Sur la base de l'écart-type de la réponse et la pente :

La limite de quantification (LQ) peut être exprimée sous la forme : $LQ = 10 \sigma / S$ Où σ = l'écart type de la réponse. S = la pente de la courbe d'étalonnage. La pente S peut être estimée à partir de la courbe d'étalonnage de l'analyte. L'estimation de σ peut être réalisée dans une variété de façons, par exemple:

- **Basé sur l'écart type du blanc :** La mesure de l'ampleur de la réponse d'arrière-plan d'analyse est effectuée en analysant un nombre approprié d'échantillons blancs et en calculant l'écart-type de ces réponses.
- **Sur la base de la courbe d'étalonnage :** Une courbe d'étalonnage spécifique devrait être étudiée en utilisant des échantillons contenant un analyte dans la gamme de LQ.

8. Robustesse :

L'évaluation de la robustesse se fait durant la phase de mise au point. Cette évaluation doit démontrer que la méthode demeure fiable lorsqu'on introduit des variations planifiées de paramètres. Si les résultats peuvent varier selon les conditions d'analyse, il faut veiller à ce que celles-ci soient adéquatement contrôlées ou recommander certaines précautions dans la marche à suivre.

L'évaluation de la robustesse a notamment pour conséquence la définition d'un ensemble de paramètres sur le caractère approprié de la méthode d'analyse qui permet

de garantir la validité de cette méthode, quelles que soient les conditions d'utilisation. Voyons quelques exemples de variations caractéristiques :

- La stabilité des solutions d'analyse.
- Le temps d'extraction.

Dans le cas de la chromatographie liquide, des exemples de variations typiques sont les suivants:

- Influence des variations de pH dans une phase mobile.
- Influence des variations de la composition de la phase mobile.
- Des colonnes différentes (différents lots et / ou des fournisseurs).
- Température.
- Débit.

9. Vérification du système de suitability :

La vérification du système de suitability fait partie intégrante de nombreuses méthodes d'analyse. Elle suppose que l'équipement, les dispositifs électroniques, les opérations d'analyse et les échantillons constituent un système cohérent et peuvent être évalués comme tels. Les critères en fonction desquels on détermine si le système est approprié dépendent de la méthode à valider.

L'ICH confonds d'une part, la linéarité et la courbe d'étalonnage et, d'autre part, les résultats et le signal. Il considère que "La limite de quantification est un paramètre des méthodes de dosage des substances présentes en faibles quantités dans les matrices d'échantillon; elle est plus particulièrement utilisée dans le dosage des impuretés et (ou) des produits de dégradation ". Il définit la limite de quantification d'une procédure analytique individuelle comme "la plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de doser avec un degré acceptable de fidélité et d'exactitude ". Le document ICH définit une seule limite de quantification. Mais l'intervalle de dosage d'une procédure analytique a deux limites : LQI (LQ inférieure) et LQS (LQ supérieure).

Concernant la définition de l'exactitude, Il ne s'agit plus de l'exactitude, mais plutôt de la définition de la justesse qui est la valeur moyenne de plusieurs résultats (par opposition à un seul résultat pour l'exactitude) qui est comparée à la vraie valeur. L'exactitude est désignée par le mot « justesse »".

L'ICH ne propose pas une méthodologie pour la limite de détection, l'étude de la robustesse, ni une approche pour établir la performance des méthodes, cela reste à la charge de l'opérateur.

L'ICH ne propose pas de méthode d'analyse des résultats des critères de validation, charge à l'opérateur de se fixer les limites pour tous ces critères. Il n'y a pas non plus d'information sur l'impact des critères de validation sur la performance réelle attendue du dosage. Aucun exemple n'est proposé pour illustrer une validation de méthodes de dosage.

Il ne permet pas de savoir comment valider tous ces critères. En suivant les recommandations de l'ICH, la validation d'une méthode passe par la détermination de critères de validation, mais pas par une validation de ces critères. A partir du moment où ces critères sont calculés, la méthode est validée. [5], [16], [17]

III. Validation analytique selon STP1992 :

1. Guide STP1992 :

Le guide de validation analytique publié en 1992 par une commission SFSTP a un objet d'aider les industriels pharmaceutiques pour valider leurs procédures analytiques selon les critères de la note explicative CEE III/844/87. Le but poursuivi est double :

- Proposer un traitement statistique suffisamment ouvert pour couvrir la plupart des cas auxquels l'analyste pourra être confronté, tout en ayant éliminé des tests mal adoptés au champ d'application de la note explicative CEE.
- Optimiser les essais analytiques à réaliser, c'est-à-dire éviter de multiplier les prises d'essais conduisant à un trop grand nombre d'analyses, tout en générant suffisamment de résultats pour satisfaire à l'étude des critères de validation ; c'est ainsi que l'on fournira un protocole opératoire commun pour l'étude de la fidélité, de la linéarité et de l'exactitude.

2. Critères de validation analytique :

La validation analytique se fait par l'intermédiaire des critères qui sont :

- Spécificité.
- Linéarité.
- Fidélité :

- Répétabilité
 - Reproductibilité.
- Exactitude.
 - Sensibilité.
 - Seuil de détection.
 - Seuil de quantification.

Ces critères s'appliquent dans la validation d'une procédure analytique selon sa rubrique comme indiqué le tableau ci-dessous :

Tableau1 : Critères de validation.

<i>Rubrique</i>	<i>Critères</i>
Identification	Spécificité.
Essai (teneur ou impureté)	- Spécificité. - Seuil de détection. - Seuil de quantification.
Dosage (teneur ou activité)	- Spécificité. - Linéarité. - Exactitude. - Fidélité : <ul style="list-style-type: none"> • Répétabilité. • Reproductibilité. -Sensibilité.

2.1. Spécificité :

Une procédure d'analyse est dite spécifique lorsqu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physico-chimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substance dans l'échantillon.

2.1.1. Principe actif :

- **Pour l'identification**, la spécificité signifie la garantie de la substance à analyser.

- **Pour un essai**, la spécificité représentera la garantie que toutes les procédures d'analyses exécutées permettent une évaluation de la teneur en impuretés de la substance à analyser.
- **Pour un dosage**, on dit que la procédure analytique est spécifique lorsqu'on a la garantie que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser.

La spécificité peut s'exprimer comme le degré de biais sur les résultats, engendré par l'analyse d'échantillons comportant des impuretés intentionnellement rajoutées ou des produits de dégradation ou des substances à structures chimiques proches, par rapport aux résultats obtenus sur des échantillons ne comportant pas ces additifs.

2.1.2. Produit fini :

La spécificité représente le degré d'interférence provenant d'autres substances (principe actif, substance apparentée, substance de dégradation) présentes dans la matrice complexe que peut représenter un produit fini.

2.2. Linéarité ; Exactitude ; Fidélité:

2.2.1. Définitions (selon la note explicative CEE III/844/87) :

- **Linéarité** : la linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité (à l'intérieur d'un certain intervalle) d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon.
- **Exactitude** : l'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie (standards interne de la firme), soit comme une valeur de référence (standards international) et la valeur trouvée (valeur moyenne) obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois.
- **Fidélité** : la fidélité de la procédure d'analyse exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesure provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites.

2.2.2. Protocole opératoire commun pour l'étude de la linéarité, de l'exactitude, et de la fidélité :

Les études de la linéarité sont faites en même temps que les études de l'exactitude et de fidélité à travers le principe actif seul et la forme pharmaceutique reconstituée au laboratoire.

Les bienfaits de ce protocole sont les suivants :

- Possibilité d'étudier et de comparer les linéarités obtenues à travers le principe actif et la forme pharmaceutique reconstituée.
- Pour l'étude de l'exactitude, il est possible de se référer soit à l'étalon 100%, soit à la gamme d'étalonnage du principe actif seul, déterminé dans le cadre de la linéarité.
- Pour l'étude de fidélité, possibilité d'exploiter les gammes d'étalonnages ou l'étalon à 100% étudiés dans le cadre de la linéarité afin d'exprimer les réponses en pourcentage de recouvrement.
- Possibilité de vérifier la cohérence des variances d'exactitude et de fidélité.

2.2.2.1. Protocole :

La forme pharmaceutique reconstituée est un mélange de tous les composants correspondant qualitativement et quantitativement à la forme pharmaceutique à étudier, excepté la substance à tester qui sera ajoutée en quantité variable suivant le critère étudié.

Les quantités de la substance à tester doivent être pesées individuellement et mélangées à une quantité la plus constante possible du mélange des autres composants. Il est possible d'introduire dans le mélange la substance à tester sous forme d'une partie aliquote d'une solution mère, mais les observations étant supposées indépendantes, chaque solution mère ne doit être utilisée que pour une seule observation.

2.2.2.2. Linéarité et exactitude :

2.2.2.2.1. Principe de protocole :

Réaliser N pesées x_{ij} réparties en K groupe de n dont il faut exister une progression arithmétiques entre elles.

Une observation y_{ij} correspond à chacune pesée x_{ij} .

Il est recommandé de faire au minimum cinq groupes de trois pesées.

Réaliser selon ce protocole deux gammes :

- Une gamme avec la forme pharmaceutique reconstituée, soit D_1 d'équation $y = b_1x + a_1$, la droite de régression linéaire correspondante.
- Une gamme avec le principe actif seul (étalon), soit D_2 d'équation $y = b_2x + a_2$, la droite de régression linéaire correspondante.

La stratégie statistique suivie peut résumer dans la figure suivante :

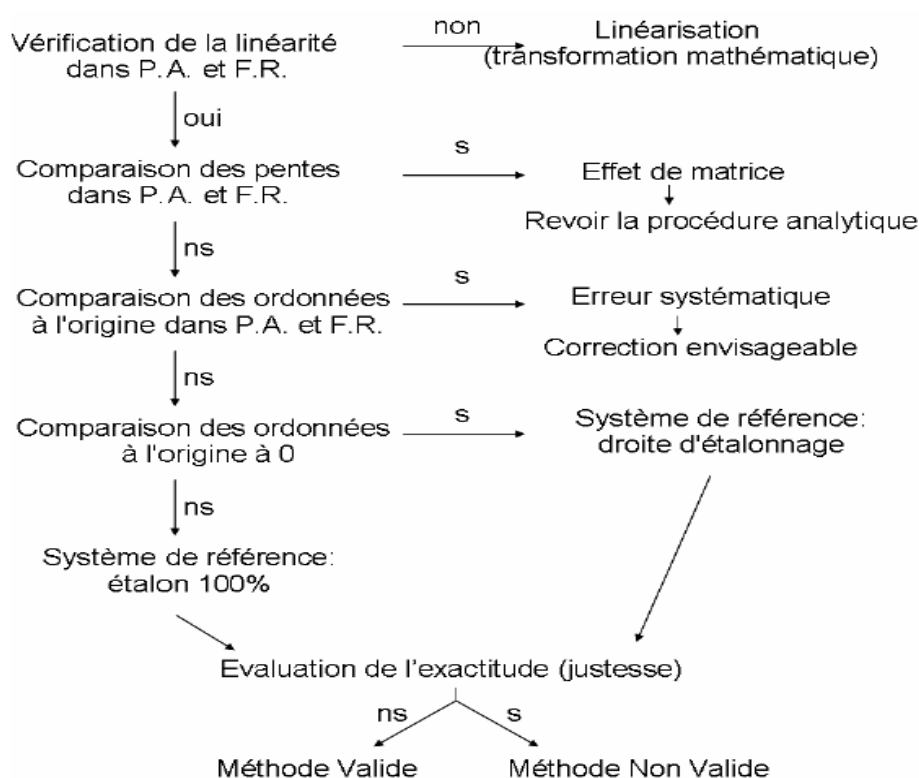


Figure 7 : stratégie statistique selon STP 1992.

-P.A : principe actif seul

-F.R : forme pharmaceutique reconstituée.

-s : test statistique significatif.

-ns : test statistique non significatif.

2.2.2.2.2. Linéarité :

Cette étude doit faire sur les deux gammes.

L'équation de la droite de régression est : $y = bx + a$, dont b est la pente et a est l'ordonnée à l'origine.

A. Calcul de la pente (b) :

L'estimation de pente b s'obtient en appliquant la méthode des moindres carrés qui a un but de rendre minimale la somme des carrés des écarts $(y_{ij} - \hat{y}_{ij})^2$ entre les valeurs expérimentales y_{ij} et les valeurs estimées \hat{y}_{ij} .

B. Calcul de l'ordonnée à l'origine (a) :

Selon la méthode des moindres carrés, la droite de régression linéaire passe par le point de coordonnées \bar{x} et \bar{y} qui sont respectivement les moyennes des x_{ij} et y_{ij} .

C. Calcul de coefficient de corrélation :

Ce critère a été développé pour mesurer la corrélation, c'est-à-dire la liaison entre deux variables x et y . Sa valeur est comprise entre -1 et $+1$. S'il est positif cela signifie que les deux variables ont tendance à augmenter simultanément, et de façon opposée s'il est négatif.

On calcule le coefficient de corrélation à partir des écarts types des variables x_{ij} et y_{ij} et sa covariance $S_{x_{ij}y_{ij}}$.

D. Comparaison de l'ordonnée à l'origine (a) avec 0 :

On calcule l'écart type de a (S_a) et son intervalle de confiance, leur formule fait intervenir une variable de Student à $\nu = n - 2$ degrés de liberté notée $t_{1-\alpha/2}$. Si l'intervalle contient la valeur 0 , on peut supposer que l'ordonnée à l'origine n'est pas différente de 0 au seuil de probabilité $(1-\alpha)$.

E. Comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine des droites D_1 et D_2 :

La comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine s'effectue par un test de t de Student.

F. Changement de variable :

Un changement de variable est nécessaire avant l'estimation de l'erreur expérimentale.

G. Test d'homogénéité des variances :

On applique le test de Cochran pour vérifier les variances constitutives de l'erreur expérimentale. Le but de test est de démontrer, au risque considéré, l'ensemble des variances des différents groupes comme homogène, donc on conclut que le niveau de concentration n'a pas d'influence sur ces variances.

H. Test de l'existence d'une pente significative :

Comparaison entre les variances dues à la régression et celles dues aux erreurs (expérimentale et d'ajustement), on applique le test de Fisher. Si le rapport entre la variance d'erreurs et la variance de régression est supérieur à la valeur théorique lue dans la table, on conclut l'existence d'une pente significative donc à une dépendance linéaire au seuil de probabilité considéré.

I. Test de la validité de régression :

Comparaison entre les erreurs d'ajustement (S^2_L) et expérimentales (S^2_E), on applique le test de Fisher. Le but de test est conclure que l'ajustement est valide au seuil de probabilité considéré.

J. Méthodes de linéarisation :

Si on obtient un modèle non linéaire, on peut le linéariser à l'aide de simples transformations sur les variables, parmi ces modèles :

- Modèle de forme exponentielle par une transformation logarithmique.
- Modèle de forme réciproque avec : $y' = 1/y$ ou $x' = 1/x$.

2.2.2.2.3. Exactitude :

Considérer les recouvrements entre les pesés retrouvés grâce au système de référence considéré et les pesés introduites.

A. Système de référence :

➤ Droite D_2 :

Nous disposons N valeurs y_{ij} réparties en k groupes de n valeurs.

➤ Etalon 100% :

Soient x_{100} et y_{100} respectivement la pesée et l'observation correspondantes à la solution de référence.

Dans les deux systèmes, on effectue un changement de variable.

Cette méthode permet de mesurer l'exactitude dans les conditions de dosage routinières.

B. Vérification de l'homogénéité des variances liées :

On applique le test de Cochran dont le but est de démontrer, au risque considéré, qu'il n'existe pas une variance aberrante entre les différents niveaux, donc on conclut que le niveau de concentration n'a pas d'influence sur ces variances.

C. Test de validité des moyennes :

Comparaison entre les erreurs inter-groupe et intra-groupe, on applique le test de Fisher qui nous montre que le facteur niveau n'a pas d'influence sur les moyennes et il n'y a pas de différence statistiquement significative.

D. Estimation du recouvrement moyen :

Si les variances et les moyennes sont reconnues homogènes, on peut alors calculer le recouvrement moyen et son intervalle de confiance, on applique le test de Student.

2.2.2.2.4. Fidélité :

La fidélité s'exprime par la mesure de la répétabilité et de la reproductibilité. Ces deux mesures extrêmes de la variabilité sont suffisantes pour convenir à la plus part des cas courants, le premier mesurant la variabilité minimale des résultats et le second mesurant la variabilité maximale des résultats.

2.2.2.2.4.1. Principe de protocole déterminant les critères de fidélité :

L'étude réalisée sur la forme pharmaceutique reconstituée ou à partir d'une masse homogène du produit fini.

A. Le plan expérimental :

Effectuer k groupes d'essais répondent aux conditions de reproductibilité, à l'intérieur de chaque groupe, on réalise n déterminations indépendantes répondent aux conditions de répétabilité.

B. Condition de répétabilité :

L'étude de n essais se fait sur un échantillon homogène avec la même méthode dans un même laboratoire, par le même opérateur utilisant le même équipement, dans un court intervalle de temps.

C. Condition de reproductibilité :

L'étude de k groupes d'essai réalisé avec la même méthode sur un échantillon homogène dans différents laboratoire, et/ou par différents opérateurs, et/ou utilisant un équipement différents, à des jours différents.

D. Conditions minimales :

k = 3 au minimum.

n = 3 au minimum.

2.2.2.2.4.2. Algorithmes :***A. Transformation des données brutes en pourcentages de recouvrement :*****➤ Système de référence considéré : droite D_1**

a) Transformation des données brutes en quantités retrouvées.

b) Détermination des pourcentages de recouvrement.

➤ Système de référence considéré : étalon 100%

a) Transformation des données brutes en quantités retrouvées.

b) Détermination des pourcentages de recouvrement.

B. Moyennes des groupes :

Calcul la moyenne m_j de n_j répétitions à l'intérieur de groupe.

C. Dispersion à l'intérieur des groupes de mesure :

On calcul la variance des répétitions à l'intérieur du groupe j (S_j^2). L'écart type à l'intérieur de groupe j est donné par S_j .

D. Variance de répétabilité :

Sous réserve que les variances des k groupes de mesures forment un ensemble homogène, on peut calculer la variance de répétabilité S^2_r .

E. Variance inter-groupe :

On peut calculer la variance inter-groupe (S^2_g) qui traduit la dispersion existant entre les moyennes des groupes.

F. Variance de reproductibilité :

On calcul la variance de reproductibilité (S^2_R) qui est la somme de la variance de répétabilité et la variance inter-groupe.

G. Expression des résultats :

On exprime les erreurs de répétabilité et de reproductibilité sous forme de coefficients de variation (CV_r ; CV_R) qui est le rapport de l'écart-type à la moyenne. Plus la valeur du coefficient de variation est élevée, plus la dispersion autour de la moyenne est grande.

2.2. Sensibilité :

Selon la note explicative CEE III/844/87 FR. la sensibilité est la capacité de méthode d'analyse d'enregistrer de faible variations de la concentration. Variation minimale qu'il faut imposer à la grandeur X à déterminer (par exemple une concentration) pour obtenir une variation significative du signal mesuré y.

2.3. Seuil de détection :***2.3.1. Définition :***

Selon la note explicative CEE II/844/87-FR : c'est la plus petite quantité d'une substance a examiné dans un échantillon pouvant être détecté, mais non quantifiée comme une valeur exacte. Le seuil de détection est généralement un paramètre des essais limites.

Le seuil de détection est exprimé soit en concentration, soit en quantité, et dérive de la plus petite quantité x qui puisse être détectée avec une certitude suffisante pour une procédure d'analyse.

2.3.2. Estimation de seuil de détection (SD) :

Selon le type de procédure d'analyse, deux méthodes sont proposées :

- La procédure analytique fournit un enregistrement graphique ; le seuil de détection est estimé à partir de bruit de fond de l'enregistrement.
- La procédure analytique ne fournit pas d'enregistrement graphique, mais seulement des valeurs chiffrées ; le seuil de détection est estimé à partir de ces valeurs.

2.4. Le seuil de quantification :

2.4.1. Définition :

C'est la plus petite quantité d'une substance à examiner pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une fidélité et une exactitude définies. Le seuil de quantification est requis pour le dosage des impuretés ou des produits de dégradation.

2.4.2. Estimation de seuil de quantification (SQ) :

Pour déterminer le seuil de quantification, on utilise les valeurs obtenues pour le seuil de détection.

- Fidélité (répétabilité) est représentée par le coefficient de variation.
- Exactitude est représenté par le recouvrement moyen et son intervalle de confiance.

2.4.3. Domaine de quantification :

La figure ci-dessous représente le domaine de quantification dont SQ est la limite supérieure du domaine possible de quantification. L'étude de ce domaine peut être réalisée selon les règles générales d'une procédure de dosage.

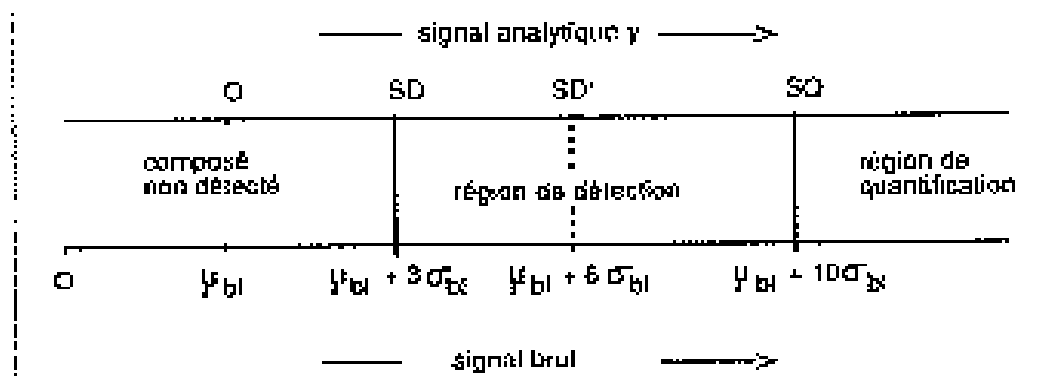


Figure 8 : domaine de quantification.

3. Robustesse :

3.1. Introduction :

L'étude de la robustesse permet de définir les variations admissibles de chacun des paramètres opératoires critiques qui sont sans effets sur la validité des résultats fournis, ces paramètres étant étudiés indépendamment les uns des autres ou regroupés. Cette étude n'est pas requise par la note explicative CEE III/844/87-FR FINAL d'aout 1989.

Cette première définition de la robustesse est utilement complétée à l'USP XXII, par un rapprochement avec la notion de reproductibilité. D'une part, la robustesse ne serait rien d'autre qu'une mesure de la reproductibilité des résultats obtenus dans des conditions opératoires normales, de laboratoire à laboratoire, et même d'un analyste à l'autre. On peut, alors, comparer cette reproductibilité à la répétabilité de cette même procédure d'analyse appliquée dans ces conditions opératoires normales, la différence représentant en quelque sorte la robustesse. Ces considérations conduisent à s'intéresser à la stabilité d'une procédure d'analyse qui pourrait, alors, se définir par :

- l'insensibilité de la procédure à la présence d'autres composants constituant la matrice (large sélectivité).
- l'insensibilité de la procédure liée à la constante des résultats à l'intérieur du domaine de variations admissible de chaque paramètre opératoire critique par rapport à sa valeur nominale.

3.2. Définition :

La robustesse d'une procédure d'analyse est sa capacité à rendre des résultats exacts en présence de faibles changements de conditions expérimentales susceptibles de se produire dans l'utilisation de cette procédure.

3.3. Conditions expérimentales et paramètres opératoires :

Un faible changement de conditions expérimentales est tout écart d'un paramètre opératoire par rapport à sa valeur nominale qui est susceptible d'influer sur les résultats final. Les seuls paramètres opératoires à considérer sont les paramètres quantifiables tel que : température, PH... ect. La complexité d'une procédure d'analyse augmente généralement le nombre de paramètres.

Pour évaluer la robustesse d'une procédure d'analyse, on applique celle-ci sur un échantillon homogène on faisant varier les paramètres retenus. Si on utilise la technique classique consistant à faire varier chacun des paramètres, tout en maintenant les autres constants, l'opération est rapidement irréalisable en raison du nombre des essais à effectuer. Il faut utiliser la technique des plans factoriels, qui fait varier plusieurs paramètres en même temps. Ce procédé permet de diminuer de façon importante le nombre des essais. Il permet, en plus, l'étude des interactions entre paramètres, c'est-à-dire dépend de la modification simultanée de deux ou plusieurs paramètres.

3.4. Choix des paramètres opératoires :

A l'aide de ces plans, quatre essais permettront de tester deux paramètres, huit essais trois ou quatre et seize essais quatre ou cinq, tout en calculant les interactions des paramètres entre eux.

Le premier paramètre sera toujours la teneur en substance à analyser, à cause des ses interactions possibles avec les autres paramètres. L'étude de reproductibilité permet d'orienter le choix des paramètres opératoires à étudier grâce aux écarts observés. L'étude des ces écarts précisera la valeur de l'écart admissible de ces paramètres à inclure dans les essais des plans factoriels.

3.5. Champ d'application :

La robustesse est requiert pour :

- le dosage des principes actifs seuls ou dans les produits finis ;
- le dosage des impuretés ou produits de dégradation ;
- les tests limites relatifs aux impuretés ou produits de dégradation ;
- les tests pharmaco techniques.

L'étude de la robustesse présente néanmoins des avantages que l'analyste pourra expliciter lors de développement d'une procédure analytique.

3.6. Intérêt de l'étude de la robustesse :

Outre la mise en évidence des qualités de stabilité d'une procédure d'analyse en présence de changements de la matière à doser ou de faibles changements des conditions opératoire, l'intérêt majeur de la connaissance de la robustesse réside dans

l'aide procurée à l'analyste pour affiner un mode opératoire au niveau de certains paramètres opératoires déterminants ou pour optimiser une procédure d'analyse au cours de son développement.

Les résultats de l'exploration de la robustesse d'une procédure d'analyse, lorsqu'ils figurent dans un rapport de validation, apportent une aide à l'analyste qui cherchera à valider un résultat obtenu par l'application de cette procédure ayant incidemment présenté une variation sur un paramètre opératoire. [4], [18]

Finalement, si ce premier guide a largement contribué à faire appliquer et progresser les validations analytiques, ils présentent toutefois des faiblesses quant aux conclusions des tests réalisés et quant à l'aide à la prise de décision au regard de limites d'acceptation définies pour l'usage d'une procédure analytique.

Il présente aussi des faiblesses par rapport à l'objectif visé. Par exemple, l'analyste peut être pénalisé s'il a développé une procédure trop fidèle, en d'autres termes si la dispersion de ses résultats est trop faible. De plus, il est confronté à un ensemble de tests statistiques qui complique parfois sa décision plutôt qu'il ne l'aide. [19]

IV. Validation analytique selon SFSTP 2003-2006 :

Les premiers guides de la SFSTP (1992 et 1997 pour les analyses biologiques) ont largement contribué à faire appliquer et progresser les validations analytiques. Cependant, ils présentent quelques faiblesses qui ont conduit à l'élaboration d'un nouveau guide.

Une nouvelle commission SFSTP a rédigé le guide SFSTP 2003 et a proposé de garder les mêmes bases de la validation analytique pour une démarche harmonisée, en distinguant notamment les règles de diagnostic et les règles de décision. Ces dernières basent sur l'utilisation du profil d'exactitude, une nouvelle stratégie de validation qui repose sur la notion d'erreur totale (biais + écart-type), permettant de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation.

Cette approche permet donc de minimiser considérablement le risque d'accepter une procédure qui ne serait pas suffisamment exacte ou, au contraire, de rejeter une procédure qui serait capable (dans les deux cas il s'agit d'améliorer significativement le rapport coût/efficacité des prestations).

Elle est en parfait accord avec l'objectif d'une méthode analytique, à savoir sa capacité de quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues qu'un laboratoire aura à déterminer. Ce nouveau guide a aussi pour objectif de proposer un consensus sur les normes communément admises en incorporant largement la terminologie ISO.

Le second guide SFSTP2006 complète le premier guide (SFSTP 2003) par le développement de l'ensemble des calculs statistiques nécessaires à l'implémentation des concepts présentés dans la partie 1 du guide.

Dans la troisième partie de ce guide, l'harmonisation de cette approche est également illustrée par plusieurs exemples couvrant différents champs d'application sa fin d'en faciliter la compréhension et la mise en pratique.

1. Domaines d'application :

Les différents secteurs d'application visés par ce guide sont :

- Les sociétés prestataires de services.
- Les autorités réglementaires.
- Les laboratoires officiels de contrôle.
- Les industries des domaines d'activité suivants : chimie, pharmacie, biopharmacie, agroalimentaire, environnement, cosmétologie...etc.

L'objectif du guide est donc de proposer une démarche harmonisée de validation applicable aux différentes procédures analytiques quantitatives, et ce indépendamment du secteur d'activité.

2. Critères de validation :

Il est important de préciser qu'à l'heure actuelle il n'y a pas toujours une Convergence entre les différents documents réglementaires (ISO, ICH, AFNOR, FDA...etc.) quant à la définition des critères de validation à tester. C'est ainsi que la notion de linéarité apparaît ou non et que son interprétation peut être différente d'un document à l'autre. Il en va de même avec la justesse qui, selon les documents, est confondue avec l'exactitude. C'est pourquoi, dans un souci d'harmonisation mais aussi de cohérence, le guide SFSTP 2003 a retenu la norme ISO comme principal référentiel pour la définition des critères de validation.

2.1. Spécificité-sélectivité :

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents.

2.2. Fonction de réponse (courbe de d'étalonnage) :

La fonction de réponse d'une méthode analytique est, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration de la substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée "courbe d'étalonnage".

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) 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:

$Y = f(X) + \varepsilon$ ou $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$ est l'erreur associée à la fonction de réponse f appelée communément erreur résiduelle.

Il faut donc ajuster la fonction de réponse, c'est à-dire évaluer les paramètres du modèle, de manière à ce que l'erreur résiduelle soit minimisée.

Deux familles de fonctions de cet ensemble apparaissent: les fonctions dites linéaires en leurs paramètres et les fonctions non linéaires. Divers fonctions de réponse peuvent être envisagées lors de la validation de la méthode et leur choix dépend du type de méthode (méthode physicochimique, bio analytique, immuno-dosage, etc.).

Par ailleurs, parmi les fonctions de réponses acceptables, on pourra remarquer que certaines fournissent des résultats meilleurs que d'autres. Ce seront ces dernières qui devront être retenues. Le coefficient de détermination R^2 est toujours supérieur à 0.99 pour l'ensemble de ces modèles, mais il n'est pas une indication fiable de la qualité des résultats rendus de la procédure.

2.3. *Justesse:*

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée comme telle. La justesse donne une indication sur les erreurs systématiques.

La justesse est exprimée en termes de biais absolu (mg/ml), de biais relatif (%) ou de taux de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Elle est obtenue en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées.

$$\frac{\bar{Z}}{\bar{X}} \times 100$$

Taux de recouvrement moyen.

2.4. *Fidélité :*

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Elle donne des informations sur l'erreur aléatoire et est évaluée à trois niveaux: la répétabilité et la fidélité intermédiaire et reproductibilité. La fidélité traduit uniquement la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée. La mesure de fidélité est calculée à partir de l'écart type des résultats d'essais.

Le terme « résultats d'essai indépendants » signifie des résultats obtenus d'une façon non influencée par un essai précédent sur le même matériau ou similaire, compte tenu des contraintes liées au secteur d'activité concerné.

Les mesures quantitatives de la fidélité dépendent de façon critique des conditions stipulées. Peuvent ainsi être distinguées les conditions de :

- **Répétabilité :** conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.

- **Fidélité intermédiaire** : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné.
- **Reproductibilité** : 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.

La fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) peut être exprimée en écart type (SD) et en termes de coefficient de variation (CV).

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.

2.5. Exactitude :

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée comme telle, appelée également "valeur conventionnellement vraie". L'exactitude prend en compte l'erreur totale, c'est à dire l'erreur systématique et l'erreur aléatoire liées au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité.

Le profil d'exactitude est obtenu en reliant entre elles d'une part les bornes inférieures et d'autre part les bornes supérieures de l'intervalle de tolérance, bornes calculées pour chaque niveau de concentration.

La méthode est considérée comme valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation fixées a priori.

Cette approche garantirait que seules 5.0% des futures mesures d'échantillons inconnus seront en dehors de ces limites. Dans sa définition de 1994 (la norme ISO 5725), l'exactitude est très proche de la justesse. Cependant, la note explicative CEE III/844/87 montre qu'il s'agit d'un mélange entre la justesse (un biais) et la fidélité (un écart type). C'est pourquoi le terme « exactitude » est toujours accompagné des termes « justesse » et « fidélité » dans le titre même de la norme ISO 5725. En fait, on ne peut pas mesurer en un seul paramètre un écart à une valeur de référence et une dispersion des résultats. C'est pourquoi on préfère aujourd'hui parler, d'une part, d'incertitude qui est caractérisée par un écart type composé (dont une des

composantes est la composante aléatoire du biais de justesse), d'autre part, de justesse. Signalons encore que le seul intérêt de l'incertitude par rapport à la fidélité est de se rapprocher du vocabulaire classique de la métrologie.

2.6. Linéarité :

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon.

L'exigence de linéarité s'applique aux résultats (concentration calculée = f (concentrations introduites)), pas aux réponses (signal = f (concentrations introduites)). C'est un pré-requis à l'estimation de la justesse. A l'inverse, l'existence d'une relation linéaire entre la concentration estimée et la concentration introduite n'implique pas que la méthode soit juste.

2.7. Limites de détection (LD) :

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.

2.8. La limite de quantification (LQ):

La limite inférieure de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites, avec une exactitude définie. La définition peut également être appliquée pour la limite supérieure de quantification, qui est la plus grande quantité de l'analyte dans l'échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites, avec une exactitude définie.

Les limites de quantification sont obtenues en calculant la plus petite et la plus grande concentration pour lesquelles les limites d'exactitude, c'est à dire les limites de l'intervalle de tolérance attendu au niveau β sortent des limites d'acceptation.

2.9. Intervalle de dosage:

L'intervalle de dosage est l'intervalle compris entre les limites inférieure et supérieure de quantification où la procédure analytique atteint l'exactitude souhaitée.

2.10. Sensibilité :

La sensibilité d'une procédure d'analyse peut être définie comme étant le rapport de la variation de la réponse de la méthode d'analyse à la variation de la quantité d'analyte.

De plus, selon les domaines d'activité concernés, d'autres critères plus spécifiques peuvent être requis, par exemple :

- stabilité de l'analyte ;
- rendement d'extraction (absolu et relatif) ;
- effet de dilution, etc.

2.11. Stabilité :

La stabilité de la substance à analyser doit être testée pendant la phase de développement et confirmée au terme de la validation de la procédure de dosage puisqu'elle conditionne la validité des autres critères. Le contrôle de la stabilité s'effectue le plus souvent, en fonction de l'intervalle de dosage, à un ou deux niveaux de concentration représentatifs de cet intervalle. À partir de solution fraîchement préparée ou reconstituée dans la matrice cible, répartie en nombre suffisant d'aliquotes, la stabilité est évaluée sur la base minimale de trois échantillons par mesure dans des conditions de conservation variées, telles que la lumière, l'obscurité, la température, le pH, etc. Ces conditions sont le plus souvent fonction de la pratique courante du laboratoire et des demandes réglementaires. L'application, l'acceptabilité et l'interprétation des normes de stabilité restent à ce jour propre à chaque laboratoire.

2.12. Rendement d'extraction :

Le rendement d'extraction absolu peut être obtenu par le rapport des signaux mesurés, d'une part après traitement de l'échantillon chargé avec une quantité connue et d'autre part après l'injection directe dans le système analytique d'une solution de référence contenant une concentration équivalente de substance à examiner. Le rendement d'extraction absolu est un critère important pour les procédures nécessitant une extraction préalable du principe actif. Si le rendement d'extraction est faible, il conviendra donc de poursuivre le développement de la méthode. En effet, ce critère intervient directement dans l'évaluation du seuil de quantification de la méthode.

2.13. Effet de la dilution :

L'effet de dilution doit également être testé afin de valider le protocole qui sera appliqué en routine pour diluer les échantillons dont la concentration dépasserait le seuil supérieur de l'intervalle de dosage.

3. Les règles de décision :

Puisque les documents réglementaires relatifs à la validation des méthodes sont à caractères global, ils laissent une place à l'interprétation des analystes qui pourront alors choisir la règle de décision qui permettra de déclarer valide une méthode d'analyse. On distingue :

1. L'approche descriptive.
2. L'approche de différence.
3. L'approche d'équivalence.
4. L'approche erreur totale ou profil d'exactitude.

On s'intéresse à l'approche d'erreur totale ou profil d'exactitude qui est une règle de décision, à la fois pratique et visuelle, la nouvelle stratégie de la SFSTP.

4. Profil d'exactitude :

4.1. Méthode du profil d'exactitude :

La validation de méthodes par profil d'exactitude, est une méthode basée sur l'estimation d'un intervalle, dans lequel se situe le résultat d'un dosage, et de vérifier qu'il ne sorte pas des limites fixés.

Pour représenter schématiquement cette validation de méthode d'analyse, il faut définir le pourcentage $\beta\%$ des résultats qui doivent se trouver dans les limites $-\lambda +\lambda$, définir les limites $-\lambda +\lambda$ et les concentrations de validation. Il est recherché un intervalle dans lequel se situe $\beta\%$ des résultats, obtenu par une méthode, dans un laboratoire donné, à une concentration définie. Cet intervalle est l'intervalle de confiance estimé, contenant $\beta\%$ des résultats, représentant l'exactitude de la méthode de dosage. La confrontation entre les limites définies $-\lambda +\lambda$ et les limites de cet intervalle de confiance, aux différentes concentrations étudiées, est appelé un profil d'exactitude et permet de prendre la décision de validation ou non de la méthode dans un laboratoire.

Le profil d'exactitude permet une représentation visuelle des performances futures de la procédure et son utilisation 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.

4.2. Critères de validation et intervalles de tolérance :

A. Justesse et fidélité par niveau :

La justesse et la fidélité d'une méthode pouvaient dépendre du niveau de concentration de l'analyte. Il serait donc incorrect de calculer une valeur unique représentant la totalité des mesures obtenues par cette méthode, comme les approches classiques de validation le conseillent généralement.

La méthode du profil d'exactitude propose de déterminer la justesse et la fidélité de la méthode en calculant les critères suivants pour chaque niveau de concentration étudié:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J X_{ij}}{I \times J} \text{Concentration introduite moyenne.}$$

$$\bar{Z} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J Z_{ij}}{I \times J} \text{Concentration calculée moyenne.}$$

$$S_r = \sqrt{\text{SCEr} / (I(J-1))} \text{Ecart-type de répétabilité.}$$

$$S_B = \sqrt{\frac{\text{SCEb} - S_r^2}{I-1}} \text{Ecart-type inter-séries.}$$

$$S_{FI} = \sqrt{S_B^2 + S_r^2} \text{Ecart-type de fidélité intermédiaire.}$$

$$CV_{FI} = \frac{S_{FI}}{\bar{X}} \times 100 \text{Coefficient de variation de fidélité intermédiaire.}$$

$$\frac{\bar{Z}}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{Taux de recouvrement moyen.}$$

Avec : SCEr: la somme des carrés des écarts résiduelle.

SCEB : la somme des carrés des écarts inter-séries.

X : la valeur de référence de l'échantillon étudié.

Z : la valeur moyenne de mesurages répétés sur ce même échantillon.

I : le nombre de séries.

J : le nombre de répétitions par série.

Les valeurs des critères calculés ne doivent pas être interprétées pour juger de la validité de la méthode analytique. En effet, le profil d'exactitude regroupe les notions de justesse et de fidélité dans le concept d'exactitude. On calcule ainsi l'intervalle de tolérance des valeurs par niveau de concentration, en utilisant les critères calculés précédemment.

B. Intervalle de tolérance par niveau :

Il s'agit d'un intervalle dans lequel on est capable de prédire que se trouve en moyenne une proportion connue de mesures.

Cet intervalle peut être calculé de plusieurs façons, et la commission SFSTP a retenu la méthode de calcul proposée par Mee.

On appelle β la proportion attendue de résultats futurs.

L'intervalle de tolérance (IT) est calculé pour chaque niveau de concentration selon la formule suivante : [biais % - $Q_t \times S_{IT}$, biais% + $Q_t \times S_{IT}$] Intervalle de tolérance.

Les coefficients intervenant dans cette formule sont calculés comme suit :

$$B = \sqrt{\frac{R+1}{J \times R+1}} \quad \text{Coefficient B.}$$

$$R = \frac{S_B^2}{S_r^2} \quad \text{Coefficient R.}$$

$$S_{IT} = S_{FI} \times \sqrt{1 + \frac{1}{IJ \times B^2}} \quad \text{Ecart-type de l'IT.}$$

$$Q_t = t_{v, \frac{1+\beta}{2}} \quad \text{Facteur de couverture de l'IT.}$$

Dans le calcul du facteur de couverture de l'intervalle de tolérance, la quantité $t_{v, \frac{1+\beta}{2}}$ représente le quantile de la distribution t de Student pour la probabilité $\frac{1+\beta}{2}$, et v degrés de liberté. Ce nombre de degré de liberté est calculé selon la formule suivante :

$$v = \frac{(R+1)^2}{\frac{(R+1)^2 - 1}{I-1} + I} \quad \text{Nombre de degrés de liberté.}$$

Le coefficient R représente le rapport des variances inter-séries et intra-série, et traduit l'importance relative de l'effet de la série. Ainsi, si la méthode étudiée comporte un effet série peu marqué, ces deux variances seront proches, le coefficient R sera proche de 1 et aura donc peu d'impact dans les calculs. En revanche, dans le cas d'une méthode présentant un effet série important, la variance inter-séries va augmenter et le coefficient R également. Ceci aura une conséquence importante dans le calcul du nombre de degrés de liberté, qui va être diminué. Or, plus le degré de liberté est petit, plus le facteur de couverture Q_t va être élevé, ce qui induira un élargissement de l'intervalle de tolérance.

Une fois les calculs des coefficients effectués, on peut calculer les limites haute et basse de l'intervalle de tolérance par niveau selon l'équation Intervalle de tolérance qui vont nous permettre de construire le profil d'exactitude de la méthode.

4.3. Construction du profil d'exactitude et interprétation des résultats :

Une 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 ;
- les taux de recouvrement moyens ;
- les limites d'acceptabilité relatives haute et basse.

L'interprétation du profil d'exactitude présenté à la Figure 7 est simple. 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 β choisie (en général 80%) : la méthode reste valide.

Dans le cas de la Figure 7, 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 β 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 7, le domaine de validité de la méthode est donc compris entre les niveaux de concentration 70 % et 140 %.

La Figure 7 montre également d'autres informations à partir desquels nous pouvons effectuer un certain nombre de diagnostics pour la méthode correspondante.

Tout d'abord, on note que le biais varie en fonction de la concentration. Il passe de +2 % à -2 % environ entre les niveaux de concentration 60 et 140%. Les biais de justesse pouvant être à l'origine de ce phénomène, il serait intéressant de l'étudier.

Comme attendu, on remarque que la fidélité augmente avec la concentration, conduisant à un profil d'exactitude élargi à la plus faible concentration, et qui se rétrécit quand celle-ci augmente.

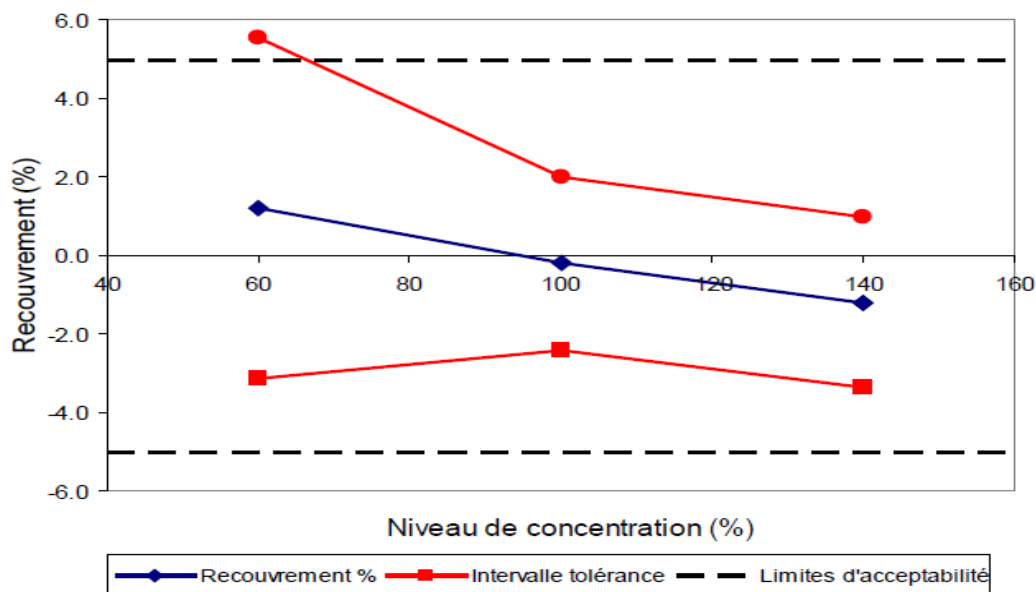


Figure 7: Profil d'exactitude.

4.4. La limite de quantification :

Il existe une concentration à partir de laquelle au moins une des bornes de l'intervalle de tolérance coupe une des limites d'acceptabilité. Au-dessus de ce seuil, l'analyste peut garantir que la méthode produira une proportion de résultats au moins

égale à β . Selon les règles de décision proposées, la méthode est donc valide puisqu'elle permet de garantir les objectifs fixés. En revanche, en dessous de ce seuil, il n'est plus possible de conclure à la validité. Tout naturellement, on peut proposer de définir ce seuil comme la limite de quantification (LQ) de la méthode.

Ainsi, par définition, quand elle 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 ces deux limites, 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.

Lorsqu'il est nécessaire d'avoir une très bonne estimation de la limite de quantification, il est judicieux d'utiliser un plan de validation avec au minimum $K=4$ niveaux. Les deux niveaux les plus bas doivent alors être choisis de façon à encadrer au plus près la LQ supposée. L'interpolation sera alors d'autant plus exacte que cet encadrement sera étroit.

La LQ peut être obtenue exactement en calculant l'abscisse du point d'intersection. Mais les calculs doivent être réalisés sur les valeurs absolues des limites d'acceptabilité et de tolérance car le fait de passer aux valeurs relatives, utilisées en pratique pour la représentation graphique du profil, introduit une interpolation hyperbolique. En effet, le calcul des coordonnées du point d'intersection de deux droites est un problème d'algèbre bien connu.

Enfin, il nous paraît encore important d'insister sur le fait que la phase de validation est l'étape ultime avant la mise en exploitation de la procédure analytique, permettant non seulement d'estimer raisonnablement ses performances (critères) dans les conditions attendues d'utilisation, mais aussi et surtout de vérifier sur la base de ces performances son aptitude à quantifier à l'avenir chaque échantillon inconnu qu'elle aura à doser.

Une seule décision doit être prise : la procédure analytique est considérée valide ou pas, et donc un seul statistique doit supporter cette décision. C'est le rôle joué par le profil d'exactitude. Par conséquent, l'interprétation est analytiquement aisée et l'ensemble des statistiques utiles et requises sont intégrées, à savoir, justesse, fidélité, limites de quantifications, risque, linéarité.

C'est l'intention de SFSTP 2003/2006, elle ne simplifie pas seulement la démarche d'analyse des données, mais plus encore, elle rend les statistiques appropriées et cohérentes avec l'objectif de la validation.

Dans l'approche présentée ici, seule la qualité des résultats futurs compte parce que c'est précisément l'objectif d'une procédure analytique de rendre des résultats, pas des statistiques.

De plus, si on peut prouver que les résultats sont « bons » alors ceux-ci ne peuvent être obtenus qu'avec une « bonne » procédure. C'est certain.

La conséquence fondamentale et pratique est que si l'on peut montrer, par l'usage du profil d'exactitude, que les résultats sont de qualité, alors, de façon automatique, tous les critères de performances qui doivent être calculés et rapportés pour satisfaire aux exigences réglementaires, seront satisfait également. Le bénéfice est donc double : comprendre la qualité des résultats et satisfaire aux exigences réglementaires.

Finalement, cette approche s'applique à tous les types de procédures analytiques. Il n'y a en effet aucune raison pour que la façon d'évaluer les résultats d'une procédure quantitative soit différente selon la nature même de la procédure, physico chimique ou biologique. Certains aspects techniques peuvent varier, comme les fonctions de réponses, mais en fin de compte, le point d'arrivé est identique : le profil d'exactitude des résultats.

La SFSTP insiste sur la nécessité de la validation, qu'elle doit toujours intervenir après le développement de la méthode puisque si on essaie de conduire les essais avec une méthode encore mal connue, on risque d'avoir de sérieuses déconvenues ; et on pourrait alors conclure à son inefficacité.

Cependant ce guide n'a ni expliqué et ni détailler le choix de l'algorithme dans le calcul. [19], [20], [21], [22]

V. Validation analytique selon l'USP chapitres <1225> et <1226>

1. Introduction :

L'USP-NF est une combinaison de deux compendiums, l'United States Pharmacopeia (USP) et le National Formulary (NF). Il contient des normes pour les médicaments, les formes posologiques, les substances médicamenteuses, les

excipients, les produits biologiques, les préparations composées, les dispositifs médicaux, les compléments alimentaires et d'autres produits thérapeutiques.

La version actuelle des normes USP-NF jugées officielles par l'USP est exécutoire par la Food and Drug Administration des États-Unis pour les médicaments fabriqués et commercialisés aux États-Unis. L'USP 41-NF 36 devient officielle le 1^{er} mai 2018.[23]

2. Chapitre <1225> : Validation des méthodes officinales :

Ce chapitre fournit des informations générales sur les caractéristiques qui doivent être pris en considération pour diverses catégories d'essai et sur la documentation devant accompagner les procédures analytiques soumis pour inclusion dans USP-NF.

2.1. Définition de la validation d'une méthode :

La validation d'une procédure d'analyse est le processus par lequel il est établi, en moyen d'études de laboratoire, que les caractéristiques de performance d'une méthode satisfont aux exigences de ses applications analytiques prévues.

2.2. Caractéristiques de la validation d'une méthode :

Les caractéristiques qui doivent être pris en compte dans la validation analytiques sont :

- Exactitude.
- Fidélité.
- Spécificité.
- Linéarité.
- Intervalle de validité.
- Limite de détection.
- Limite de quantification.
- Robustesse.

Leurs définitions se réfèrent aux « résultats de test ». La description de la procédure d'analyse doit définir ce que les résultats des tests pour la procédure sont comme il est indiqué dans la norme ISO 5725-1 et 3534-1, un résultat de test est « la valeur d'une caractéristique obtenue en mettant en œuvre une méthode d'essai spécifiée. La méthode d'essai devrait spécifier que l'un ou un certain nombre de mesures

individuelles être faite, et leur moyenne, ou une autre fonction appropriée (telle que la médiane ou l'écart type), être rapporté comme le résultat du test. Il peut également exiger des corrections standards à appliquer, telles que la correction des volumes de gaz à température et pression normales. Ainsi, un résultat de test peut être un résultat calculé à partir de plusieurs valeurs observées. Dans le cas simple, le résultat du test est la valeur observée lui-même».

Un résultat de test peut également être, mais pas nécessairement, la valeur finale à déclarer qui serait comparée aux critères d'acceptation d'une spécification.

La validation des méthodes de propriété physique peut impliquer l'évaluation des modèles chimiométriques. Cependant, les caractéristiques analytiques typiques utilisées dans la validation des méthodes peuvent être appliquées aux méthodes dérivées de l'utilisation des modèles chimiométriques.

Les effets des conditions de traitement et le potentiel de ségrégation des matériaux devraient être pris en compte lors de l'obtention d'un échantillon représentatif à utiliser pour la validation des procédures.

Dans le cas des procédures officinales, une revalidation peut être nécessaire dans les cas suivants: une soumission à l'USP d'une procédure analytique révisée ou l'utilisation d'une procédure générale établie avec un nouveau produit ou une matière première.

2.2.1.Exactitude :

2.2.1.1. Définition :

L'exactitude d'une procédure d'analyse est la proximité des résultats des tests obtenus par cette procédure à la valeur réelle. La précision d'une procédure d'analyse doit être établie dans toute sa gamme. Cette définition correspond seulement à non biaisé.

2.2.1.2. Détermination :

Dans le cas du dosage d'une substance médicamenteuse, l'exactitude peut être déterminée par l'application de la procédure à un analyte de pureté connue (par exemple, un étalon de référence) ou par comparaison des résultats de la procédure avec ceux d'une seconde procédure bien caractérisée, dont l'exactitude a été énoncée ou définie.

Dans le cas du dosage d'un médicament dans un produit formulé, l'exactitude peut être déterminée par l'application de la procédure analytique à des mélanges synthétiques des composants du produit médicamenteux auxquels des quantités connues d'analyte ont été ajoutées au sein de la gamme de la procédure. S'il n'est pas possible d'obtenir des échantillons de tous les composants du produit médicamenteux, il peut être acceptable d'ajouter des quantités connues de l'analyte au produit médicamenteux ou de comparer les résultats d'une seconde procédure bien caractérisée, dont l'exactitude a été énoncée ou définie.

Dans le cas d'une analyse quantitative des impuretés, l'exactitude doit être évaluée sur des échantillons (de la substance médicamenteuse ou du produit médicamenteux) dopés avec des quantités connues d'impuretés. Lorsqu'il est impossible d'obtenir des échantillons de certaines impuretés ou des produits de dégradation, les résultats doivent être comparés à ceux obtenus par une procédure indépendante. En l'absence d'autres informations, il peut être nécessaire de calculer la quantité d'une impureté sur la base de la comparaison de la réponse à celle de la substance médicamenteuse; le rapport entre les réponses des quantités égales de l'impureté et de la substance médicamenteuse (facteur de réponse relatif) doit être utilisé, s'il est connu.

L'exactitude est calculée comme le pourcentage de recouvrement par le dosage de la quantité ajoutée connue d'analyte dans l'échantillon, ou comme la différence entre la moyenne et la valeur réelle acceptée, avec des intervalles de confiance.

L'évaluation de l'exactitude peut être réalisée dans une variété de façons, y compris l'évaluation de la récupération de la substance à analyser (pourcentage de récupération) à travers l'intervalle de dosage, ou l'évaluation de la linéarité de la relation entre les concentrations estimées et réelles. Le critère statistiquement préféré est que l'intervalle de confiance pour la pente soit contenu dans un intervalle d'environ 1,0, ou alternativement, que la pente soit proche de 1,0. Dans les deux cas, il faut spécifier l'intervalle ou la définition de la proximité dans le protocole de validation. Le critère d'acceptation dépendra du dosage et de sa variabilité et du produit. La définition d'un critère d'acceptation fondé sur l'absence de signification statistique du test de l'hypothèse nulle que la pente est de 1,0 n'est pas une approche acceptable.

L'exactitude des méthodes de propriétés physiques peut être évaluée par l'analyse des matériaux de référence standard, ou bien, la pertinence des approches ci-dessus peut être considérée au cas par cas.

2.2.2. Fidélité :

2.2.2.1. Définition :

La fidélité d'une méthode d'analyse est le degré de concordance entre les résultats des tests individuels lorsque la procédure est appliquée de manière répétée à plusieurs échantillons d'un échantillon homogène. La fidélité d'une méthode d'analyse est habituellement exprimée par l'écart type ou écart type relatif (coefficient de variation) d'une série de mesures. La fidélité peut être une mesure du degré de reproductibilité ou de la répétabilité de la procédure analytique dans des conditions normales de fonctionnement. Dans ce contexte, la reproductibilité fait référence à l'utilisation de la procédure d'analyse dans des laboratoires différents, comme dans une étude collaborative. La fidélité intermédiaire exprime la variation intra-laboratoire, comme sur différents jours, ou avec différents analystes ou de l'équipement dans le même laboratoire. Répétabilité se réfère à l'utilisation de la procédure analytique dans un laboratoire sur une courte période de temps en utilisant le même analyste avec le même équipement.

2.2.2.2. Détermination :

La fidélité d'une méthode d'analyse est déterminé par le dosage d'un nombre suffisant de parties aliquotes d'un échantillon homogène pour pouvoir calculer les estimations statistiquement valides d'écart-type ou l'écart type relatif (coefficient de variation). Les analyses dans ce contexte sont des analyses indépendantes des échantillons qui ont été effectuées par la procédure d'analyse complète de la préparation de l'échantillon au résultat de test final.

2.2.3. Spécificité :

2.2.3.1. Définition :

La spécificité est la capacité d'une méthode à évaluer sans équivoque, l'analyte en présence de composants attendus tels que des impuretés, des produits de dégradation, d'autres ingrédients et d'autres interférences possibles de la matrice.

Pour les tests décrits ci-dessous, la définition ci-dessus a les implications suivantes :

- **Tests d'identification:** Assurer l'identité de l'analyte.
- **Tests de pureté:** Assurez-vous que toutes les procédures analytiques effectuées permettent une déclaration précise de la teneur en impuretés d'un analyte (par exemple, test de substances apparentées, limite de métaux lourds ou impuretés organiques volatiles).
- **Dosage :** Fournir un résultat exact, ce qui permet une déclaration précise sur le contenu ou la puissance de l'analyte dans un échantillon.

2.2.3.2. *Détermination :*

- **Dans le cas de l'analyse qualitative (tests d'identification),** la capacité à choisir entre des composés de structure étroitement apparentée susceptibles d'être présents doit être démontrée. Cela devrait être confirmé en obtenant des résultats positifs(peut-être par comparaison à un matériau de référence connu) à partir d'échantillons contenant l'analyte, couplé avec des résultats négatifs d'échantillons ne contenant pas l'analyte et en confirmant qu'une réponse positive n'est pas obtenue à partir de matériaux structurellement similaire à ou proche de l'analyte.
- **Dans le cas des procédures analytiques pour les impuretés,** la spécificité peut être établie en dopant la substance ou le produit pharmaceutique avec des niveaux appropriés d'impuretés et en démontrant que ces impuretés sont déterminées avec une exactitude appropriée et fidélité.
- **Dans le cas du dosage,** la démonstration de spécificité exige que l'on puisse démontrer que la procédure n'est pas affectée par présence d'impuretés ou d'excipients. En pratique, cela peut être fait en ajoutant la substance ou le produit pharmaceutique à des niveaux appropriés d'impuretés ou d'excipients et en démontrant que le résultat du test n'est pas affecté par la présence de ces substances étrangères.

Si des étalons d'impuretés ou de produits de dégradation ne sont pas disponibles, la spécificité peut être démontrée en comparant les résultats d'essai d'échantillons contenant des impuretés ou des produits de dégradation à une seconde procédure bien caractérisée (par exemple une procédure pharmacopée ou autre validée). Ces comparaisons doivent inclure des échantillons stockés dans des conditions de

contrainte appropriées (par exemple, la lumière, la chaleur, l'humidité, l'hydrolyse acide / base et l'oxydation). Dans le cas du test, les résultats doivent être comparés; dans le cas d'essais d'impuretés chromatographiques, les profils d'impuretés doivent être comparés.

2.2.4. Limite de détection :

2.2.4.1. Définition :

La limite de détection est une caractéristique des tests limites. C'est la plus petite quantité d'analyte dans un échantillon qui peut être détecté, mais pas nécessairement quantifié, dans les conditions expérimentales indiquées. Ainsi, les tests limites ne font que confirmer que la quantité d'analyte est supérieure ou inférieure à un certain niveau. La limite de détection est habituellement exprimée en tant que concentration d'analyte (par exemple, pourcentage ou parties par milliard) dans l'échantillon.

2.2.4.2. Détermination :

- **Pour les procédures non-instrumentale**, la limite de détection est généralement déterminée par l'analyse d'échantillons avec des concentrations connues d'analyte et en établissant le niveau minimum auquel l'analyte peut être détecté de manière fiable.
- **Pour les procédures instrumentales**, la même approche peut être utilisée que pour les procédures non intrusives. Dans le cas de procédures soumises à examen en tant que procédures officinales officielles, il n'est presque jamais nécessaire de déterminer la limite de détection réelle. Au contraire, la limite de détection est montrée suffisamment faible par l'analyse d'échantillons avec des concentrations connues d'analyte au-dessus et en dessous du niveau de détection requis.

2.2.5. Limite de quantification :

2.2.5.1. Définition :

La limite de quantification est une caractéristique des dosages quantitatifs pour les faibles niveaux de composés dans les matrices d'échantillons, tels que les impuretés dans les substances médicamenteuses en vrac et les produits de dégradation dans les produits pharmaceutiques finis. C'est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être déterminé avec une fidélité et une exactitude acceptables

dans les conditions expérimentales indiquées. La limite de quantification est exprimée en tant que concentration d'analyte (par exemple, pourcentage ou parties par milliard) dans l'échantillon.

2.2.5.2. Détermination :

- **Pour les procédures non instrumentales**, la limite de quantification est généralement déterminée par l'analyse d'échantillons avec des concentrations connues d'analyte et en établissant le niveau minimum à partir duquel l'analyte peut être déterminée à l'aide acceptable Précision et Précision.
- **Pour les procédures instrumentales**, la même approche peut être utilisée que pour les procédures non instrumentales. Dans le cas des procédures soumises à l'examen des procédures officinales officielles, il n'est presque jamais nécessaire de déterminer la limite de quantification réelle. Au contraire, la limite de quantification est montrée suffisamment faible par l'analyse d'échantillons avec des concentrations connues de l'analyte au-dessus et au-dessous du niveau de quantification.

2.2.6. linéarité et gamme :

2.2.6.1. Définition de linéarité :

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à obtenir des résultats de test qui sont directement, ou par une transformation mathématique bien définie, proportionnelle à la concentration de substance à analyser dans des échantillons à l'intérieur d'un intervalle donnée. Ainsi, dans cette section, « linéarité » fait référence à la linéarité de la relation entre la concentration et la mesure du dosage. Dans certains cas, pour atteindre la linéarité, la concentration et / ou la mesure peut être transformé. Les facteurs de pondération utilisés dans l'analyse de régression peuvent changer lorsque la transformation est appliquée. Transformations possibles peuvent inclure log, racine carrée, ou réciproque, bien que d'autres transformations soient acceptables. Si la linéarité n'est pas réalisable, un modèle non linéaire peut être utilisé. L'objectif est d'avoir un modèle, que ce soit linéaire ou non linéaire, qui décrit de près la relation dose-réponse.

2.2.6.2. Définition de la gamme :

La gamme d'une méthode d'analyse est l'intervalle entre les niveaux supérieur et inférieur de l'analyte (y compris ces niveaux) qui se sont révélées être déterminée avec un niveau approprié de fidélité, l'exactitude et la linéarité en utilisant la procédure écrite. L'intervalle de validité est normalement exprimé dans les mêmes unités que les résultats des tests (par exemple, pour cent ou parties par million) obtenus par la méthode d'analyse.

2.2.6.3. Détermination de la linéarité et de la gamme :

- **Linéarité** devrait être établie sur toute la gamme de la procédure d'analyse. Il devrait être établi d'abord par un examen visuel d'une parcelle de signaux en fonction de la concentration en analyte de contenu. S'il semble y avoir une relation linéaire, les résultats des tests doivent être établis par des méthodes statistiques appropriées (par exemple par calcul d'une droite de régression par la méthode des moindres carrés). Les données de la droite de régression peuvent être utiles pour fournir des estimations mathématiques du degré de linéarité. Le coefficient de corrélation, l'ordonnée à l'origine, la pente de la droite de régression et la somme résiduelle des carrés doivent être soumis.
- **La gamme** de la procédure est validée en vérifiant que la procédure d'analyse fournit une exactitude acceptable, la fidélité et la linéarité lorsqu'ils sont appliqués à des échantillons contenant l'analyte aux extrémités de la gamme, ainsi que dans l'intervalle.

2.2.7. Robustesse :

La robustesse d'une méthode analytique est une mesure de sa capacité à rester insensible aux variations faibles mais délibérées dans les paramètres de procédure énumérés dans la documentation de la procédure et donne une indication de son aptitude au cours d'une utilisation normale. La robustesse peut être déterminée au cours du développement de la procédure d'analyse.

2.2.8. capacité du système :

Si les mesures sont susceptibles de variations dans les conditions d'analyse, celles-ci doivent être contrôlées de manière appropriée ou une déclaration de précaution doit

être incluse dans la procédure. Une conséquence de l'évaluation de la robustesse et de la robustesse devrait être qu'une série de paramètres d'adéquation du système est établie pour garantir que la validité de la procédure analytique est maintenue chaque fois qu'elle est utilisée. Les variations typiques sont la stabilité des solutions analytiques, des équipements différents et des analystes différents.

Les tests d'adéquation du système reposent sur le concept que l'équipement, l'électronique, les opérations analytiques et les échantillons à analyser constituent un système intégral pouvant être évalué en tant que tel. Les paramètres du test d'adéquation du système à établir pour une procédure particulière dépendent du type de procédure évalué.

2.3. Éléments de données requis pour la validation :

Les exigences d'essai officinales varient de déterminations analytiques hautement précises pour l'évaluation subjective des attributs. Compte tenu de cette grande variété, il est logique que les procédures de tests différents requièrent différents schémas de validation. Les catégories les plus courantes de tests pour lesquels des données de validation devraient être nécessaires sont les suivantes:

Catégorie I : Procédures analytiques pour la quantification des principaux composants des substances médicamenteuses en vrac ou des ingrédients actifs (y compris les conservateurs) dans les produits pharmaceutiques finis.

Catégorie II : Les procédures analytiques pour la détermination des impuretés dans les substances en vrac de médicaments ou de composés de dégradation dans les produits pharmaceutiques finis. Ces procédures comprennent des analyses quantitatives et des tests de limites.

Catégorie III : Les procédures analytiques pour la détermination des caractéristiques de performance (par exemple, la dissolution, la libération du médicament, et autres).

Catégorie IV : Tests d'identification.

Pour chaque catégorie, les différentes informations d'analyse est nécessaire. Le tableau ci-dessous énumère les éléments de données normalement requis pour chacune de ces catégories.

Tableau 2 : Éléments de données requis pour la validation.

Critère de validation	Catégorie I	Catégorie II		Catégorie III	Catégorie IV
		Quantitatif	Tests de limite		
Exactitude	Oui	Oui	a	A	Non
Fidélité	Oui	Oui	Non	Oui	Non
Spécificité	Oui	Oui	Oui	A	Oui
Limite de détection	Non	Non	Oui	A	Non
Limite de quantification	Non	Oui	Non	A	Non
Linéarité	Oui	Oui	Non	A	Non
Intervalle de validité	Oui	Oui	a	A	Non

a : Peut être requis, en fonction de la nature du test spécifique.

Les procédures générales déjà établies doivent être vérifiées pour établir leur aptitude à l'emploi, comme leur exactitude (et l'absence d'interférence possible) lorsqu'ils sont utilisés pour un nouveau produit ou matière première.

Lors de la validation des méthodes de propriétés physiques, prendre en compte les mêmes caractéristiques de performance requises pour toute procédure d'analyse. Évaluer l'utilisation des caractéristiques de performance au cas par cas, dans le but de déterminer que la procédure est adaptée à son utilisation prévue. Les critères d'acceptation spécifiques pour chaque paramètre de validation doivent être compatibles avec l'utilisation prévue de la méthode.

Les méthodes physiques peuvent également être classées dans les quatre catégories de validation. Les mesures des propriétés physiques qualitatives telles que la taille des particules, la surface spécifique, le volume et la masse volumique après tassement, ce qui pourrait affecter les caractéristiques de performance, le meilleur ajustement souvent Catégorie III. Catégorie IV applique généralement à la validation des méthodes spectroscopiques d'identification qualitative. Cependant, les différentes techniques peuvent être utilisées à des fins différentes, et l'utilisation spécifique de la méthode et les caractéristiques du matériau analysé doivent être pris en considération lors de l'application définitive d'une catégorie à un type particulier de méthode.

La validité d'une procédure d'analyse peut être vérifiée que par des études de laboratoire. Par conséquent, la documentation de la réussite de ces études est une exigence fondamentale pour déterminer si une procédure est adaptée à l'application prévue.

3. Chapitre <1226> : Vérification des procédures officinales :

Le but de ce chapitre est de fournir des informations générales sur la vérification des procédures officinales qui sont en cours d'exécution pour la première fois pour obtenir des résultats acceptables en utilisant le personnel, l'équipement et des réactifs disponibles.

Ce chapitre ne vise pas l'application rétroactive aux procédures de laboratoire déjà établies avec succès.

La vérification consiste à évaluer certaines caractéristiques de performance analytique, telles que celles qui sont décrites dans le chapitre <1225>, pour générer des données appropriées et pertinentes plutôt que de répéter le processus de validation.

3.1. Processus de vérification :

Le processus de vérification des procédures d'essai officinales consiste à évaluer si la procédure peut être utilisée aux fins prévues, dans les conditions réelles d'utilisation pour une substance médicamenteuse et / ou une matrice de produit pharmaceutique spécifiées.

Les utilisateurs doivent avoir l'expérience, les connaissances et la formation appropriées pour comprendre et être en mesure d'exécuter les procédures officinales telles que rédigées. La vérification doit être effectuée par l'utilisateur de manière à ce que les résultats donnent l'assurance que la procédure officinale fonctionnera comme prévu.

Si la vérification de la procédure officinale échoue et que l'assistance du personnel de l'USP n'a pas résolu le problème, on peut conclure que la procédure peut ne pas convenir à l'article testé dans ce laboratoire. Il peut alors être nécessaire d'élaborer et de valider une autre procédure. La procédure alternative peut être soumise à l'USP, avec les données appropriées, à l'appui d'une proposition d'inclusion ou de remplacement de la procédure officinale actuelle.

3.2. Exigences de vérification :

Les exigences de vérification devraient être fondées sur une évaluation de la complexité de la procédure et la matière à laquelle la procédure est appliquée. Bien qu'une revalidation complète d'une méthode officinale ne soit pas nécessaire pour vérifier la pertinence d'une procédure dans des conditions d'utilisation réelles, certaines des caractéristiques de performance analytique énumérées dans le tableau ci-dessus, peuvent être utilisées pour le processus de vérification. Seules les caractéristiques considérées comme appropriées pour la vérification de la procédure particulière doivent être évaluées. Le processus d'évaluation de la pertinence d'une procédure analytique officinale dans les conditions d'utilisation réelle peut ou non exiger des performances réelles de laboratoire de chaque caractéristique de validation analytique.

Le degré et l'étendue du processus de vérification peuvent dépendre du niveau de formation et de l'expérience de l'utilisateur, sur le type de procédure et son équipement ou instrumentation associé, sur les étapes procédurales spécifiques, et sur quel (s) article (s) sont testés.

La vérification doit déterminer si la procédure officinale convient à la substance médicamenteuse et / ou la matrice de médicament, compte tenu de la voie de synthèse de la substance médicamenteuse, la méthode de fabrication du médicament, ou les deux, le cas échéant. La vérification devrait inclure une évaluation des éléments tels que l'effet de la matrice sur la récupération des impuretés et des substances médicamenteuses de la matrice du produit pharmaceutique, ainsi que la pertinence des conditions chromatographiques et de la colonne, la pertinence de la réponse du signal du détecteur, etc.

À titre d'exemple, une évaluation de la spécificité est un paramètre clé pour vérifier qu'une procédure officinale est appropriée pour l'analyse de substances médicamenteuses et de produits médicamenteux. Par exemple, une spécificité acceptable pour une méthode chromatographique peut être vérifiée par conformité aux exigences de résolution d'adéquation du système (si spécifié dans la procédure). Cependant, les substances médicamenteuses de différents fournisseurs peuvent avoir différents profils d'impuretés qui ne sont pas traités par la procédure d'essai officinale. De même, les excipients d'un produit médicamenteux peuvent varier

considérablement d'un fabricant à l'autre et avoir le potentiel d'interférer directement avec la procédure ou provoquer la formation d'impuretés qui ne sont pas traitées par la procédure officinale. De plus, les médicaments contenant différents excipients, antioxydants, tampons ou extraits de contenants peuvent affecter la récupération de la substance médicamenteuse de la matrice. Dans ces cas, une évaluation plus approfondie des effets de la matrice peut être nécessaire pour démontrer la pertinence de la procédure pour la substance ou le produit médicamenteux particulier. D'autres caractéristiques de performance analytique telles qu'une évaluation de la limite de détection ou de quantification et une précision pour les procédures d'impuretés peuvent être utiles pour démontrer l'adéquation de la procédure officinale dans les conditions d'utilisation réelles.

La vérification n'est pas requise pour les procédures d'essai officinales de base qui sont effectuées de façon routinière à moins qu'il n'y ait une indication que la procédure officinale n'est pas appropriée pour l'article testé. Des exemples de procédures officinales de base incluent, mais ne sont pas limités à, la perte sur le séchage, le résidu à l'allumage, diverses procédures chimiques humides telles que la valeur d'acide et les déterminations instrumentales simples telles que les mesures de pH. Cependant, pour l'application de procédures de routine déjà établies à des articles officinaux testés pour la première fois, il est recommandé de prendre en considération toute exigence de manipulation d'échantillon ou de préparation de solution nouvelle ou différente. [24]

Conclusion

Conclusion

Les autorités réglementaires attendent de la part des laboratoires de contrôle des garanties que chaque mesure qui sera réalisée ultérieurement en routine, sera suffisamment proche de la "vraie valeur" inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable. En d'autres termes ce que tout le monde attend d'une procédure analytique c'est que la différence entre le résultat rendu et la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon, qui par ailleurs restera toujours inconnue, soit petite ou du moins inférieure à une limite d'acceptation.

Pour apporter la preuve que la procédure analytique peut atteindre les objectifs fixés, la validation est une étape importante de son cycle de vie. Fautes de directives claires pour la méthodologie à suivre pour décider correctement quand une méthode peut être considérée comme valide. L'analyste a la responsabilité de choisir l'approche méthodologique non pas la plus simple mais celle qui lui permettra d'atteindre les objectifs qu'il s'est fixé. Cette situation a conduit à l'utilisation de trois approches ICH Q2R1, STP 1992 et STP 2003-2006.

Selon *Journal of Chromatography A, Volume 1217, Issue 19, 7 May 2010, Pages 3180-3192* Les méthodologies classiques tel que ICH Q2R1, STP 1992 donnent lieu à des conclusions insuffisantes et contradictoires qui ne leur permettent pas de répondre adéquatement aux objectifs de la validation de méthode. Il est constaté que la méthodologie de validation qui donne le plus de garanties quant à la fiabilité ou la pertinence de la décision de considérer une méthode comme valide est celle qui est basée sur l'utilisation du profil d'exactitude à savoir STP 2003-2006.

L'engagement des laboratoires de contrôles qualités et de développements pharmaceutiques pour l'USP doit être prudent et modéré car la validation de ces procédures se fait premièrement avec une méthodologie classique, secondairement selon le chapitre 1225 et 1226 de l'USP l'analyste n'est pas tenu de valider les procédures USP néanmoins il lui est demandé de vérifier leur adéquation dans les conditions d'utilisation réelles, ainsi la méthodologie à suivre pour atteindre cette vérification n'est pas totalement documenté par cette dernière seuls quelques exemples sont cités. La responsabilité incombe totalement à l'utilisateur, donc c'est à l'utilisateur de veiller à ce que la procédure analytique réponde aux objectifs fixés.

Il est important de rappeler que les différentes approches méthodologiques ne peuvent régler les problèmes de routines par exemple la qualité de l'étalonnage selon référence 2, ainsi que la validité d'une séquence d'analyse, l'analyste certes disposera d'une procédure validée mais son application correcte et le suivi de la performance de celle-ci incombe à l'analyste.

Finalement les autorités réglementaires doivent harmoniser l'approche méthodologique de la validation pour tous les opérateurs industriels, en élaborant des guides avec des algorithmes spécifiques ou plus simplement demander l'application de guide proposé par des sociétés savantes. [38], [39]

Bibliographie

[4] J. Caporal-Gautier, J.M. Nivet, P. Algranti, M. Guilloteau, M. Histe, M. Lallier, J.J. N'guyen-Huu, R. Russoto. - *Guide de validation analytique : Rapport d'une commission SFSTP. –I. Méthodologie*, 205-226, 1992.

[5] ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION ANALITICAL PROCEDURE : *texte et méthodologie Q2 (R1) novembre 2006*.

[30] l'ICH Validation des méthodes d'analyse : *Texte et méthodologie Ligne directrice Q2(R1)*, Santé Canada.

[31] SIAVELIS Armand, *Analyse des différentes approches de validation de méthodes de dosage et proposition d'un guide de validation de méthode de dosage en pharmacie hospitalière*, THÈSE pour l'obtention du Diplôme d'état de docteur en pharmacie, université Angers, 2014/2015.

[32] Max Feinberg –*VALIDATION DES METHODES D'ANALYSE- une approche de l'assurance qualité au laboratoire*, 2004.

[33] Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg,, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat - *Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches- Rapport d'une Commission SFSTP (101-138),STP PHARMA PRATIQUES - volume 13 - N° 3 - mai/juin 2003*.

[34] P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat. *Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches Partie II – Statistiques, Rapport d'une Commission SFSTP, (28-58), STP PHARMA PRATIQUES - volume 16 - N° 1 - janvier/février 2006*.

[35] Feinberg M., *Labo-stat, Guide de validation des méthodes d'analyse*. s.l: Editions Lavoisier, 2009, 384 pages.

[36] ISABELLE PINGUET *Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie*, THÈSE pour l'obtention du Diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Bordeaux 2015/2016.

[37]<https://www.tsoshop.co.uk/Medicine/Pharmacopoeia/United-States/Pharmacopoeia/?DI=64849>, consulter le 21/05/18

[38] *The United States Pharmacopoeial Convention.USP 41 NF 36. General Information / chapters <1225> ; <1226> (7665-7672)*, 2018.

[39] *Journal of Chromatography A, Volume 1217, Issue 19, 7 May 2010, Pages 3180-3192Critical analysis of several analytical method validation strategies in the framework of the fit for purpose concept*

[40] *Technique de l'ingénieur article P 224.1 auteur Max Feinberg*

Bellaq46@gmail.com

gheribikhadidja.25@gmail.com

Résumé :

Une méthode ou Procédure d'analyse est une description détaillée des différentes opérations nécessaires pour effectuer l'analyse de la substance à examiner.

La mise en œuvre d'une méthode se décompose en quatre grandes phases successives : une phase de sélection, une phase de développement et optimisation, une phase de validation (Validation Interne/Externe) et une phase d'application en routine.

La validation des méthodes d'analyse est aujourd'hui un objectif important et omniprésent avec la mise en place des systèmes d'assurance qualité dans les laboratoires. Elle est définie dans plusieurs guides réglementaires internationaux comme la FDA, ICH, ISO, GMPc...etc. Ces derniers définissent les critères de validation à tester (Spécificité ou sélectivité, Linéarité, Justesse, Fidélité, Répétabilité et Fidélité intermédiaire, Exactitude, Limite de détection, Limite de quantification, Intervalle de dosage, sensibilité) mais ne proposent pas des approches expérimentales.

L'ICH présente une liste de critères de performance devant permettre la validation d'une méthode d'analyse, leurs définitions, et un mode de calcul de ces critères très sommaire, basé sur un nombre minimal de séries d'essais et de concentrations sans préciser comment préparer ces échantillons.

Pour ces raisons, plusieurs méthodologies pratiques ont été proposées afin d'aider les analystes à valider leurs procédures d'analyse. SFSTP pharma 1992 était le premier document qui permettait à l'analyste de disposer d'une méthodologie concrète pour : préparer un protocole de validation, appliquer une méthodologie statistique et aider à la décision, et ainsi répondre, aux différents critères de validation.

SFSTP pharma 2003 a introduit une nouvelle stratégie de validation basée sur le profil d'exactitude qui est en parfait accord avec l'objectif d'une méthode analytique, à savoir sa capacité de quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues qu'un laboratoire aura à déterminer.

Une seconde partie du guide SFSTP Pharma 2006 développe l'ensemble des calculs statistiques avec un exemple concret, nécessaires à l'implémentation des concepts présentés dans la partie 1 du guide.

On a exposé aussi la méthodologie de la validation des méthodes analytique suivant la pharmacopée des états unis (USP) selon les chapitres 1225 et 1226.

Abstract:

A method or procedure of analysis is a detailed description of the different operations necessary to perform the analysis of the substance to be examined.

The implementation of a method is broken down into four major successive phases: a selection phase, a development and optimization phase, a validation phase (Internal / External Validation) and a routine application phase.

The validation of analytical methods is today an important and ubiquitous objective with the implementation of quality assurance systems in laboratories. It is defined in several international regulatory guides such as the FDA, ICH, ISO, GMPc ... etc. These define the validation criteria to be tested (specificity or selectivity, linearity,

accuracy, fidelity, repeatability and intermediate fidelity, accuracy, limit of detection, limit of quantification, dosing interval, sensitivity) but do not propose experimental approaches.

The ICH presents a list of performance criteria for the validation of an analytical method, their definitions, and a very summary method of calculating these criteria, based on a minimum number of test series and concentrations without specify how to prepare these samples.

For these reasons, several practical methodologies have been proposed to help analysts validate their analysis procedures. SFSTP pharma 1992 was the first document that allowed the analyst to have a concrete methodology to: prepare a validation protocol, apply a statistical methodology and help the decision, and thus meet the different validation criteria. SFSTP pharma 2003 has introduced a new validation strategy based on the accuracy profile that is in perfect agreement with the goal of an analytical method, namely its ability to quantify as accurately as possible each of the unknown quantities that a laboratory will have to determine. A second part of the SFSTP Pharma 2006 guide develops all the statistical calculations with a concrete example, necessary for the implementation of the concepts presented in part 1 of the guide.

The United States Pharmacopoeia (USP) analytical method validation methodology was also discussed in chapters 1225 and 1226.

ملخص :

طريقة أو إجراء تحليل هو وصف تفصيلي للعمليات المختلفة اللازمة لإجراء تحليل للمادة المراد فحصها. يتم تقسيم تنفيذ الطريقة إلى أربع مراحل رئيسية متتالية: مرحلة الاختبار ، مرحلة التطوير والتحسين ، مرحلة التحقق من الصحة (التحقق الداخلي / الخارجي) ومرحلة التطبيق الروتينية. إن التحقق من الطرق التحليلية هو اليوم هدف هام وواسع الانتشار مع تنفيذ أنظمة ضمان الجودة في المختبرات. يتم تعريفها في العديد من الأدلة التنظيمية الدولية مثل FDA و ICH و ISO و GMPc ... إلخ. تحدد هذه المعايير للتحقق من صحتها (النوعية أو الانتقائية والخطية والدقة والإخلاص والتكرار والإخلاص المتوسط والدقة والحد من الكشف، والحد من القياس الكمي، وفترة الجرعات، والحساسية) ولكن لا تقترح النهج التجريبية. يقدم ICH قائمة بمعايير الأداء للتحقق من طريقة التحليل ، وتعريفاتها ، وطريقة مختصرة للغاية لحساب هذه المعايير ، على أساس الحد الأدنى لعدد سلاسل الاختبار وتركيزاتها دون تحديد كيفية إعداد هذه العينات. لهذه الأسباب ، تم اقتراح العديد من المنهجيات العملية لمساعدة المحللين على التحقق من إجراءات التحليل الخاصة بهم. كانت SFSTP pharma 1992 الوثيقة الأولى التي سمحت للمحلل أن يكون لديه منهجية محددة من أجل: إعداد بروتوكول التحقق ، وتطبيق منهجية إحصائية ومساعدة القرار ، وبالتالي تلبية معايير التحقق المختلفة. طرحت شركة SFSTP pharma 2003 إستراتيجية جديدة للتحقق من الصحة تعتمد على دقة البيانات التي تتفق تمامًا مع هدف طريقة تحليلية، وهي قدرتها على التحديد الدقيق بأكبر قدر ممكن من كل الكميات غير المعروفة التي يتعين على المختبر تحديدها. الجزء الثاني من دليل SFSTP Pharma 2006 يطور جميع الحسابات الإحصائية مع مثال ملموس ، ضروري لتنفيذ المفاهيم الواردة في الجزء الأول من الدليل. كما تمت مناقشة منهجية التحقق من الطرق التحليلية للولايات المتحدة الأمريكية (USP) في الفصلين 1225 و 1226.