

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB – BLIDA 1-

FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE



Dégradation forcée de l'éconazole nitrate

- **Détermination des voies de dégradation**
- **Validation de la méthode indicatrice de la stabilité**

**Mémoire de fin d'études pour le diplôme de docteur en pharmacie
Présenté et soutenu publiquement le 12/07/2022**

Présenté par :

- **HAMIDI Mohammed Ziyad**

Devant le Jury

- **Président de jury Dr H. BENGUERGOURA**
- **Examinatrice Dr K. ARAR**

Encadré par :

- **Dr H. IMOUDACHE**

Maitre-assistant
en chimie minérale

Maître de conférences
en chimie analytique

Maître-assistante en
pharmacognosie

Année universitaire : 2021/2022

Dédicaces

Je souhaite rendre hommage à :

Mes parents en termes de reconnaissance pour leur amour, leur soutien, leurs sacrifices et leurs encouragements.

Mes sœurs Sarah, Amira et Afaf pour leur amour et leurs encouragements.

Mani pour ses prières et ses encouragements.

Mes nièces et mes neveux Tasnim, Takwa, Lyne, Abderrahim et Kacim : ma joie

Toute ma famille : ma fierté

Je vous dois mon succès, je vous dédie ma carrière.

Les mots seuls ne peuvent exprimer l'amour que je porte pour vous.

Remerciements

Nous remercions tout d'abord « ALLAH », le tout puissant de nous avoir donné la volonté, la patience et le courage pour mener à terme ce travail.

Je tiens à témoigner ma sincère gratitude à

Mon directeur de thème Monsieur Hicham IMOUDACHE,

Pour ses conseils précieux, pour m'avoir soutenu.

D'avoir mis à ma disposition tout le nécessaire pour réussir ce travail.

Qu'il trouve ici le témoignage de mon plus profond respect

Madame Hassiba BENGUERGOURA,

Vous me faites l'honneur de présider à ce jury.

Merci pour votre implication dans la chimie analytique.

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Madame K. ARAR,

Vous me faites l'honneur de participer à ce jury.

Merci également pour votre aide et vos conseils tout au long de mes études.

Mes remerciements s'adressent également à

Mes parents,

Merci pour tout. Si je peux écrire ces mots aujourd'hui, c'est grâce à vous.

Mes sœurs,

Grand merci pour votre précieux soutien.

Mes amis de fac et d'ailleurs,

Merci pour tous ces bons moments passés ensemble (6ans dans la faculté de médecine Blida, en cours, en TP, en internat et j'en passe...)

Nos remerciements vont enfin à toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

Partie 1 : théorique

CHAPITRE I : Médicaments et qualité

I-1/Définition.....3

I-2/Conception et développement d'un nouveau médicament.....3

I-3/ Concept du princeps et générique.....5

I-3-1/ Définition des deux notions.....5

I-3-2/Impuretés présentes dans la substance active, importance de la dégradation forcée d'un produit générique.....5

I-4/ Qualité et pureté d'un médicament.....6

I-5/ Aspect réglementaire.....9

CHAPITRE II : Stabilité d'un produit pharmaceutique

II-1/Définition de la stabilité.....13

II-2/ Étude de stabilité.....14

II-3/ Types de stabilité.....15

II-3-1/ Stabilité chimique.....15

II-3-2/ Stabilité physique.....15

II-3-3/ Stabilité microbiologique.....15

II-4/ Facteurs influençant l'intégrité d'un médicament.....16

II-5/ Types d'étude de stabilité.....17

II-5-1/ Etude de stabilité en temps réel.....17

II-5-2/ Etude de stabilité accélérée.....17

II-5-3/ Etude de stabilité intermédiaire.....17

II-5-4/ Objectifs de chaque type d'étude de stabilité.....18

II-6/ Conditions d'études de stabilité.....19

CHAPITRE III : Substances apparentées

III-1/ Définition	20
III-2/ Origine d'impuretés.....	21
III-3/ Classification des impuretés.....	22
III-3-1/ Impuretés organiques.....	22
III-3-2/ Impuretés inorganiques.....	25
III-3-3/ Solvant résiduels.....	26
III-4/ Notion de toxicité.....	27
III-4-1/Toxicité des impuretés organiques.....	27
III-4-2/Toxicité des impuretés inorganiques.....	28
III-4-3/Toxicité des solvants résiduels	30

CHAPITRE IV : Etude de la dégradation forcée

IV-1/Définition.....	32
IV-2/ Types de la dégradation forcée.....	33
IV-2-1 / Dégradation à un pH modifié.....	33
IV-2-2/ Dégradation oxyde.....	34
IV-2-3/ Dégradation thermique.....	35
IV-2-4/ Dégradation par la lumière.....	37
IV-2-5/ Influence de l'humidité sur le produit pharmaceutique	39
IV-3/ Méthode de dosage des produits de dégradation.....	40
IV-3-1/Chromatographie liquide à haute performance.....	40
IV-3-2/ Avantages de l'utilisation de HPLC-DAD pour le dosage des impuretés.....	42
IV-3-3/ Spectrométrie de masse.....	43

CHAPITRE V : Validation d'une méthode analytique

V-1/ Définition.....	45
V-2/ Type de validation.....	47
V-3/ Objectifs de la validation.....	48
V-4/ Les différents types de procédures analytiques à valider.....	48
V-5/ Différents paramètres évalués pour la validation d'une méthode d'analyse (méthodologie).....	50
V-5-1/ Spécificité.....	50
V-5-2/ Linéarité.....	53

Table des matières

V-5-3/ L'intervalle d'utilisation.....	55
V-5-4/ Justesse.....	56
V-5-5/ Fidélité.....	60
V-5-6/ Limite de détection et limite de quantification.....	64
V-5-7/ Robustesse.....	65

Partie expérimentale : Matériels, méthodes et discussion des résultats

VI-1/ Appareils, équipements et verreries.....	68
VI-2/ Réactifs chimiques.....	69
VI-3/ Produit d'essais.....	69
3-1/ PHANAZOL®.....	69
3-2/ Caractérisation physicochimiques et pharmacologiques du nitrate d'éconazole.....	70
VI-4/ Méthodes.....	71
VI-4-1/ Application des conditions de stress sur l'échantillon à analyser.....	71
VI-4-1-1/ Préparation des solutions d'éconazole nitrate à base de crème.....	71
VI-4-1-2/ Préparation des solutions placebo.....	72
VI-4-1-3/ Préparation des solutions à base de la substance active seule.....	72
VI-4-1-4/ Réalisation de la dégradation forcée.....	72
VI-4-1-5/Préparation de la solution témoin d'éconazole nitrate à 10mg/ml.....	73
VI-4-1-6/ Incubation.....	73
VI-4-1-7/ Préparation des solutions reconstituées chargées par les produits de dégradation.....	74
VI-4-2/ Instrumentation et conditions chromatographiques.....	74
VI-4-2-1/ Instrumentation.....	74
VI-4-2-2/ Conditions chromatographiques.....	74
VI-4-3/ Validation de la méthode.....	75
VI-4-3-1/ Principe.....	75
VI-4-3-2/ Mode opératoire.....	76
VI-5/ Résultats et discussion.....	78
IV-5-1/Détermination de la voie de dégradation et évaluation de la sélectivité de la méthode.....	79
VI-5-2/ Validation de la méthode.....	85
VI-5-2-1/ Spécificité.....	85
VI-5-2-2/ Linéarité.....	88
VI-5-2-3/ Exactitude.....	100

Table des matières

VI-5-2-4/ Fidélité.....	106
VI-5-2-5-Limite de détection.....	111
VI-5-2-6-Limite de quantification.....	111
Conclusion.....	115
Annexes	
Résumé	
Références bibliographiques	

Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux objectifs des études de stabilité.....	18
Tableau 2. Les zones climatiques selon l'OMS.....	19
Tableau 3. Exemple de classification d'impuretés théoriques (A, B, C et D) provenant du Paracétamol.....	25
Tableau 4. Affections engendrées par les solvants organiques liquides à usage professionnel.....	31
Tableau 5. Types de méthode d'analyse à valider.....	49
Tableau 6. Exemple d'une étude de spécificité d'une méthode de dosage.....	53
Tableau 7. Résultats de l'étude statistique sur la droite $[Y = f(X)]$	55
Tableau 8. Représentation statistique de trois cas possibles lors des études de justesse.....	60
Tableau 9. Exemple des paramètres évalués pour valider la fidélité d'une méthode de dosage des produits de dégradation.....	63
Tableau 10. Quelques paramètres modifiés pour évaluer la robustesse d'une HPLC.....	66
Tableau 11. Différents types des appareils, équipements et verreries utilisés.....	67
Tableau 12. Conditions de stress appliquées sur les échantillons de travail.....	73
Tableau 13. Description de la constitution de la phase mobile pendant l'analyse.....	75
Tableau 14. Limites d'impuretés non spécifiées d'EN selon l'ICH.....	78
Tableau 15. Intérêts des solutions utilisées dans l'étude de spécificité.....	87
Tableau 16. Réponses chromatographiques suite à l'injection répétée de l'EN seul.....	88
Tableau 17. Réponses chromatographiques suite à l'injection répétée de l'impureté A.....	89
Tableau 18. Réponses chromatographiques suite à l'injection répétée du CBA.....	90
Tableau 19. Paramètre de la linéarité de l'impureté A.....	91
Tableau 20. Homogénéité des variances dans $[0.05\% - 0.3\%]$ du PD A.....	92
Tableau 21. Interprétation des résultats de l'impureté A selon le test de Cochran.....	92
Tableau 22. Test de l'existence d'une pente significative de l'impureté A.....	93
Tableau 23. Interprétation des résultats de l'impureté selon le test de Fisher 1.....	93
Tableau 24. Test de validité de la droite de régression de l'impureté A.....	94
Tableau 25. Interprétation des résultats de l'impureté A selon le test de Fisher 2.....	94
Tableau 26. Test de Student de l'impureté A.....	94
Tableau 27. Récapitulatif de la linéarité de l'impureté A.....	95
Tableau 28. Homogénéité des variances entre 0,05% et 0,3% du CBA.....	97
Tableau 29. Interprétation des résultats du CBA selon le test de Cochran.....	97

Liste des tableaux

Tableau 30. Test de l'existence d'une pente significative du CBA.....	98
Tableau 31. Interprétation des résultats du CBA selon le test de Fisher 1.....	98
Tableau 32. Validité de la droite de régression du CBA.....	98
Tableau 33. Interprétation des résultats du CBA selon le test de Fisher 2.....	99
Tableau 34. Test de Student du CBA.....	99
Tableau 35. Récapitulatif de la linéarité du CBA.....	99
Tableau 36. Résultats des injections répétées de 100% de l'EN.....	100
Tableau 37. Paramètres de l'exactitude de la solution chargée par PD A.....	101
Tableau 38. Homogénéité des variances de recouvrement de l'impureté A.....	101
Tableau 39. Test de l'existence d'une variation intergroupe de l'impureté A.....	102
Tableau 40. Estimation de l'intervalle de confiance de l'impureté A.....	103
Tableau 41. Paramètres de l'exactitude de la solution chargée par CBA.....	104
Tableau 42. Homogénéité des variances de recouvrement du CBA.....	104
Tableau 43. Test de l'existence d'une variation intergroupe du CBA.....	105
Tableau 44. Estimation de l'intervalle de confiance du CBA.....	106
Tableau 45. Résultats des injections répétées de 100% de l'EN.....	106
Tableau 46. Paramètres de la fidélité concernant la solution chargée par PD A.....	107
Tableau 47. Homogénéité des variances de recouvrement de l'impureté A.....	108
Tableau 48. Calcul des coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité de l'impureté A.	108
Tableau 49. Paramètres de la fidélité concernant la solution chargée par CBA.....	109
Tableau 50. Homogénéité des variances de recouvrement du CBA.....	110
Tableau 51. Calcul des coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité du CBA.....	110
Tableau 52. Calcul de la limite de détection de l'impureté A et du CBA.....	111
Tableau 53. Calcul de la limite de quantification de l'impureté A et du CBA.....	112
Tableau 54. Surfaces obtenues après l'injection répétée de 5µg/mL de l'impureté A.....	112
Tableau 55. Surfaces obtenues après l'injection répétée de 4,2 µg/mL du CBA.....	113
Tableau 56. Calcul du facteur de réponse relatif à l'aide des pentes de la linéarité.....	114
Tableau 57. Calcul du facteur de réponse relatif à l'aide des réponses de chaque analyte par rapport aux concentrations injectées.....	114

Liste des figures

Figure 1. Les étapes de la conception d'un médicament.....	4
Figure 2. Diagramme illustrant l'impact des substances, d'équipement et des composants sur l'intégrité finale du produit pharmaceutique.....	22
Figure 3. Seuils des différents types d'impuretés pour les produits finis selon ICH Q3B (R2).....	24
Figure 4. La relation entre la plombémie et son effet sur les enfants et les adultes (d'après <i>Agency for Toxic Substance and Disease Registry</i> , 1990 ; cité dans Inserm, 1999).....	29
Figure 5. L'arbre décisionnel de la dégradation acide/alcaline d'un médicament.....	34
Figure 6. L'arbre décisionnel de la dégradation dans des conditions oxydantes d'un médicament.....	35
Figure 7. Diagramme d'Arrhénius représente l'évolution du logarithme népérien du coefficient de vitesse en fonction de $1/T$	37
Figure 8. L'arbre décisionnel de la dégradation d'un médicament par la lumière.....	39
Figure 9. Exemple d'un graphe d'étalonnage représente les réponses instrumentales (Y) en fonction des concentrations théoriques (X).....	54
Figure 10. Exemple de trois situations possibles illustrant la droite de justesse.....	59
Figure 11. Structure chimique du nitrate d'éconazole nitrate.....	70
Figure 12. Structure des deux produits de dégradation de l'EN.....	85
Figure 13. Pics d'EN et ses produits de dégradation avant (a) et après (b) la dégradation.....	86
Figure 14. Pureté de pic d'EN selon l'automate EMPOWER.....	87
Figure 15. Droite de régression de l'EN pur.....	89
Figure 16. Droite de régression de l'impureté A.....	91
Figure 17. Droite de régression du CBA.....	96

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFNOR : Agence française de normalisation

AMM : Autorisation de la mise sur le marché

ANOVA : *Analysis of variance*

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

APCI : *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

BfArM : *Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte*

BP : *british pharmacopoeia*

BPF : Bonne pratique de fabrication

BPL : bonne pratique de laboratoire

CCP : Certificat complémentaire de protection

CI : *Chemical ionization*

CLHP : Chromatographie liquide à haute performance

CL-SM : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

CV : Coefficient de variation

DAD : *Diode array detection*

DCI : Dénomination commune internationale

DDL : Degré de liberté

DJA : Dose journalière acceptable

DJT : Dose journalière tolérable

E_a : Energie d'activation de la réaction

EI : *Electron ionization*

EJA : Exposition journalière autorisée

EMA : *European Medicine Agency*

EN: Econazole nitrate

Liste des abréviations

EPA IRIS : *Environmental Protection Agency / The Integrated Risk Information System*

ESI : *Electro spray Ionization*

FAB : *Fast atom bombardment*

FDA : *Food and Drug Administration*

HPLC : *high performance liquid chromatography*

HR : Humidité relative

IC : intervalle de confiance

ICH : *International Council on Harmonisation*

INRS : Institut national de recherche et de sécurité

Inserm : Institut national de la santé et de la recherche médicale

IPCS : *International Program on chemical safety*

LD : limite de détection

LC-MS : *Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry*

LQ : Limite de quantification

MALDI : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*

NDEA : N-nitroso-di-éthylamine

NDMA : N-nitroso-di-méthylamine

OMS : Organisation mondiale de la santé

PA : Principe actif

PD : produits de dégradation

PMQ : Principes de management de la qualité

QA : *Quality assurance*

QC : *Quality control*

R : Coefficient de corrélation

R(%) : Taux de recouvrement

R(%)_m : Taux de recouvrement moyen

Liste des abréviations

R^2 : Coefficient de régression

RCP : Résumé des caractéristiques de produit

RRF : *Relative response factor*

RSD% : *Relative standard deviation*

S_1 : Ecart-type de fidélité intermédiaire

S_r : Ecart-type de répétabilité

S_R : Ecart-type de reproductibilité.

SCE : somme des carrés d'écart à la moyenne

SCE_1 : Somme des carrés d'écart à la moyenne inter-série

SCE_r : Somme des carrés d'écart à la moyenne intra-série

SCR : substance chimique de référence

TDI : *Total daily intake*

T_r : Temps de rétention

USP : *United States Pharmacopeia*

UV : Ultra-violet

UV-visible : Ultraviolet-visible

V_1 : Variance inter-série (variance de fidélité intermédiaire)

V_r : Variance intra série (variance de répétabilité)

VLA : Valéramide

VLA-DIM : N, N-di-méthyl-valéramide

ZHP : *Zhejiang Huahai Pharmaceutical*

Introduction

Sécurité, efficacité et innocuité, trois propriétés constituant la qualité d'un produit pharmaceutique, qui sont d'une importance cruciale dans l'industrie pharmaceutique. Pour atteindre cette excellence, les autorités mettent un système de management de la qualité qui fait intervenir deux acteurs essentiels (contrôle qualité et assurance qualité). Cependant, tout médicament est conditionné par ce système tout au long de son cycle de vie industriel, pour assurer la qualité finale du produit fournit aux clients.

En effet, le contrôle qualité concerne toutes les méthodes visant à vérifier les caractéristiques physico-chimiques et biologiques des médicaments, une large gamme de méthodes est appliquée aux quelques échantillons d'un lot : cela peut aller de la simple description des propriétés physico-chimiques du produit (densité, poids, viscosité, solubilité, indice de réfraction...) aux tests de dosage colorimétriques, en passant par la chromatographie en couche mince, gazeuse ou liquide haute performance, la spectrophotométrie de masse.

Ces différents tests permettent de vérifier la conformité de ces caractéristiques aux spécifications, ainsi la vérification de l'absence ou la présence de quelques molécules autres que celles spécifiées dans la composition du produit, ce sont des substances apparentées telles que les impuretés liées aux procédés de synthèses, impuretés provenant de la dégradation de la substance active...

L'assurance qualité comporte toutes les activités garantissant au consommateur et au patient de recevoir un produit conforme aux spécifications et aux normes existantes de qualité, d'innocuité et d'efficacité. La mauvaise efficacité ou la non sécurité d'un médicament donné est lié souvent à la détérioration physique ou la dégradation chimique de la substance active. Ces phénomènes sont diagnostiqués et prévus par les études de stabilité.

La stabilité est étudiée à trois niveaux : étude de stabilité en temps réel, étude de stabilité accélérée et étude de la dégradation forcée. Dans cette optique, on a envisagé de traiter une partie de la stabilité qui concerne l'étude de la dégradation forcée.

La dégradation forcée d'un médicament permet de repérer les impuretés qui viennent de la dégradation chimique de la substance active, qui peuvent être potentiellement dangereuses pour la santé humaine, toxiques pour l'organisme voir cancérogènes.

Cependant, dans certains pays ils ont suspendu carrément la commercialisation de quelques médicaments à cause de dégradants nocifs. Certes, en juillet 2018, l'un des agents antihypertenseurs les plus vendus (le VALSARTAN), fabriqué en Chine par la société chinoise Zhejiang Huahai Pharmaceutical (ZHP) s'est avéré contaminé par la nitrosamine "probablement cancérogène" N-nitroso-di-méthylamine (NDMA), suivi de la détection de N-nitroso-di-éthylamine (NDEA). Le produit générique contaminé est suspendu par l'Agence de régulation allemande (BfArM), puis l'Agence européenne du médicament (EMA). Étant hautement toxique, en particulier pour le foie et reconnue cancérogène par des études animales, la NDMA est répertoriée dans la classification EPA IRIS (*Environmental Protection Agency / The Integrated Risk Information System*) en tant que 2A, ce qui signifie qu'elle est « probablement cancérogène pour l'homme ». Dix jours plus tard, la FDA s'est jointe

Introduction

après que 22 autres pays ont émis des rappels impliquant 2 300 lots de VALSARTAN envoyés en Allemagne, Norvège, Finlande, Suède, Hongrie, Pays-Bas, Autriche, Irlande, Bulgarie, Italie, Espagne, Portugal, Belgique, France, Pologne, Croatie, Lituanie, Grèce, Canada, Bosnie-Herzégovine, Bahreïn et Malte. En Allemagne et en France, on s'attend à ce qu'un nombre estimé de 800 000 à 900 000 patients par pays et environ 20 millions dans le monde se soient vu prescrire du VALSARTAN générique contaminé.

Pour cette raison des études sont menées sur ce produit et les autres sartans (des anti hypertenseurs de la même famille) en parallèle à la recherche de la NDMA et la NDEA, dans ces recherches ils ont également révélé que deux autres contaminations non nitrosamines, le valéramide (VLA) et le N, N-diméthyl-valéramide (VLA DIM) sont présents.

Les premières mesures ont été effectuées par GC-MS (chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse), mais n'atteint pas la sensibilité nécessaire pour trouver et quantifier les traces de NDMA et de NDEA. Une méthode LC-MS/MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse) hautement sensible a été développée pour détecter et quantifier la NDMA, la NDEA, le VLA et le VLA-DIM dans 152 comprimés de sartan à partir de 8 molécules de sartan structurellement différentes. Une bonne linéarité pour chaque composé a pu être démontrée sur des intervalles d'étalonnage dans les nanogrammes inférieurs. L'analyse qualitative de ces comprimés, a montré les proportions suivantes :

- 21 comprimés (soit 13,8 %) contiennent NDMA
- 9 comprimés (soit 5,9 %) contiennent NDEA
- 13 comprimés (soit 8,6 %) contiennent VLA
- 7 comprimés (soit 4,6 %) contiennent VLA-DIM

De plus, un produit de CANDESARTAN a été trouvé contaminé par le NDEA.

Notre travail tourne autour de la dégradation forcée de l'éconazole nitrate et la validation de la méthode de dosage, et ce en cherchant les voies de dégradation possibles, puis l'identification et la quantification des impuretés de dégradation, qui s'achèvera par la validation analytique de la méthode de dosage. Le présent manuscrit propose une contribution pour répondre aux certaines questions qui sont étroitement liées à la dégradation forcée de l'éconazole nitrate, à titre d'exemple :

- Quel est l'avantage de la dégradation forcée par rapport à la maîtrise de la qualité et la stabilité d'un médicament ?
- La validation analytique de la méthode de dosage des dégradants est-elle possible ?
- Quelles sont les voies de dégradation, possibles de l'éconazole nitrate ?
- Quelles substances pouvant apparaître suite à la dégradation de l'éconazole nitrate ?

I-1/Définition

Selon l'article 207 de la loi algérienne numéro 18-11 du 02 juillet 2018, on entend par produit pharmaceutique tout ce qui est : médicament ; produits chimiques officinaux ; produits galéniques ; matières premières à usage pharmaceutique ; les aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales ; tous autres produits nécessaires à la médecine humaine. Le médicament est défini dans la présente loi comme étant toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, et tous produits pouvant être administrés à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, de corriger et de modifier ses fonctions physiologiques.

Sont considérés également comme médicaments, notamment :

- Les produits diététiques qui renferment des substances non alimentaires leur conférant des propriétés utiles à la santé humaine ;
- Les produits stables dérivés du sang ;
- Les concentrés d'hémodialyse ou solutés de dialyse péritonéale ;
- Les gaz médicaux.

Sont assimilés à des médicaments, notamment : les produits d'hygiène corporelle et produits cosmétiques contenant des substances vénéneuses à des doses et concentrations supérieures à celles fixées par voie réglementaire (1).

I-2/Conception et développement d'un nouveau médicament

La recherche d'une nouvelle molécule thérapeutique est basée sur la synthèse chimique des milliers de molécules chimiques susceptibles de répondre à un besoin donné. Par un screening biochimique *in vitro*, seulement celles qui présentent une propriété pharmacologique intéressante font l'objet de tests toxicologiques et pharmacocinétique chez l'animal afin d'éliminer les substances plus toxiques et choisir les molécules qui atteignent facilement la cible organique et prouvent l'efficacité, la sécurité et l'innocuité de celles-ci. Ces tests constituant l'étude préclinique, aboutissent à la sélection d'une seule molécule candidate qui passe au développement galénique pour la mise au point d'un médicament qui sera testé par la suite sur l'homme par la réalisation des essais cliniques qui se déroulent en trois phases :

- Phase I, étudie la tolérance humaine ;
- Phase II, étudie l'efficacité pharmacologique ;

- Phase III, sert à élaborer le rapport bénéfice/risque.

Une fois le rapport bénéfice/risque est favorable, la commercialisation aura lieu après l'acquisition d'une autorisation de la mise sur le marché auprès les autorités de libération des produits pharmaceutiques. Les essais ne s'achèvent pas après la commercialisation, une fois sur le marché les essais cliniques de la phase IV sont menés sur le médicament commercialisé dans le but de rechercher des éventuels effets indésirables non détectés pendant les phases de développement clinique (2).

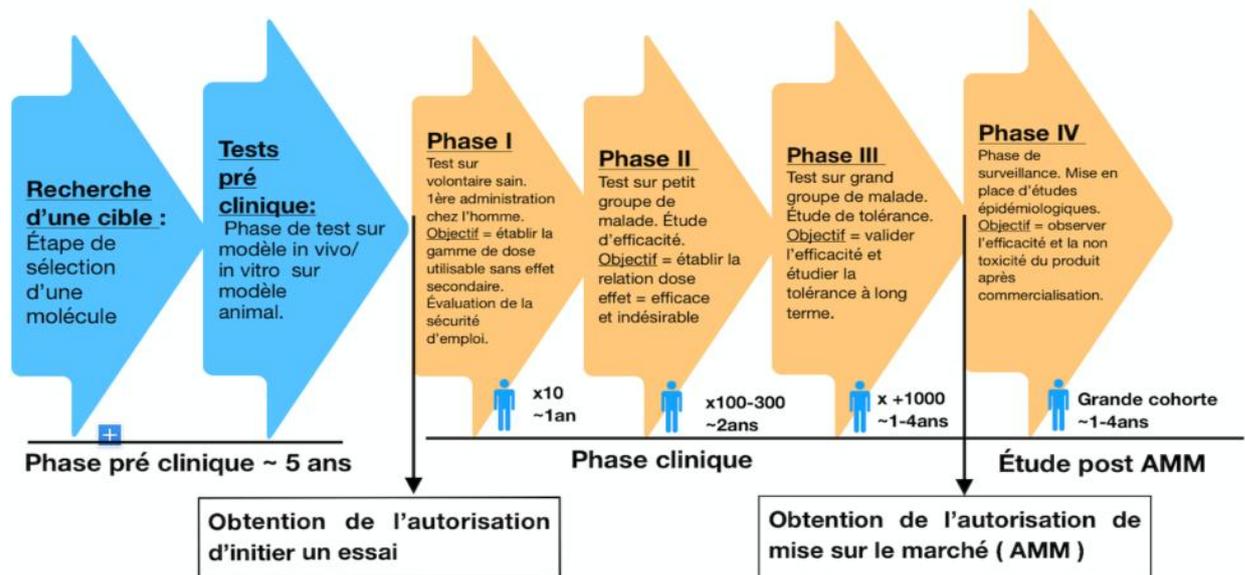


Figure 1. Les étapes de la conception d'un médicament(3).

Le développement galénique est un sous-processus indispensable de la conception d'un nouveau médicament, il est fait de deux étapes : la pré formulation et la formulation galénique

La pré formulation

C'est une étape primordiale précède la mise en forme galénique de la molécule d'intérêt thérapeutique, elle inclut la caractérisation physico-chimique de la matière première (polymorphisme, granulométrie, structure cristalline, aspect, pKa, solubilité ...), le contrôle de la stabilité chimique, physique, la photo-stabilité, la thermo-résistance, la pureté de la matière première.

La formulation

Elle aura lieu juste après la pré-formulation, c'est-à-dire la mise au point de la forme terminale du produit et donc choisir la voie d'administration de celui-ci en respectant l'innocuité du principe actif vis-à-vis les excipients ajoutés (2).

I-3/ Concept du princeps et générique

I-3-1/ Définition des deux notions

Le médicament princeps autrement appelé « médicament innovant » est le produit original, il est considéré comme une spécialité de référence, c'est un fruit d'une longue durée de recherche et développement pharmaceutique estimée à 15 ans d'environ, dans le but de mettre à la disposition des patients et des professionnels de santé des médicaments innovants couvrant progressivement les besoins médicaux non satisfaits qui restent importants. Les résultats de cette recherche peuvent être rémunérés grâce à l'existence d'un brevet garantissant une période d'exclusivité à ces innovations (4).

Un médicament générique est défini juridiquement dans la loi algérienne du juillet 2018, comme tout médicament qui a la même composition qualitative et quantitative en principe(s) actif(s), la même forme pharmaceutique, et qui est interchangeable avec la spécialité de référence du fait de sa bioéquivalence démontrée par des études appropriées de biodisponibilité. Donc c'est une copie d'un médicament princeps (princeps signifiant « le premier » en latin) dont le brevet et le CCP (certificat complémentaire de protection) sont tombés dans le domaine public. Une spécialité ne peut être qualifiée de spécialité de référence, que si son enregistrement a été effectué au vu de l'ensemble des données nécessaires et suffisantes à elles seules pour son évaluation(1). Un médicament générique est une spécialité pharmaceutique de plein droit. Un dossier d'AMM (autorisation de la mise sur le marché) doit donc être constitué, conformément aux normes et protocoles juridiques et présenté aux Autorités d'enregistrement pour évaluation et si le dossier est acceptable, pour octroi de l'autorisation de mise sur le marché (5).

I-3-2/Impuretés présentes dans la substance active, importance de la dégradation forcée d'un produit générique

Après l'expiration du droit de brevet qui s'attache à la spécialité de référence, un produit générique de la spécialité concernée peut se mettre en place dans le marché, et plusieurs industries autre que l'industrie mère peuvent donc synthétiser la substance active, dans ce discours on parle de la diversité de source de la matière première.

Par ailleurs, et dans le cadre d'un dossier de demande d'AMM d'un générique, le demandeur doit consacrer une place importante aux impuretés de synthèse et de dégradation de la substance active elle-même et en comparaison avec la substance active dans le médicament

princeps(4). Généralement, on se trouve devant deux cas au cours des études d'impuretés d'un médicament générique :

1. **Impuretés différentes qualitativement**

Si les impuretés de la substance active générique n'existent pas dans la substance active du princeps, le demandeur d'AMM du médicament générique devra les qualifier, les quantifier et réaliser des études précliniques pour en vérifier l'innocuité, si la quantité est supérieure à une limite définie dans une guideline européenne (Pharmacopée européenne) et internationale (ICH) ;

2. **Impuretés supérieures quantitativement**

Si les impuretés de la substance active générique sont les mêmes que celles présentes dans le princeps mais sont en quantité supérieure, elles ne sont donc pas considérées comme validées par les essais toxicologiques et les données cliniques du princeps et des études particulières devront être menées.

Dans les deux cas cités ci-dessus, ces impuretés devront être "qualifiées" au plan toxicologique. En effet, on appelle qualification, le processus d'obtention et d'évaluation des données prouvant l'innocuité biologique d'une impureté à un seuil (x) donné (taux spécifiés). Le demandeur doit justifier l'établissement des critères d'acceptation d'une impureté sur des données d'innocuité (4).

- La concentration de toute impureté présente dans une substance active existante qui a été correctement évaluée au cours d'études sur l'innocuité ou d'essais cliniques est considérée comme qualifiée.
- Les impuretés qui sont aussi des métabolites importants soit chez l'animal et/ou l'être humain sont généralement considérées comme qualifiées.
- Un taux d'une impureté qualifiée supérieur à celui que l'on trouve dans une substance active existante peut également se justifier par l'analyse des quantités réelles d'impuretés contenues dans le matériel utilisé au cours d'études d'innocuité antérieures.
- L'étude de l'innocuité est indispensable pour la qualification des impuretés qui n'étaient pas présentes dans la substance active du médicament princeps, ou qui l'étaient, mais en concentrations notablement plus faibles.

I-4/ Qualité et pureté d'un médicament

La norme AFNOR a donné la définition de la qualité d'un médicament par : "un produit ou service de qualité est un produit dont les caractéristiques lui permettent de satisfaire les

besoins exprimés ou implicites des consommateurs" (6). Outre, un médicament est de bonne qualité lorsqu'il est efficace, sûr, pur donc stable dans le temps et contrôlé par un système de qualité qui assure sa reproductibilité. Un système de la qualité (management qualité) au niveau d'un établissement pharmaceutique est constitué de deux éléments : assurance qualité (QA) et contrôle qualité (QC).

1. Assurance qualité

C'est une entité qui vise à donner confiance en ce que les exigences pour la qualité seront satisfaites, elle concerne toutes les activités pouvant influencer la qualité du produit de la conception jusqu'au développement final, c'est-à-dire la bonne maîtrise de tous les domaines afin de garantir l'intégrité et la pureté du produit destiné au patient en respectant les règles de la bonne pratique de fabrication (BPF). Les sept principes de management de la qualité (PMQ) sont (7):

- PMQ 1 – Orientation client ;
- PMQ 2 – Leadership ;
- PMQ 3 – Implication du personnel ;
- PMQ 4 – Approche processus ;
- PMQ 5 – Amélioration ;
- PMQ 6 – Prise de décision fondée sur des preuves ;
- PMQ 7 – Management des relations avec les parties intéressées ;

a) Orientation client

La satisfaction aux exigences des clients et de s'efforcer d'aller au-delà de leurs attentes, en exerçant une interaction avec eux pour comprendre leurs besoins présents et futurs dans le but d'améliorer l'image de l'organisme et fidéliser les clients.

b) Leadership

Les dirigeants établissent l'implication du personnel et l'orientation de l'organisme par la création des stratégies, politiques et processus pour améliorer la coordination entre les différents niveaux de l'organisme.

c) Implication du personnel

L'habilitation et l'amélioration des compétences facilitent l'implication du personnel à tous les niveaux dans l'organisme.

d) Approche processus

Les processus corrélés entre eux permettent d'obtenir des résultats cohérents et prévisibles, ça permet à un organisme d'optimiser le système de management de la qualité et ses performances.

e) Amélioration

Il est essentiel pour chaque organisme de conserver ses niveaux de performance actuels, et rechercher toujours une nouvelle opportunité pour assurer une amélioration continue.

f) Prise de décision fondée sur des preuves

Elle implique souvent de multiples sources de données d'entrée, ainsi que leur interprétation qui peut être subjective. Il est important de comprendre les relations de cause à effet et les conséquences involontaires possibles. L'analyse des données conduit à une plus grande objectivité, à une plus grande confiance dans la prise de décision et à plus grande aptitude à démontrer l'efficacité de décisions antérieures.

g) Management des relations avec les parties intéressées : la relation avec les parties intéressées (comme les fournisseurs) a un impact sur les performances de l'organisme. La gestion des relations avec ses réseaux de prestataires et de partenaires possède une importance particulière. Meilleure gestion de la chaîne d'approvisionnement assurant un flux stable de produits et services (7).

2. Contrôle de la qualité

Il est considéré comme le deuxième élément fondamental du système de qualité, c'est un ensemble de tests chimiques, physiques, microbiologique, galénique et pharmaco-technologique sur la matière première, produit semi-fini et produit fini en vérifiant la conformité aux spécifications définies dans les référentiels réglementaire en appliquant des méthodes validées et sur des équipements qualifiés, selon l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) les essais du contrôle qualité sont soumis aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL) afin de garantir le bon fonctionnement de laboratoire (8).

En outre la qualité des produits pharmaceutiques peut être influencée par plusieurs facteurs y compris les facteurs chimiques (la présence d'impuretés dans la composition par exemple peut altérer la qualité), donc parmi les essais effectués dans les laboratoires pharmaceutiques pour contrôler la qualité d'un médicament donnée, on trouve une partie réservée pour la recherche et le dosage d'impuretés, qui fait l'un des objectifs de notre travail.

La désignation qualité appliquée à un médicament exige (9):

-
- Qu'il contienne la quantité de principe actif inscrite sur l'étiquette dans la limite de ses spécifications ;
 - Qu'il contienne cette quantité dans chaque dose unitaire ;
 - Qu'il soit exempt de substances étrangères ;
 - Qu'il maintienne son dosage, sa biodisponibilité thérapeutique, son apparence jusqu'à l'utilisation ;
 - Qu'après administration, il libère le principe actif avec une entière biodisponibilité.

La pureté de la matière première et du produit fini est une propriété indissociable de la qualité, ça correspond à l'intégrité quantitative et qualitative exacte du principe actif surtout. Elle est évaluée par des études physiques et chimiques sur des substances qui rentrent dans la composition du produit testé afin de bien maîtriser une éventuelle dégradation pouvant influencer la qualité. Ces études ont pour objectifs de prévoir les conditions de l'environnement capables d'altérer ou modifier la pureté de la substance pendant l'entreposage en appliquant des conditions de stress (humidité, pression, oxydation ...) dans le but d'accélérer la réactivité chimique des substances mises en composition, et rechercher les produits de dégradation présents sous conditions de stress, c'est l'un des objectifs de ce mémoire (10).

I-5/ Aspect réglementaire

❖ La pharmacopée européenne

C'est un ensemble de textes référentiels, juridiquement contraignante dans tous les pays d'Europe et appliquée dans plus de 120 pays à travers le monde entier dans le but de contrôler la qualité des médicaments. Ces textes sont présentés sous forme de monographies générales ou spécifiques. Les normes officielles qui y sont publiées fournissent une base scientifique au contrôle qualitatif et quantitatif des impuretés liées aux procédés de fabrication et produits de dégradation, elles exigent l'utilisation des méthodes validées indicatives de la stabilité afin de vérifier que le produit est de qualité adéquate pendant toute sa durée de vie (11).

❖ Selon la ligne directive ICH Q3A (R2)(*The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) relatif à la recherche des impuretés chimiques, il classe ces impuretés en trois catégories :

- ✓ Impuretés organiques incluant les produits de dégradation ;
- ✓ Impuretés inorganiques ;
- ✓ Solvants résiduels (12).

Chapitre I : Médicaments et qualité

-
- ❖ Le guide Q3B (R2) de l'ICH portant sur les impuretés dans les nouveaux produits pharmaceutiques :
 - ✓ Il est indispensable de résumer les types et le degré de l'apparition des produits de dégradation observés au cours des études de stabilité d'un nouveau produit médicamenteux.
 - ✓ On doit faire une évaluation scientifique précise des voies de dégradation et impuretés résultants de l'interaction avec les excipients et/ou le système de fermeture immédiate du conditionnement.
 - ✓ Il faut inclure les résultats des tests des lots fabriqués au cours du développement de produit afin d'exclure les impuretés qui ne sont pas produits de dégradation » (p. ex., impuretés du procédé de fabrication de la substance médicamenteuse, produits de dégradation liés à l'interaction excipients/ principe actif et produits de dégradation provenant de l'interaction conditionnement primaire / principe actif) (12).
 - ❖ Le guide Q6B de l'ICH décrit les spécifications et les limites d'acceptation des produits pharmaceutiques :
 - ✓ Ce guide définit une spécification comme étant une liste de tests de références à des procédures analytiques et des critères d'acceptation appropriés qui sont des limites numériques, des plages ou d'autres critères pour les tests décrits.
 - ✓ Une spécification établit l'ensemble de critères auxquels une substance médicamenteuse ou un produit médicamenteux doit être conforme à différents niveaux de sa fabrication pour être considérée comme acceptable pour l'usage auquel il est destiné.

Les spécifications sont des normes de qualité critiques qui sont proposées et justifiées par le fabricant et approuvées par les autorités réglementaires en tant que conditions d'approbation (13).

- ❖ La ligne directrice ICH Q3A stipule que (12) :
 - ✓ La spécification d'une nouvelle substance médicamenteuse doit inclure une liste d'impuretés.
 - ✓ Des études de stabilité, de développement chimique et des analyses de lots de routine peuvent être adoptées pour prédire les impuretés susceptibles de se produire dans le produit distribué dans le marché ultérieurement.
 - ✓ La sélection des impuretés dans la nouvelle spécification de la substance médicamenteuse doit être basée sur les impuretés trouvées dans les lots fabriqués destinés à la commercialisation.
 - ✓ Les impuretés individuelles avec des critères d'acceptation spécifiques présentes dans la spécification d'une substance médicamenteuse existante sont appelées « impuretés spécifiées » dans la présente ligne directrice.

Chapitre I : Médicaments et qualité

- ✓ Les impuretés spécifiées peuvent être identifiées ou non identifiées.
- ✓ L'inclusion ou l'exclusion des impuretés dans la spécification doit être argumentée par une discussion sur les profils des impuretés observés au cours des études précliniques (qualification au plan toxicologique) et dans le développement clinique, ainsi par un examen du profil d'impuretés des lots fabriqués par le procédé commercial proposé.
- ✓ Les impuretés spécifiées non identifiées doivent être désignées par une étiquette descriptive analytique qualitative appropriée (par exemple, « impureté A », « impureté avec un temps de rétention de 0,9 »).
- ✓ On attribue pour les impuretés non spécifiées un critère d'acceptation général qui ne dépasse pas le seuil d'identification qui dépend de la dose journalière recommandée pour le produit testé, et un critère d'acceptation pour les impuretés totales doit être inclus.
- ❖ Dans le vingt-septième rapport technique de l'organisation mondiale de la santé (OMS), le comité des experts des spécifications relatives aux préparations pharmaceutiques, a envisagé sous leurs divers aspects les garanties de qualité des systèmes d'approvisionnement en produits pharmaceutiques. Dans ce rapport, il est noté que le stockage constitue l'un des aspects importants de l'assurance de la qualité, il est à noter qu'un stockage défectueux peut conduire à la détérioration physique et à la décomposition chimique des produits, desquelles il résulte une perte d'activité et la formation de produits de dégradation éventuellement nocifs et toxiques. Plus tard, on a commencé à envisager d'autres aspects, tels que l'instabilité microbiologique et la perte de la biodisponibilité (14).
- ❖ Dans le même contexte, la FDA stipule que les fabricants, distributeurs agréés de médicaments et leurs représentants doivent stocker et traiter tous les échantillons de médicaments conformément aux « conditions favorables à la préservation de leur stabilité, de leur intégrité et de leur efficacité » tout en veillant à ce que les échantillons de médicaments soient exempts de toute contamination, détérioration et falsification (15).
- ❖ En 1990, dans le trente et unième rapport du comité de l'organisation mondiale de la santé (OMS) des experts des spécifications relatives aux produits pharmaceutiques indique que la stabilité du produit fini dépend largement de la stabilité du principe actif qu'il contient, mais aussi les excipients ajoutés et le conditionnement utilisé peuvent exercer une influence positive ou négative sur la stabilité du principe actif (16).
- ❖ Le guide ICH Q1A, relatif à la stabilité des substances actives et des produits finis, précise que la stabilité de la substance active est une composante intégrale dans l'approche systématique pour l'évaluation de la stabilité d'un médicament. Il exprime la nécessité de

réaliser des études de stress permettant d'identifier les produits de dégradation, d'établir les voies de dégradation et de déterminer la stabilité intrinsèque de la molécule. Les études de dégradation forcée doivent inclure l'effet de la température, l'humidité, l'oxydation, la photolyse et l'hydrolyse à différentes valeurs de pH (17).

- ❖ Dans les industries pharmaceutiques toutes les méthodes adoptées doivent être validées pour prouver que les méthodes d'analyses employées sont parfaitement fiables, le chapitre 5 de guide des bonnes pratiques de fabrication porte sur les opérations de production stipule que la validation de toutes les procédures analytiques est indispensable. Ce chapitre inclut (5) :
 - 5.23. Les études de validation doivent conforter les bonnes pratiques de fabrication ; elles doivent être menées conformément à des procédures définies. Les résultats et les conclusions doivent être consignés.
 - 5.24. Lors de l'adoption d'une nouvelle formule de fabrication ou d'une nouvelle méthode de préparation, il convient de démontrer qu'elle satisfait à la production de routine et que le processus choisi, avec les produits et le matériel prévus, donne systématiquement un produit de la qualité requise.
 - 5.25. Il convient de valider toute modification importante du processus de fabrication, y compris au niveau du matériel ou des produits, lorsque cette modification peut affecter la qualité du produit ou la reproductibilité du processus.
 - 5.26. Les procédés et les procédures doivent être périodiquement soumis à une nouvelle validation critique en vue de confirmer leur aptitude à conduire aux résultats escomptés.

II-1/Définition de la stabilité

Les autorités des produits pharmaceutiques exigent essentiellement deux critères définissant la qualité qui sont l'innocuité et l'efficacité. Ces deux critères doivent être garantis pendant toute la durée de validité du médicament et ils sont évalués par des études de stabilité qui concernent avant tout le principe actif en tant que matière première puis le médicament en tant que produit fini. La stabilité d'un médicament est définie selon les normes d'ICH par sa capacité à conserver ses propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques dans des limites spécifiées pendant toute sa durée de validité (18).

L'USP (*United States Pharmacopeia*) définit la stabilité d'un produit comme étant son aptitude à conserver, dans des limites spécifiées et durant toute la période de stockage et d'utilisation, leurs propriétés et leurs caractéristiques qu'il possédait au moment de sa fabrication(19).

L'USP (*United States Pharmacopeia*) définit 5 types de stabilité, qui sont (19) :

- La stabilité chimique : caractérisée par le fait que chaque substance active conserve son intégrité chimique et son activité dans les limites fixées.
- La stabilité physique : assurée par le maintien des propriétés physiques initiales, y compris l'aspect, la saveur, l'uniformité, ainsi que la dissolution et le pouvoir de remise en suspension.
- La stabilité microbiologique : réside dans le maintien de la stérilité ou de la résistance au développement microbien dans les limites spécifiées. Les agents antimicrobiens éventuellement présents conservent leur efficacité dans les limites fixées.
- La stabilité thérapeutique : exclut tout changement de l'effet thérapeutique.
- La stabilité toxicologique : ne tolère aucune hausse notable de la toxicité

La dégradation forcée d'un produit pharmaceutique peut provoquer une détérioration chimique du principe actif en donnant des nouvelles substances qui peuvent être potentiellement toxique pour l'être humain. De ce fait, les deux types de stabilité pouvant être évalués par l'étude de stress qui sont la stabilité chimique et la stabilité toxicologique.

II-2/ Étude de stabilité

Au cours de la phase de pré-formulation, la substance active fait l'objet d'étude de pureté et de stabilité visant à déterminer sa stabilité intrinsèque, à identifier ses impuretés liées aux procédés de synthèse et ses produits de dégradation, à orienter le choix des méthodes de contrôle de la substance active pour s'assurer que le médicament peut répondre aux spécifications approuvées avant sa date de péremption mentionnée sur l'emballage et/ou sur l'étiquette. Ces études conditionnent aussi les études de stabilité, les méthodes de contrôle, la durée de validité et les conditions de stockage appropriées du produit fini (20).

L'étude de stabilité consiste à prélever un échantillon de plusieurs lots d'un certain produit pharmaceutique et le stocker dans des conditions contrôlées, puis la dégradation est mesurée à des intervalles fixes tels que 0, 3,6, 12, 18, 24 mois et annuellement par la suite, jusqu'à 5 ans. Les échantillons ne sont généralement pas conservés pendant plus de 5 ans car la durée de conservation maximale autorisée par la FDA est de 5 ans (20).

Les études de stabilité ont alors pour objectif d'évaluer la qualité d'un principe actif ou d'un produit médicamenteux et de donner des informations sur la façon dont leur qualité varie en fonction du temps afin de définir sa durée de conservation et sa durée d'utilisation dans des conditions d'emballage et de stockage spécifiées (21).

La durée de conservation est la période de temps pendant laquelle un produit médicamenteux, s'il est entreposé correctement, devrait se conformer à la spécification, telle que déterminée par des études de stabilité sur un certain nombre de lots du produit (21). La durée de conservation est utilisée pour établir la date de péremption de chaque lot. On entend par une date de péremption est la date indiquée sur le contenant individuel (généralement sur l'étiquette) d'un produit pharmaceutique jusqu'à et y compris à laquelle le produit devrait rester conforme aux spécifications, s'il est entreposé correctement. Elle est attribuée pour chaque lot en ajoutant la durée de conservation à la date de fabrication (21).

Les études de stabilité sont réalisées dans le cadre de la demande d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) d'un médicament. Elles doivent être réalisées non seulement pour les principes actifs contenus dans le médicament mais aussi pour le médicament lui-même. Les études de stabilité pour le principe actif sont généralement réalisées avant celles du médicament et donnent des indications sur la sensibilité de ce dernier (22).

II-3/ Types de stabilité

Selon les guides de FDA, la stabilité des produits pharmaceutiques, est classée en trois types : chimique, physique et microbiologique.

II-3-1/ Stabilité chimique

C'est l'absence de toute modification de la composition chimique du médicament. En général, avec le temps, la plupart des produits pharmaceutiques peuvent subir une dégradation par des réactions chimiques telles que l'hydrolyse, l'oxydation et la photolyse. Ces réactions peuvent conduire à une diminution des concentrations de principes actifs du médicament ainsi que la formation des produits de dégradation indésirables. Ceci, peut entraîner une diminution ou une absence d'effet thérapeutique du médicament ou même contenir une substance nocive ou toxique. Les conservateurs et les excipients contenus dans les produits pharmaceutiques peuvent également subir une dégradation chimique. Il a été constaté que les formes solides sont plus stables que les formes liquides car ils subissent une dégradation chimique plus lente (20).

II-3-2/ Stabilité physique

Elle implique que le médicament reste inchangé tout au long de sa durée de conservation sans altération de ses propriétés physiques qui incluent l'aspect, les propriétés organoleptiques, la dureté, la taille des particules, etc. Cette stabilité est essentielle pour assurer l'efficacité et l'innocuité des médicaments et doit être maintenue pendant toutes les étapes de la formulation, la fabrication, le conditionnement et le stockage du produit pharmaceutique et étroitement surveillée et évaluée par des tests spéciaux (20).

II-3-3/ Stabilité microbiologique

C'est l'absence de contamination par les différents types de germes microbiens (par exemple, les champignons et les bactéries). De toute évidence, la contamination microbienne d'un produit pharmaceutique peut compromettre sa sécurité et entraîner des effets graves. Les solutions et les formes semi-solides à base d'eau sont plus susceptibles de subir une contamination microbienne en raison de leur forte teneur en eau. Cela rend l'addition de conservateurs antimicrobiens à ces formes galéniques essentiels pour assurer leur stérilité notamment pour les formes multidoses. En outre, pour empêcher la contamination de la

formulation pendant le stockage, le récipient doit être conçu de manière appropriée en utilisant de préférence un récipient à dose unique (20).

II-4/ Facteurs influençant l'intégrité d'un médicament

Non seulement les études de stabilité visent à déterminer la durée de conservation, mais aussi aident à fournir des preuves de la façon dont la qualité d'un principe actif ou d'un produit fini varie avec le temps sous l'influence de divers facteurs environnementaux par rapport aux seuils de tolérance fixés (spécifications ; limites inférieure et supérieure de tolérance pour différents paramètres d'analyse, dont la teneur en principe actif). Le programme de stabilité comprend également l'étude des facteurs liés au produit qui influencent sa qualité (23) .

Les facteurs susceptibles d'influencer le degré et la vitesse de détérioration des médicaments sont subdivisés en deux principales catégories (23) :

- Facteurs environnementaux

- Chaleur, humidité, lumière, oxygène de l'air et diverses autres formes d'agressions et de modifications physiques (par exemple vibrations, congélation).

- Facteurs intrinsèques, notamment

- Propriétés chimiques du principe actif et des excipients utilisés et l'interaction entre eux (par exemple : présence de certaines impuretés, polymorphe ou forme cristalline, granulométrie, présence éventuelle d'eau ou d'autres solvants) ;
- Forme pharmaceutique et sa composition ;
- Procédé de fabrication (y compris les conditions environnementales et les techniques employées) ;
- Nature du récipient et de tout autre matériau de conditionnement avec lequel le produit peut être en contact direct ou qui peut d'une autre façon influencer sa stabilité.

C'est pour cette intolérance aux variations des facteurs extrinsèque cités ci-dessus on fait appel à la dégradation forcée du produit pharmaceutique afin de vérifier la stabilité intrinsèque de sa substance médicamenteuse et valider le pouvoir indicateur de stabilité des procédures analytiques utilisées en temps réel. La nature des tests de résistance dépendra de la matière première individuelle ainsi du type de produit fini correspondant (23).

II-5/ Types d'étude de stabilité

Il existe en général deux types d'études de stabilité (17) :

- Etude de stabilité en temps réel.
- Etude de stabilité accélérée.

II-5-1/ Etude de stabilité en temps réel

C'est l'évaluation expérimentale des caractéristiques physiques, chimiques, biologiques et microbiologiques d'un médicament pendant sa durée de validité et d'utilisation prévue et au-delà, dans les conditions de stockage prévues pour le marché auquel il est destiné (23). La fréquence des tests en temps réel doit être suffisante, et elle devrait normalement être tous les 3 mois au cours de la première année, tous les 6 mois au cours de la deuxième année, et annuellement par la suite pendant la période de re-test proposée pour établir le profil de stabilité de la substance médicamenteuse et déterminer la durée de validité dans les conditions de stockage de routine (17).

Ces études sont réalisées à une température de $T = 25 \pm 2^\circ\text{C}$ et à une humidité relative d'environ $\text{HR} = 60 \pm 5\%$; ou à une température de l'ordre $T = 30 \pm 2^\circ\text{C}$ et à une humidité relative $\text{HR} = 65 \pm 5\%$ durant toute la période d'essais (17).

II-5-2/ Etude de stabilité accélérée

Ce sont des études destinées à augmenter la réactivité chimique ou la sensibilité physique d'un médicament en le soumettant à des conditions de stockage exagérées dans le cadre du programme officiel des études de stabilité. Ceci est réalisé en exposant le médicament à une température de l'ordre de $T = 40 \pm 2^\circ\text{C}$ et à une humidité de $75 \pm 5\%$ HR pendant 6 mois (17). Ils permettent de définir les propriétés du médicament et d'estimer le temps de conservation dans un court terme (20).

II-5-3/ Etude de stabilité intermédiaire

Les études intermédiaires sont utilisées pour augmenter modérément la dégradation chimique des médicaments ou des principes actifs stockés à $T = 25^\circ\text{C}$. Ces études sont réalisées à $T = 30 \pm 2^\circ\text{C}$ et $\text{HR} = 65 \pm 5\%$ pendant 6 mois. Elles peuvent être poursuivies au-delà de 6

mois en cas de mauvais comportement du produit dans les conditions de stockage accélérées, un minimum de quatre points dans le temps, y compris les points initial et final à est recommandée durant 12 mois (par exemple, 0, 6, 9, 12 mois) (17).

II-5-4/ Objectifs de chaque type d'étude de stabilité

Les essais de stabilité sont effectués aux différentes conditions en raison de chaque type d'entre eux présente un intérêt spécial. Les principaux objectifs des études de stabilité sont indiqués au tableau 1 (24) :

Tableau 1. Principaux objectifs des études de stabilité

Objectifs	Type d'étude	Phase
Choisir une formulation et un système récipient-fermeture satisfaisant (du point de vue de la stabilité)	Accélérée	Mise au point du produit
Déterminer la durée de validité et les conditions de stockage	Accélérée et en temps réel	Mise au point du produit et constitution du dossier d'homologation
Confirmer la durée de validité annoncée	En temps réel	Dossier d'homologation
Vérifier qu'aucun changement susceptible d'avoir un effet défavorable sur la stabilité du produit n'a été apporté à la formulation ou au procédé de fabrication	Accélérée et en temps réel	Assurance de la qualité au sens large, y compris le contrôle de la qualité

Ces études accélérées, intermédiaires ou à long terme entrent dans le cadre des études systématiques de stabilité. Les essais sous contraintes complètent les essais précédents. Ils permettent d'évaluer la réactivité chimique de la molécule lorsqu'elle est mise en contact avec des éléments étrangers tels que les acides, les bases et les agents oxydo-réducteurs. Ces essais portent sur l'effet de la température, la lumière, l'oxydation et la sensibilité de la substance à l'hydrolyse (effet du pH), qu'elle soit en solution, en suspension ou solide. Ces études sont des essais complémentaires appelées études dans des conditions de stress ou études de dégradation forcée(10).

II-6/ Conditions d'études de stabilité

Les conditions climatiques dans de nombreux pays en développement sont très différentes de celles des pays tempérés où sont fabriqués les médicaments, une mauvaise stabilité peut entraîner l'apparition de produits de dégradation toxiques ou une diminution progressive de l'activité. Il est donc nécessaire d'effectuer des études de stabilité en fonction des conditions climatiques du pays de destination. A cet effet, le monde a été divisé selon les recommandations de l'organisation mondiale de la Santé (OMS) en quatre zones climatiques, avec pour chaque zone des caractéristiques de température et d'humidité destinées à standardiser ces études de stabilité (25).

Tableau 2. Les zones climatiques selon l'organisation mondiale de la Santé (OMS) (26).

Zones climatiques	Conditions d'étude en temps réel	
	Température (°C)	Hygrométrie (HR (%))
Zone I Climat tempéré	21	45
Zone II Climat méditerranéen et subtropical avec possibilité de forte Humidité	25	60
Zone III Climat chaud et sec	30	35
Zone IV Climat chaud et humide	30	60

Remarque : Les dernières recommandations de l'organisation mondiale de la santé (OMS), subdivisent la zone IV en deux sous zones (23) :

- Sous-zone IVa : 30°C / 65% HR.
- Sous-zone IVb : 30°C / 75% HR.

III-1/ Définition

La qualité d'un produit pharmaceutique donné est altérée par sa mauvaise stabilité et la présence des impuretés dans sa composition chimique. L'impureté d'une substance active est définie comme étant tout composant de la nouvelle substance médicamenteuse qui ne fait pas partie de l'entité chimique définie comme une nouvelle molécule thérapeutique synthétisée, dans le même sens une impureté d'un nouveau produit médicamenteux est définie comme étant tout composant du produit médicamenteux qui n'est pas l'entité chimique définie, comme la substance médicamenteuse ou un excipient dans le produit médicamenteux (18).

De point de vue réglementaire, dans la pharmacopée européenne et avant la cinquième (5^{ième}) édition, il existait des prescriptions de contrôle des impuretés, cependant celles-ci ne faisaient pas l'objet d'une monographie générale. Donc elles apportent des compléments d'information concernant l'essai des « substances apparentées » exigé dans la plupart des monographies spécifiques.

Depuis la cinquième (5^{ième}) édition, un chapitre relatif au contrôle des impuretés dans les substances pour usage pharmaceutique est ajouté (le chapitre 5.10), dans ce dernier un développement d'une aide à l'interprétation des résultats en termes d'impuretés en complément de la monographie spécifique de la substance active considérée, a été ajouté. Cette aide se présente aussi bien sous la forme « d'un arbre de décision relatif à l'interprétation des critères généraux d'acceptation pour les autres impuretés dans les monographies », que sous la forme d'un glossaire rassemblant les termes appropriés pour définir les diverses catégories de ces « autres impuretés », tels que « **autres impuretés décelables** », « **impureté non spécifiée** », « **impureté potentielle** », etc...

Ce chapitre précise aussi la nécessité, si besoin, d'identifier et de qualifier une impureté détectée ne faisant pas partie des impuretés spécifiées dans la monographie spécifique. De même, si aucun essai de substances apparentées n'est présent dans la monographie considérée, l'utilisateur doit s'assurer que le contrôle des impuretés organiques est satisfaisant, et le cas échéant, développer une méthode d'analyse pertinente tout en demandant une révision de la monographie mise en cause.

De la même façon, lors d'un essai de substances apparentées, s'il apparait une impureté non spécifiée ou non décrite dans la monographie spécifique de la substance active, il convient

tout de même de la déclarer, l'identifier ou la qualifier, en fonction de sa concentration et des limites décrites (on peut se référer aux tableaux d'ICH Q3A correspondent aux seuils de déclaration, identification et qualification des impuretés présentes selon la dose journalière recommandée) (27).

III-2/ Origine d'impuretés

Les impuretés peuvent provenir de différentes sources qu'on peut les mettre dans des catégories larges de sources potentielles (27)(28):

- Les impuretés proviennent du procédé de production et/ou du stockage du médicament.
- Les impuretés de dégradation et d'interaction du principe actif avec les excipients voire avec le conditionnement primaire du médicament
- Les impuretés intermédiaires de synthèse qui sont des apparentées au principe actif provenant du procédé de synthèse.
- Les impuretés résiduelles découlant d'éléments intentionnellement ajoutés (p.ex., des catalyseurs) dans la formation de la substance pharmaceutique, des excipients ou des autres composants du produit pharmaceutique. L'évaluation des risques portant sur la substance pharmaceutique doit aborder le potentiel d'inclusion des impuretés dans le produit pharmaceutique.
- Les impuretés élémentaires qui ne sont pas intentionnellement ajoutées et qui peuvent être présentes dans la substance pharmaceutique, l'eau ou les excipients utilisés dans la préparation du produit pharmaceutique.
- Les impuretés qui peuvent être introduites par l'équipement de fabrication ou par le manutentionnement du personnel.
- Les impuretés élémentaires qui peuvent s'infiltrer dans la substance et le produit pharmaceutique à partir du contenant et dispositif de fermeture.

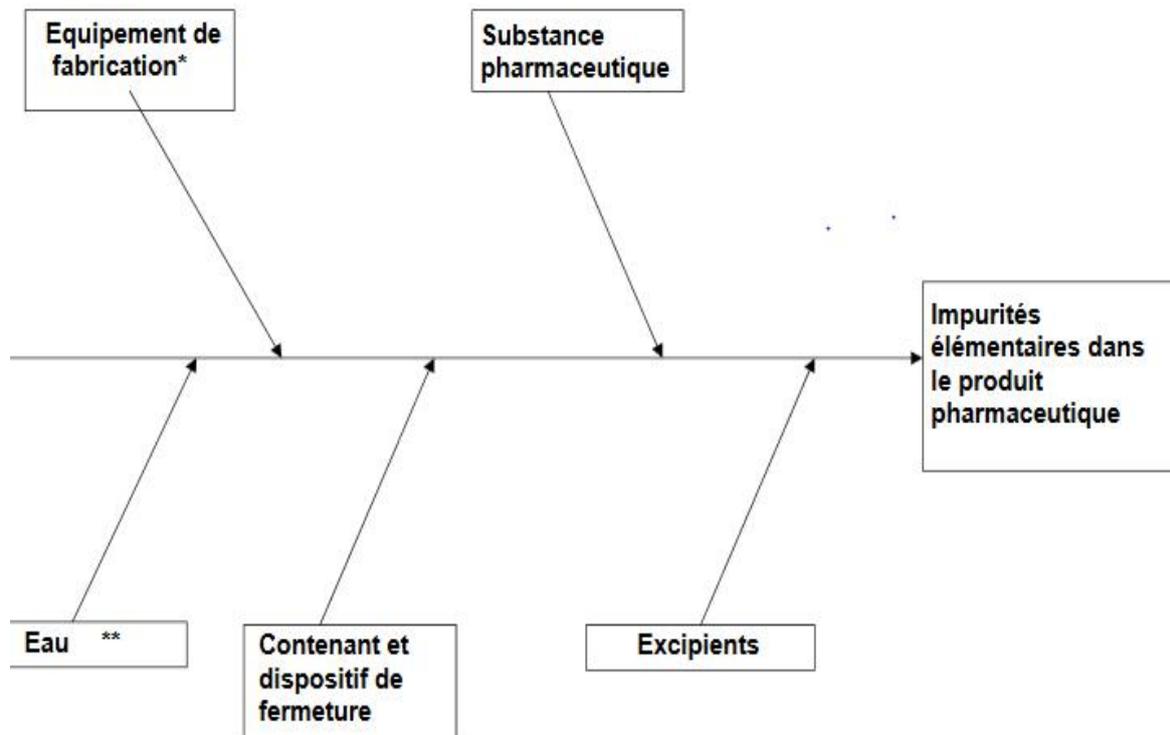


Figure 2. Diagramme illustrant l'impact des substances, d'équipement et des composants sur l'intégrité finale du produit pharmaceutique(29).

III-3/ Classification des impuretés

Il existe de nombreux types d'impuretés. Celles-ci peuvent être classées en 3 grandes catégories (30):

- Impuretés organiques (liées au procédé et au médicament).
- Impuretés inorganiques.
- Solvants résiduels.

III-3-1/ Impuretés organiques

Les impuretés organiques peuvent apparaître durant la fabrication et (ou) le stockage de la substance active, avant la mise en fabrication. Elles peuvent être connues ou non, volatiles ou non et elles comprennent (31):

- Les produits de base.
- Les sous-produits.

- Les intermédiaires de synthèse.
- Les produits de dégradation.
- Les réactifs, les ligands et les catalyseurs.

Un résumé de toutes ces impuretés organiques doit être réalisé en se basant sur les résultats obtenus lors de la phase de développement et des études de la dégradation forcée, ces études sont mises à profit pour révéler les impuretés de dégradations qui regroupent les produits de dégradation de la substance médicamenteuse ou de la réaction du principe actif avec les excipients et/ou le système de conditionnement.

En fonction des seuils qui sont définis dans le guide ICH Q3B (R2), ces impuretés de dégradation sont classées en trois catégories (32) :

- Impureté reportée
- Impureté identifiée
- Impureté qualifiée

Une impureté dite reportée doit être présente sur le bulletin d'analyse, alors que la caractérisation structurale doit être effectuée pour une impureté identifiée.

Pour une impureté qualifiée, il faut effectuer un processus d'évaluation et d'acquisition des données afin d'établir l'innocuité biologique aux teneurs spécifiées (28).

Pour chacune de ces catégories, il existe des seuils qui sont définis soit en fonction de la quantité quotidienne absorbée soit en pourcentage de présence dans le médicament.

Naturellement, le seuil appliqué sera toujours le plus restrictif (28).

La figure 3 regroupe les différents seuils en fonction de dose maximale journalière (32) :

Reporting Thresholds

<u>Maximum Daily Dose¹</u>	<u>Threshold^{2,3}</u>
≤ 1 g	0.1%
> 1 g	0.05%

Identification Thresholds

<u>Maximum Daily Dose¹</u>	<u>Threshold^{2,3}</u>
< 1 mg	1.0% or 5 µg TDI, whichever is lower
1 mg - 10 mg	0.5% or 20 µg TDI, whichever is lower
>10 mg - 2 g	0.2% or 2 mg TDI, whichever is lower
> 2 g	0.10%

Qualification Thresholds

<u>Maximum Daily Dose¹</u>	<u>Threshold^{2,3}</u>
< 10 mg	1.0% or 50 µg TDI, whichever is lower
10 mg - 100 mg	0.5% or 200 µg TDI, whichever is lower
>100 mg - 2 g	0.2% or 3 mg TDI, whichever is lower
> 2 g	0.15%

Figure 3. Seuils des différents types d'impuretés pour les produits finis selon ICH Q3B (R2).

Voici un exemple du Paracétamol comprimé pour un adulte :

- Ce comprimé est dosé de 1g pour chaque unité.
- La posologie maximale chez l'adulte est un comprimé par prise trois fois par jour, la dose maximale sera (3g/jour).

Le tableau 3 récapitule les seuils à respecter pour la classification d'impuretés théoriques provenant du Paracétamol.

Tableau 3. Exemple de classification d'impuretés théoriques (A, B, C et D) provenant du Paracétamol

Type d'impureté	Impureté reportée	Impureté identifiée	Impureté qualifiée
Seuil théorique	0.05%	0.1%	0.15%
A : 0.02%	Non car < 0.05%	Non car < 0.1%	Non car < 0.15%
B : 0.08%	Oui car > 0.05%	Non car < 0.1%	Non car < 0.15%
C : 0.13%	Oui car > 0.05%	Oui car < 0.1%	Non car < 0.15%
D : 0.2%	Oui car > 0.05%	Oui car < 0.1%	Oui car < 0.15%

Dans cet exemple nous pouvons donc conclure qu'il n'y a rien à préciser vis-à-vis de l'impureté A. Par contre il faut reporter l'impureté B, reporter et identifier l'impureté C. Quant à l'impureté D, elle doit être reportée, identifiée et qualifiée.

III-3-2/ Impuretés inorganiques

Les impuretés inorganiques peuvent provenir du procédé de fabrication. Généralement elles sont connues et identifiées et comprennent (31):

- Les réactifs, les ligands et les catalyseurs ;
- Les métaux lourds ;
- Les sels inorganiques ;
- D'autres substances et autres métaux résiduels (par exemple les adjuvants de filtration).

Les métaux lourds représentent une catégorie d'impuretés qu'il est absolument indispensable de rechercher afin de vérifier la conformité de la substance contrôlée. L'essai des métaux lourds permet de rechercher les éléments suivants : (Plomb, Mercure, Ruthénium, Palladium, Antimoine, Cuivre, Cadmium, Or, Vanadium, Etain, Argent, Bismuth, Platine, Arsenic, Molybdène) (27).

III-3-3/ Solvant résiduels

Selon la définition admise, un solvant est une substance généralement liquide possédant la propriété de dissoudre d'autres substances. L'eau en est l'exemple le plus universel.

Néanmoins, on utilise pour de nombreuses applications des solvants organiques (33).

Les solvants peuvent être potentiellement dangereux pour le patient lors de l'utilisation du médicament. Cependant, en raison de la fréquence d'exposition et des quantités manipulées, le personnel chargé de la production du médicament ou de son contrôle peuvent être tout autant soumis aux risques potentiels de ces solvants (27).

III-3-3-1/ Principes généraux de classification des solvants résiduels

Les solvants résiduels ont été évalués pour leur risque possible sur la santé humaine et leur toxicité et sont placés dans l'une des trois classes comme suit (34) :

- Classe 1 : solvants à éviter

Carcinogènes humains connus ou fortement suspectés, dangereux pour l'environnement. Exemples de solvants à éviter : Benzène, Tétrachlorure de carbone.

- Classe 2 : Solvants dont l'utilisation est soumise à limitation.

Carcinogènes animaux non-génotoxiques ou éventuels agents causaux d'autres effets toxiques irréversibles tels que la neurotoxicité ou la tératogénicité. Exemples de solvants à usage pharmaceutique : Acétonitrile, Hexane, Méthanol.

- Classe 3 : Solvants à faible potentiel toxique.

Aucune limite relative à l'exposition n'est exigée. Exemples : Acide acétique, Ethanol, Acétone, Acétate d'éthyle, Acide formique

L'expression « dose journalière tolérable » (DJT) est utilisée par le Programme International de la Sécurité Chimique (IPCS) pour décrire les limites d'exposition aux produits chimiques toxiques, et la "dose journalière acceptable" (DJA) est utilisée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et d'autres autorités et instituts de santé nationaux et

internationaux. Le nouveau terme « exposition journalière autorisée » (EJA) est défini selon le guide d'ICH comme étant un apport pharmaceutiquement acceptable des solvants résiduels, ce que permet d'éviter toute confusion entre les différentes valeurs de dose journalière tolérable ou dose journalière admissible pour une même substance (34).

III-4/ Notion de toxicité

Les impuretés présentes dans les substances actives aussi bien que dans les excipients utilisés, elles peuvent engendrer des conséquences plus ou moins graves et plus ou moins réversibles en termes de santé publique. Ces effets toxiques peuvent de plus s'exprimer aussi bien faiblement et de façon très localisée, que toucher un organe entier, voire l'organisme au complet, avec plus ou moins de virulence. Cette toxicité est à prendre en compte de façon encore plus importante pour les médicaments destinés à être administrés uniquement à des patients dont l'organisme est déjà soumis à des stress ou des complications non physiologiques et pour les sujets immunodéprimés essentiellement. Les effets toxiques peuvent donc être potentialisés du fait de cet état général déficient présenté par les patients (27).

III-4-1/Toxicité des impuretés organiques

Nombreuses monographies ont testé des substances apparentées dérivées de la substance active ou du produit fini qui sont potentiellement dangereuses. Cet essai a pour objectif contrôlé la présence d'impuretés indésirables toxiques ou non.

Un exemple du 4-aminophénol métabolite actif provient de la dégradation du paracétamol peut être très dangereux en cas de contact avec la peau, d'ingestion ou d'inhalation. Même si aucune précision sur les risques d'effets carcinogènes, tératogènes ou mutagènes n'est apportée par la fiche de sécurité (disponible auprès des fournisseurs de matière première), il est impératif de vérifier la non dégradation du paracétamol. D'autant plus que le 4-aminophénol possède également des propriétés néphrotoxiques (27).

En revanche, la monographie du benzoate de métronidazole prescrit un essai de substances apparentées permettant de détecter le métronidazole considéré ici comme impureté. En effet, dans le cadre de cette substance active, le métronidazole pur correspond à un « produit de dégradation » de la substance considérée, et ne doit donc pas être présent dans le produit «

benzoate de métronidazole ». Malgré le Métronidazole pur présente un effet thérapeutique mais l'acide benzoïque, autre produit de dégradation du benzoate de métronidazole peut présenter des risques toxiques. Selon sa fiche de sécurité, il présente une toxicité ciblée sur les poumons, le système nerveux et les membranes muqueuses. Il est donc préférable de vérifier qu'il soit ingéré dans les plus faibles quantités possibles. Il faut tout de même nuancer cette toxicité, car l'acide benzoïque est souvent utilisé dans le domaine pharmaceutique sans danger significatif pour les manipulateurs si les règles en vigueur dans les laboratoires sont respectées. Ce n'est donc pas non plus une substance d'une toxicité extrême. Mais il reste toujours préférable et par précaution, de limiter le plus possible les expositions inutiles à ce produit (27).

La N-nitrosodiméthylamine (NDMA) et N-nitrosodiéthylamine (NDEA), des produits de dégradation du VALSARTAN sont très hautement toxiques en particulier pour le foie, mais aussi peuvent toucher autres organes dont les reins et les poumons. Ils ont la possibilité de détruire les constituants essentiels des cellules (protéines, lipides, acides nucléiques, etc.) et provoquer l'intoxication. Celle-ci peut aller des réactions allergiques (interaction avec certaines protéines) au cancer (attaque de l'ADN) en passant par des nécroses tissulaires (attaque de macromolécules cellulaires) (35).

III-4-2/Toxicité des impuretés inorganiques

La présence potentielle de ces impuretés est presque systématiquement vérifiée car ils sont très couramment utilisés au cours des synthèses et représentent un danger pour la santé publique(27).

Parmi ces éléments, le plomb est le plus fréquemment rencontré, utilisé comme mode d'expression des résultats de l'essai : « ppm de plomb ». Par exemple l'intoxication au plomb peut être extrêmement dangereuse que ce soit chez l'adulte ou chez la femme enceinte, ou allaitant son bébé. En effet, le plomb franchit sans difficulté la barrière placentaire et passe également dans le lait maternel. Chez l'enfant, ces effets peuvent être potentialisés car leurs organes sont en plein développement, et leur absorption intestinale est approximativement trois fois plus importante que chez l'adulte. L'intoxication infantile au plomb s'appelle le saturnisme. C'est une maladie extrêmement grave, qui peut laisser des séquelles très handicapantes. Les effets de l'intoxication au plomb sont regroupés dans la figure 4 suivante(27).

Chapitre III : Substances apparentées

Enfants	Plombémie (µg/l)	Adultes
	1500	
	Décès →	
	1000	← Encéphalopathie
Encéphalopathie →		← Anémie
Néphropathie →		← Longévité diminuée
Anémie →		
Douleurs abdominales →		← Altération de la synthèse d'hémoglobine
	500	← Neuropathie périphérique
↘ Synthèse de l'hémoglobine →	400	← Infertilité masculine
		← Néphropathie
↘ Métabolisme de la vitamine D →	300	← Pression artérielle systolique ↗ (hommes)
		← Acuité auditive ↘
		← Proto porphyrines érythrocytaires ↗ (hommes)
↘ Vitesse de conduction nerveuse →	200	← Proto porphyrines érythrocytaires ↗ (femmes)
↗ Proto porphyrines érythrocytaires →		
↘ (?) Métabolisme de la vitamine D →		
↘ Toxicité neurologique →		
↘ QI →	100	← Hypertension ↗ (?)
↘ Audition →		
↘ Croissance →		
Passage placentaire →		

Figure 4. La relation entre la plombémie et son effet sur les enfants et les adultes (d'après Agency for Toxic Substance and Disease Registry, 1990 ; cité dans Inserm, 1999) (27).

III-4-3/Toxicité des solvants résiduels :

Il n'existe pas un solvant inoffensif, tous les solvants possèdent des risques pour l'utilisateur mais à des degrés variables. Cependant, ils provoquent des effets néfastes sur la santé humaine lorsqu'ils pénètrent par voie pulmonaire surtout (les vapeurs), voie transdermique ou oculaire (contact direct), voie orale (ingestion accidentelle) (33).

Les substances chimiques sont biotransformées au sein de l'organisme en ses métabolites plus ou moins réactifs qui vont s'attaquer aux constituants essentiels des cellules (protéines, lipides, acides nucléiques...) provoquant une intoxication comme les réactions allergiques, les destructions tissulaires voir même des cancers (33).

Tous les solvants organiques sont des déprimeurs du système nerveux central et plus ou moins irritants pour la peau et les muqueuses. Ils ont été reconnus comme susceptibles de provoquer des maladies professionnelles, ces affections engendrées sont citées dans le tableau 84 du régime général élaboré par l'institut national de recherche et de sécurité (INRS) et sont classées en deux types, comme indique le tableau 4 suivant (33) :

Tableau 4. Affections engendrées par les solvants organiques liquides à usage professionnel (33).

Désignation des types de maladies professionnelles	
A	B
<p>-Syndrome ébrieux ou narcotique pouvant aller jusqu'au coma.</p> <p>-Dermites, conjonctivites irritatives.</p> <p>-Lésions eczématiformes récidivant en cas de nouvelle exposition au risque ou confirmées par un test épicutané.</p>	<p>-Encéphalopathies caractérisées par des altérations des fonctions cognitives, constituées par au moins trois des six anomalies suivantes :</p> <p>*Ralentissement psychomoteur ;</p> <p>*Trouble de la mémoire, de la dextérité, de l'organisation ;</p> <p>*Visuospatiale, des fonctions exécutives, de l'attention, et ne s'aggravant pas après cessation de l'exposition au risque.</p>

Le tableau 4 ci-dessus cite les différentes pathologies professionnelles pouvant survenir lors d'une exposition chronique aux solvants organiques liquides, elles sont classées en deux groupes selon la sévérité de la maladie, telles que les maladies du groupe A sont moins sévère que celles du groupe B.

IV-1/Définition

La dégradation forcée ou encore appelée étude de stress, est un essai complémentaire de l'étude de stabilité en temps réel et accélérée. Elle est appliquée sur la substance active ainsi que sur le produit fini au cours du développement, en exerçant des conditions extrêmes par différents facteurs de stress (température, humidité, oxydation, lumière, variation de pH...). Le principal but de cette étude est de mettre en évidence le profil de dégradation des substances concernées, en cherchant les éventuels changements de propriétés physiques (aspects, couleur de la solution, turbidité...) avant de réaliser des analyses chimiques sur les produits de dégradation, formés(36). Dans un premier temps ces conditions extrêmes sont appliquées sur le principe actif pur et dans un deuxième temps et avec les mêmes conditions sont appliquées sur le produit fini afin d'évaluer le comportement du principe actif en présence et en absence des excipients. La dégradation forcée du produit fini vient après la mise au point de la forme galénique (36).

Ces essais sont réalisés pour répondre à plusieurs types d'objectifs intervenant aux différentes phases de développement (36) :

- La connaissance des voies de dégradation des principes actifs et des produits finis ;
- Distinction entre les impuretés de dégradation du principe actif de ceux qui sont générées de substances non médicamenteuses ;
- Maîtrise les conditions pour la conservation ou la manipulation du produit lors des études de stabilité ou lors l'entreposage ;
- Connaître les impuretés qui peuvent apparaître ultérieurement pendant la fabrication de routine, l'entreposage, et donne une prédiction sur les études de stabilité en temps réel et accélérée.
- Comprendre les propriétés chimiques des substances médicamenteuses.
- La mise au point et la validation des méthodes analytiques de dosage et de recherche d'impuretés (spécificité et caractère indicateur de stabilité) ;
- La formation spécifique d'impuretés de dégradation en vue de leur isolement et/ou de leur identification.

Les types de dégradations effectués sur un produit donné sont les suivantes (36) :

- Hydrolyse acide ou alcaline ;

- Dégradation oxyde ;
- Dégradation thermique ;
- Photolyse ;
- Dégradation par l'humidité.

IV-2/ Types de la dégradation forcée

IV-2-1 / Dégradation à un pH modifié

La dégradation acide et la dégradation alcaline sont des réactions chimiques les plus courantes et les plus adoptées dans les études de la dégradation forcée des produits pharmaceutiques, lesquelles sont effectuées sur une large gamme de pH. En effet, la dégradation à un pH modifié est un processus qui provoque la décomposition chimique du produit étudié par un acide ou une base en induisant l'apparition des produits de dégradation de différentes compositions chimiques (37).

Ce type de test peut être étudié en mettant le médicament en contact avec l'acide chlorhydrique (HCl) qui est un acide fort ou avec l'hydroxyde de sodium (NaOH) qui est une base forte (37).

L'analyse des résultats est réalisée selon un arbre décisionnel qui est détaillé ci-dessous (37) :

1. S'il y'a une dégradation raisonnable observée, les tests peuvent être arrêtés à ce stade ;
2. Si aucune dégradation n'est observée dans ces conditions, le médicament doit être chauffé légèrement dans des conditions acides ou alcalines de force plus élevée et pendant une durée plus longue ;
3. Si une dégradation totale est observée après avoir soumis les médicaments à l'état initial, la force acide ou alcaline peut être diminuée avec une diminution de la température de réaction voir même diminuer la durée de dégradation. (Comme l'illustre la figure 5)

L'hydrolyse de la plupart des médicaments dépend de la concentration relative des ions hydronium (H^+) venus de l'acide chlorhydrique, et des ions hydroxydes (OH^-) venus de l'hydroxyde de sodium. Ces tests permettent de connaître la sensibilité du produit aux

conditions acides ou aux conditions alcalines, par conséquent on va déterminer pour chaque médicament testé un pH optimal auquel il est plus stable (37).

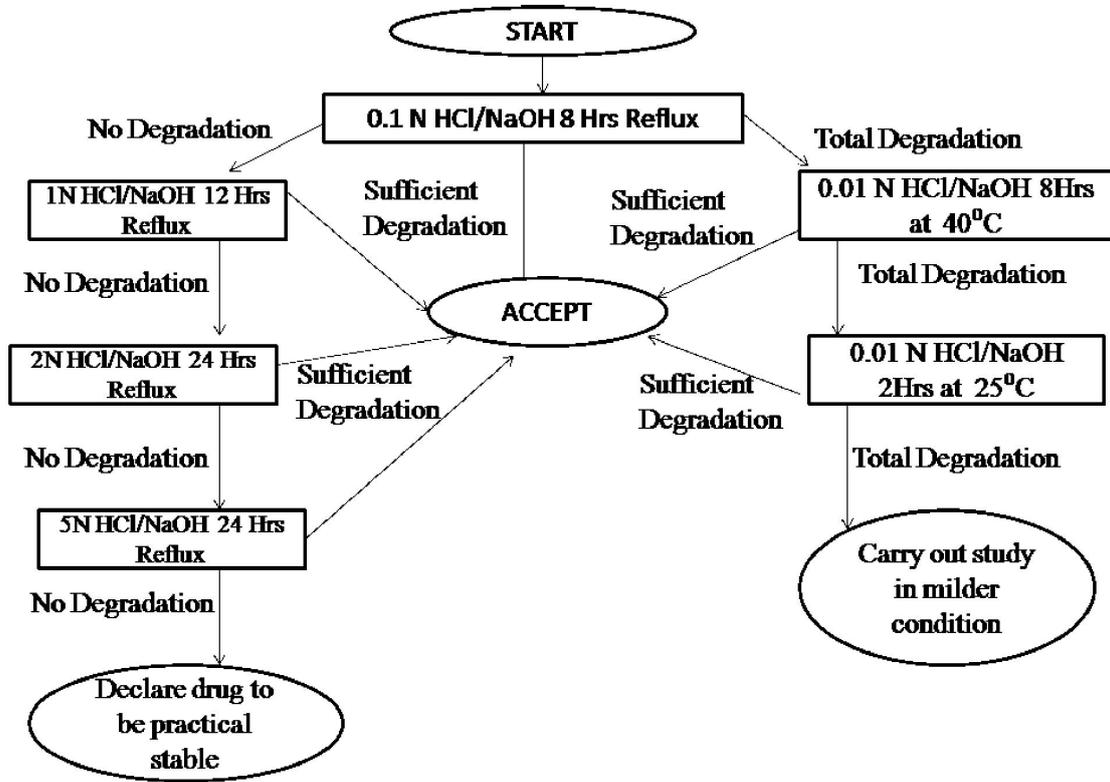


Figure 5. L'arbre décisionnel de la dégradation acide/alcaline d'un médicament (37)

IV-2-2/ Dégradation oxyde

Nombreuses substances médicamenteuses subissent une auto-oxydation, c'est-à-dire une oxydation dans des conditions de stockage normales en impliquant l'oxygène élémentaire de l'air. C'est donc une voie de dégradation importante de nombreux médicaments exposés à l'air. L'auto-oxydation est une réaction spontanée qui nécessite un initiateur de radicaux libres pour commencer la réaction en chaîne. Le peroxyde d'hydrogène, les ions métalliques ou des traces d'impuretés dans une substance médicamenteuse agissent comme des initiateurs de l'auto-oxydation (37).

Le peroxyde d'hydrogène est le plus couramment utilisé pour induire la dégradation oxydative de la substance active, il est suggéré d'utiliser ce réactif dans la plage de

concentration de 3 à 30 %. Dans certains médicaments, une dégradation importante est observée lorsqu'ils sont exposés à 3% de peroxyde d'hydrogène pendant une période de temps très courte à température ambiante, dans d'autres cas, l'exposition à une concentration élevée de peroxyde d'hydrogène, même dans des conditions extrêmes, ne provoque aucune dégradation significative. Le comportement est conforme aux attentes, car certains médicaments sont en fait dégradables par l'oxydation, alors que d'autres ne le sont pas. Ces derniers ne devraient montrer aucun changement même en présence d'une forte dose d'agent oxydant (38).

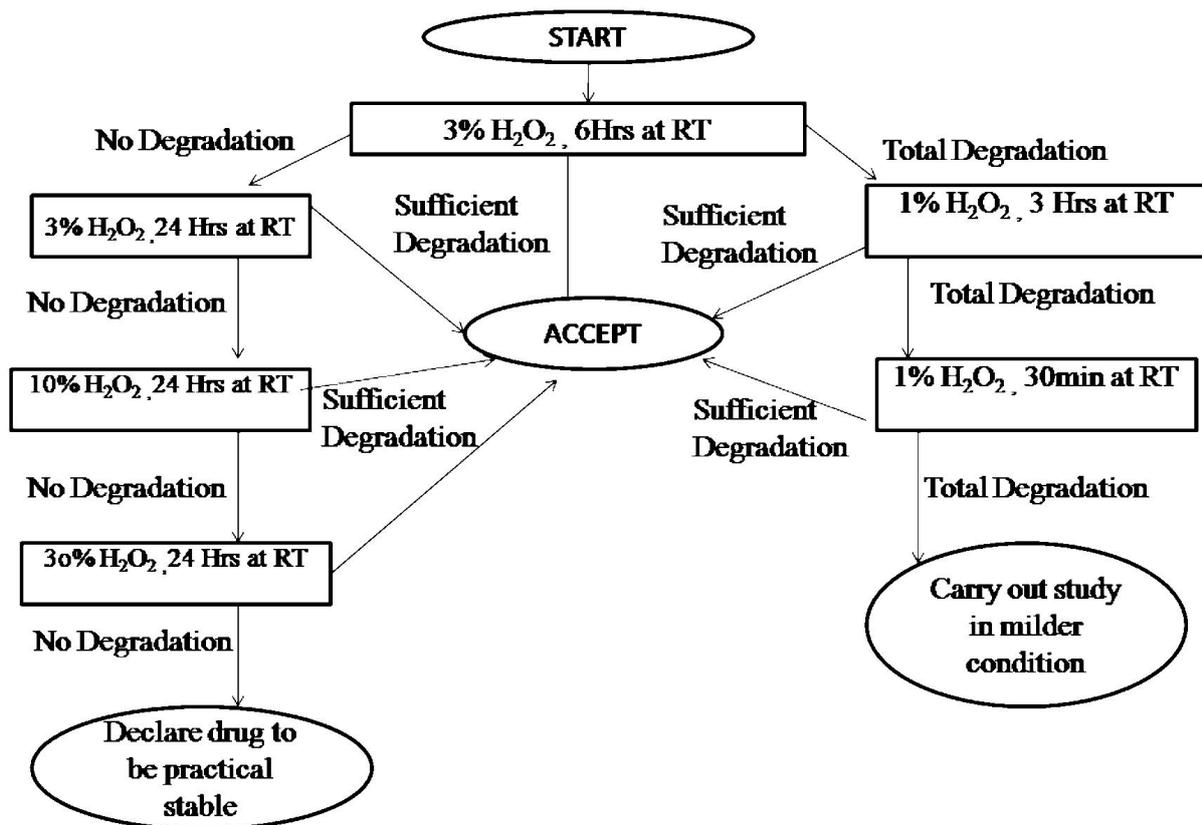


Figure 6. L'arbre décisionnel de la dégradation dans des conditions oxydantes d'un médicament (37).

IV-2-3/ Dégradation thermique

Généralement la vitesse des réactions chimiques dépend fortement de la température, les médicaments sont susceptibles de se dégrader à des températures plus élevées. De nombreux principes actifs sont sensibles à la chaleur ou aux températures tropicales, rentrent dans la composition des médicaments thermo-dégradable (37).

Pour étudier l'influence de la température, on effectue plusieurs études isothermes à différentes températures. Pour chaque température, on cherche à établir la loi de vitesse et à déterminer le coefficient de vitesse puis on cherche à établir une relation entre la valeur du coefficient de vitesse et la température (39).

L'effet de la température sur la dégradation thermique d'une substance est étudié par l'équation d'Arrhenius :

$$K = A. e^{-E_a/RT} \text{ Avec :}$$

- K : coefficient de vitesse.
- A : le facteur pré-exponentiel.
- E_a : l'énergie d'activation de la réaction en Joule (calorie).
- R : la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$).
- T : la température en Kelvin.

En général, la forme de la loi de vitesse ne change pas avec la température, seule la valeur du coefficient de vitesse varie, elle augmente fortement avec la température. Le diagramme suivant confirme la relation directement proportionnelle entre le logarithme népérien de la constante de vitesse et la température(39) :

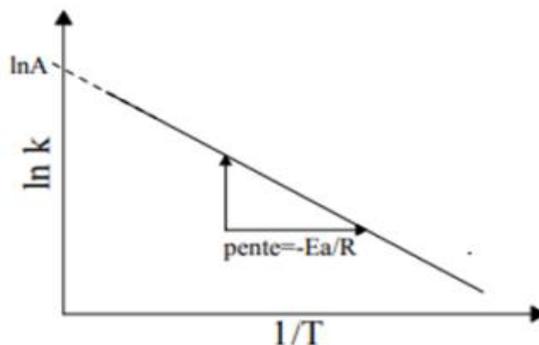


Figure 7. Diagramme d'Arrhénius représente l'évolution du logarithme népérien du coefficient de vitesse en fonction de $1/T$ (39).

L'étude de la dégradation thermique est réalisée entre 40°C et 80°C. La température la plus largement acceptée est de 70°C à faible et à forte humidité pendant 1 à 2 mois. Une température élevée (> 80°C) peut ne produire aucune dégradation prédictive.

L'utilisation de hautes températures dans les études prédictives de dégradation suppose que la molécule de médicament suivra la même voie de décomposition à toutes les températures. Cette hypothèse peut ne pas être vraie pour toutes les molécules de médicament, et par conséquent, il faut faire très attention en utilisant les températures extrêmes facilement accessibles dans une expérience micro-ondes en récipient scellé pour les études de dégradation prédictive (37).

IV-2-4/ Dégradation par la lumière

L'exposition des molécules médicamenteuses aux sources lumineuses peut provoquer la dégradation de celles-ci par un mécanisme photolytique. Le taux de la photo-dégradation dépend de l'intensité de la lumière incidente et de la quantité de lumière absorbée par la molécule du médicament. La dégradation photolytique est effectuée en exposant la substance médicamenteuse (sous forme solide ou en solution) ou le produit médicamenteux à une combinaison de lumière visible et UV (ultra-violet). La longueur d'onde de lumière la plus communément acceptée se situe dans la plage de 300 à 800 nm pour provoquer la dégradation photolytique (37).

ICH Q1B établit les exigences pour les tests de photo-stabilité pour les nouvelles substances médicamenteuses et nouveaux produits pharmaceutiques. L'article de test est directement exposé à une lumière intense (1,2 million de lux heures par exemple) lors de la première étape des tests de photo-stabilité, si aucun effet indésirable n'est observé, le produit n'est pas sensible à la lumière. Néanmoins, s'il est affecté par la lumière, l'étape suivante consiste à placer le matériau dans son contenant primaire, tel qu'une bouteille ou un blister, et à répéter le test. Si l'effet indésirable persiste, la dernière étape consiste à répéter l'étude dans son conditionnement secondaire (l'emballage final) qui devrait protéger le contenu de la lumière, par exemple des blisters en aluminium ou opaques, des bouteilles opaques, des sachets ou des cartons. Selon les résultats, le produit devra probablement être étiqueté pour une protection contre la lumière (40).

La dégradation photolytique peut se produire par une réaction oxydante ou non oxydative. La réaction photolytique non oxydante comprend l'isomérisation, la dimérisation, la cyclisation, les réarrangements, la décarboxylation et le clivage hémolytique des hétéro-liaisons X-C, la liaison N-alkyle (désalkylation et désamination), la liaison SO₂-C...etc. tandis que la réaction photolytique oxydative se produit par le mécanisme de l'oxygène singulet (¹O₂) ou de l'oxygène triplet (³O₂) (37).

L'oxygène singulet réagit avec les liaisons insaturées, telles que les alcènes, les diènes, les hydrocarbures aromatiques polynucléaires pour former des produits de dégradation photo-oxydante, tandis que l'oxygène triplet réagit avec le radical libre de la molécule de médicament, pour former du peroxyde. La lumière peut également agir comme catalyseur des réactions d'oxydation par exemple, la photo-dégradation de TIENOXOLOL un bêtabloquant faisant partie des médicaments antihypertenseurs, implique la formation probable de deux impuretés dont le pic de la première impureté est observé après 4.84min et le pic de la deuxième impureté est observé après 5.96min(10). Le deuxième exemple de la photo-dégradation est observé avec le BARNIDIPINE autre antihypertenseur qui agit par antagonisme des canaux calciques, lorsqu'il est exposé à la lumière UV, il y aura apparition de l'oxygène singulet qui peut modifier ou détruire les tissus, provoquant des dommages importants et une perte d'activité thérapeutique.

Par conséquent, la caractérisation du processus de photo-dégradation implique l'étude des espèces transitoires et l'interaction entre le précurseur et les produits, cette caractérisation est

considérée comme un moyen crucial pour comprendre la photo toxicité potentielle d'un médicament et de la déterminer (37).

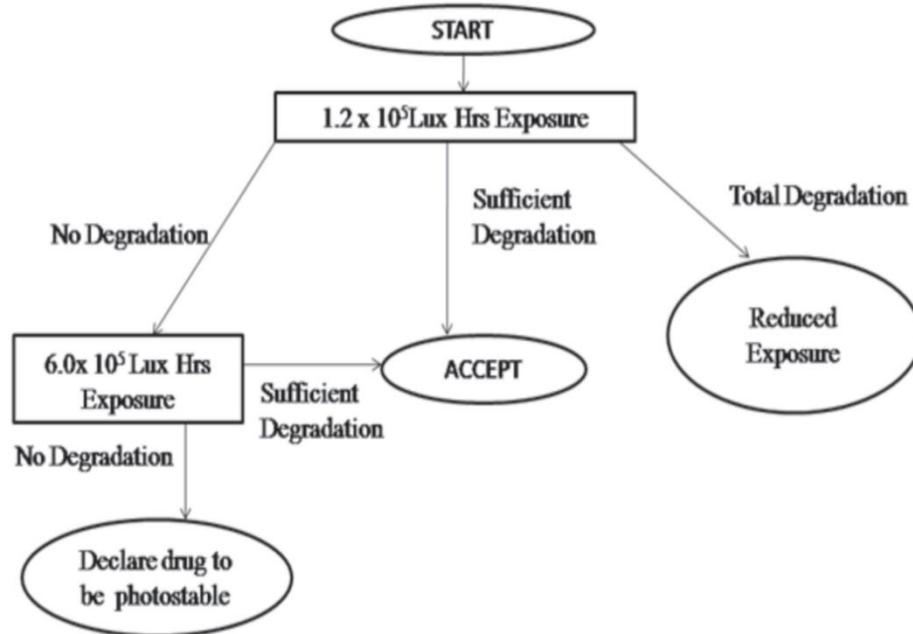


Figure 8. Arbre décisionnel de la dégradation d'un médicament par la lumière (37).

IV-2-5/ Influence de l'humidité sur le produit pharmaceutique

La vapeur d'eau peut nuire à l'aspect physique du médicament et surtout entraîner la dégradation de la substance ou sa distribution irrégulière sous la forme du médicament, ce qui influence négativement le dosage, donc l'augmentation de la teneur en humidité des poudres médicinales commerciales augmente la mobilité moléculaire et la réactivité chimique.

De plus, la majorité des molécules thérapeutiques synthétiques sont sensibles au taux d'humidité relative élevé, surtout celles qui possèdent des groupes fonctionnels dégradables par la molécule d'eau comme la fonction ester et la fonction amide, dans ce contexte on peut donner l'exemple du paracétamol qui contient le groupe amide qui peut être sensible à la dégradation hydrolytique. Non seulement les radicaux de la molécules actives mais aussi certaines formes galéniques sont très hautement sensibles à la variation hygrométrique comme

l'exemple des comprimés effervescents, dont l'étude de stress dans des conditions hygrométriques extrêmes est strictement obligatoire (41).

La ligne directrice ICH Q1A précise que le taux d'humidité résiduelle auquel on doit effectuer les études de la dégradation forcée soit au minimum 75% (17).

IV-3/ Méthode de dosage des produits de dégradation :

En principe, l'analyse chimique des impuretés provenant de la dégradation forcée est effectuée au moyen de la chromatographie liquide à haute performance, CLHP (en anglais : *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) avec un détecteur ultraviolet-visible (UV-visible) ou un détecteur à barrette diode (en anglais : *diode array detection* DAD), et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, CL-SM (en anglais : *Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry*, LC-MS).

IV-3-1/Chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie dans son terme général désigne une méthode physico-chimique séparative très utilisée en analyse chimique pour identifier et quantifier des espèces moléculaires ou ioniques présentes, même à l'état de traces, dans toutes sortes d'échantillons. Son principe repose sur les différences d'affinité des composés du mélange quand ils sont mis en présence de deux phases non miscibles. L'une est immobile (dite phase stationnaire) alors que la seconde, dite phase mobile, se déplace au contact de la première, entraînant les composés du mélange analysé et provoquant leur séparation si les vitesses sont différentes (42).

La chromatographie liquide à haute performance fait partie des techniques chromatographiques qui font appel à une phase mobile liquide, est une technique d'analyse séparative et préparative utilisée à des fins d'identification et/ou de quantification. Les molécules à séparer sont entraînées par un fluide liquide qui constitue la phase mobile à travers un support fixe contenant un solide finement divisé ou un liquide fixé, constituant la phase stationnaire (colonne chromatographique), c'est insoluble dans la première phase. En effet, les interactions chimiques ou physiques avec la phase mobile ainsi que la phase stationnaire diffèrent d'un analyte à un autre par différence d'affinité, donnant pour chaque

composé un coefficient de partage qui lui est propre. Si plusieurs composés sont présents (mélange), ils se trouvent alors entraînés à des vitesses différentes qui selon leurs coefficients de partage provoquent leur séparation.

A la fin la détection se fait, et la conversion du signal chromatographique en signal électrique est effectuée par plusieurs techniques spectrométriques d'identification, soit détecteur à UV ou DAD, ça va permettre d'obtenir une quantification exacte de chacun des composants du mélange (43).

D'une façon générale, Les méthodes chromatographiques peuvent être classées selon le phénomène chromatographique qui dépend de la nature de la phase stationnaire, d'après cette classification les cas suivants sont considérés (10) :

- **La chromatographie d'adsorption**, lorsque la phase stationnaire est un solide doué de propriétés adsorbantes, tels que l'oxyde d'aluminium, les silicates de magnésium, les gels de silice. Elle met à profit la propriété que possèdent certaines substances en solution d'être retenues par la surface d'une phase stationnaire très finement divisée appelée adsorbant. Les composants sont simplement plus ou moins retenus à la surface de la phase stationnaire par adsorption physique. C'est une technique qui prend en compte la polarité des composants.
- **La chromatographie de partage**, lorsque la phase stationnaire est un liquide non miscible à la phase mobile. Le phénomène mis en jeu est un phénomène de partage entre deux liquides non miscibles. Il implique que ces substances soient solubles dans ces deux phases, mais que leurs solubilités soient différentes. Les analytes sont séparés en fonction de leur affinité avec les phases stationnaire et mobile. L'affinité dépend de la polarité des analytes et des phases. En mode normal la phase stationnaire est polaire, en mode inverse elle est apolaire. Dans la chromatographie à polarité de phases normale, le lit du matériau stationnaire est de nature fortement polaire (silice par exemple) et la phase mobile est apolaire (par exemple n-hexane ou tétrahydrofurane). Ce type de colonne retient donc les composés polaires plus longtemps que les composés moins polaires ou apolaires. La chromatographie à polarité de phases inversée, inverse cette situation : le lit de matériau stationnaire est de nature apolaire (hydrocarbures) et la phase mobile est constituée par un liquide polaire (par exemple eau ou alcool). Un composé y est retenu d'autant plus longtemps que sa polarité est faible.
- **La chromatographie par échanges d'ions** où la phase stationnaire est formée de macromolécules (résines) portant des groupements fonctionnels acides ou basiques qui permettent l'échange de certains de leurs ions avec des ions de même signe du mélange à

chromatographier. Le phénomène de séparation repose sur cette propriété d'échange et ne peut s'appliquer qu'aux composés ayant des groupements échangeables, c'est-à-dire aux molécules ioniques ou ionisables. Plus la charge d'un ion de la molécule est grande, plus cet ion est attiré par ceux de la phase stationnaire et plus son temps d'élution est long.

- **La chromatographie d'exclusion**, diffusion, ou chromatographie par perméation de gel ou plus simplement chromatographie sur gel, dans laquelle la phase stationnaire est constituée d'un système poreux, tel que le gel, qui se comporte comme un véritable tamis vis-à-vis des molécules ayant des masses et des structures différentes. Cette méthode repose sur le comportement dissemblable de molécules, de volumes différents, vis-à-vis des grains poreux d'une phase stationnaire constituée par un gel : les molécules diffusent à l'intérieur des grains du gel ou en sont exclues.

La connaissance des masses molaires, des polarités et des caractères ioniques des solutés va orienter le choix de la méthode chromatographique à mettre en œuvre pour réaliser leur séparation (44) :

- a. Pour les molécules de masses molaires élevées ($> 10\ 000\ \text{g mol}^{-1}$), on utilise généralement une des deux méthodes d'exclusion : la perméation de gel pour les espèces non polaires et la filtration de gel pour les composés polaires ou ioniques.
- b. Pour les espèces ioniques de faibles masses molaires, on utilisera la chromatographie par échange d'ions.
- c. Pour les petites molécules non ioniques on préférera les analyser par des méthodes de partage.

IV-3-2/ Avantages de l'utilisation de HPLC-DAD pour le dosage des impuretés

L'utilisation de HPLC-DAD pour le dosage des impuretés, présente les avantages suivants :

- Le détecteur DAD augmente la chance de révéler les produits de dégradation pertinents à partir d'une étude de dégradation forcée

- La détection concomitante d'une large gamme des spectres UV différents de celui de la substance active, puisque cette technique permet de détecter toutes les substances qui absorbent dans un intervalle donné de longueur d'onde dans l'UV.
- Evaluation de la pureté des pics, et la co-élution des pics interférés entre eux (40) (45) .

IV-3-3/ Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (en anglais : *Mass Spectrometry*, MS) est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse molaire, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Le composé est d'abord ionisé (technique d'ionisation), les ions sont ensuite séparés selon leur rapport masse/charge (technique de séparation d'ions) et le nombre d'ions de chaque « unité » masse / charge est enfin enregistré sous la forme d'un spectre(46).

Le spectromètre de masse est fragmenté en quatre parties (46) :

- 1) **Le système d'introduction de l'échantillon** : l'échantillon peut être introduit directement dans la source, sous forme gazeuse, liquide (infusion directe) ou solide (canne d'introduction directe, dépôt sur plaque MALDI...) ou encore par l'association à une méthode séparative (chromatographie en phase liquide, chromatographie en phase gazeuse, électrophorèse capillaire...).
- 2) **La source d'ionisation** : elle consiste à ioniser et vaporiser les molécules. Elle peut être utilisée soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Plusieurs types de sources existent et sont utilisés en fonction du résultat recherché et des molécules analysées par exemple :
 - L'impact électronique (EI) et l'ionisation chimique (CI) ;
 - Le bombardement par atomes rapides (FAB) ;
 - L'électro nébulisation ou électro spray (ESI),
 - La désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI).
- 3) **L'analyseur** : il sépare les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Il existe des analyseurs basse résolution, et des analyseurs haute résolution, permettant de mesurer la masse exacte des analytes. Ces analyseurs peuvent être couplés entre eux pour réaliser

des expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). En général, un premier analyseur sépare les ions, une cellule de collision permet de fragmenter les ions, et un second analyseur sépare les ions fragments. Certains analyseurs, comme les pièges à ions, constituent plusieurs analyseurs en un et permettent de fragmenter les ions et d'analyser les fragments directement.

- 4) **Le détecteur et système de traitement** : le détecteur transforme les ions en signal électrique. Plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. De plus, le détecteur amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être traité informatiquement.

V-1/ Définition

La validation est une exigence réglementaire indispensable dans le cycle de vie de tout médicament, elle est utilisée en particulier pour les procédés de fabrication, de nettoyage, les systèmes informatisés et les méthodes analytiques. La validation dans son terme général, est la preuve documentée que le procédé mis en œuvre dans des conditions opératoires précises et définies, permet d'obtenir de façon reproductible et efficace un résultat conforme à des spécifications préalables (47). Après le développement de chaque nouvelle procédure d'analyse, la validation intervient pour confirmer la performance de la méthode conçue. En effet, la fiabilité du résultat analytique fourni par la méthode doit être améliorée au préalable lors des étapes de développement pour tendre vers une confiance accrue qui sera attestée durant cette étape (48) . La validation analytique d'une méthode correspond à l'étude de plusieurs critères, qui sont : la spécificité, la linéarité, la justesse, la fidélité, l'exactitude, la limite de détection, la limite de quantification, la robustesse...etc (49).

La spécificité (sélectivité)

C'est la capacité d'une procédure analytique à permettre l'évaluation univoque de la substance à analyser en présence d'autres composés potentiellement présents, cette définition implique (49):

- Identification : garantit l'identité de l'analyte.
- Tests de pureté : pour s'assurer que toutes les procédures analytiques effectuées rapportent avec précision la teneur en impuretés de l'analyte, c'est-à-dire le test des substances apparentées, les métaux lourds, la teneur en solvants résiduels.
- Dosage (teneur ou puissance) : pour fournir un résultat exact qui permet une déclaration précise de la teneur ou la puissance de l'analyte dans un échantillon.

Le manque de spécificité d'une procédure analytique individuelle peut être compensé par d'autres procédures analytiques complémentaires(49).

La justesse

La justesse d'une méthode exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur trouvée et la valeur qui est acceptée soit par les spécifications, soit comme valeur de référence(49).

La fidélité

Ça 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 variance, écart type ou coefficient de variation à partir d'une série de mesures. La fidélité peut être évaluée à trois niveaux (49) :

- La **répétabilité** exprime la fidélité sous des conditions opératoires identiques et sur un court intervalle de temps. La répétabilité est également appelée fidélité intra-série.
- La **fidélité intermédiaire** exprime les variations intra-laboratoires : jours différents, analystes différents, équipements différents... La fidélité intermédiaire aussi appelée fidélité inter-série.
- La **reproductibilité** exprime l'étroitesse des résultats obtenus dans des laboratoires différents, encore appelée la fidélité inter-laboratoires.

La combinaison entre la justesse et la fidélité d'un mesurage constitue l'exactitude de la méthode.

La linéarité

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à prédire des concentrations retrouvées proportionnelles aux concentrations théoriques d'une série d'échantillons(49).

La limite de détection

C'est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon qui peut être détectée, mais pas forcément quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites dans la procédure(49).

La limite de quantification

C'est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon qui peut être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une fidélité et justesse appropriées. La limite de quantification est un paramètre de dosage quantitatif pour les composés de petite quantité dans

les matrices d'échantillons, et est utilisée notamment pour la détermination des impuretés et/ou des produits de dégradation(49).

La robustesse

C'est une mesure de la capacité d'une méthode d'analyse à supporter sans conséquence de petites variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode, elle donne une idée de la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation(49).

L'écart d'utilisation

C'est l'intervalle entre les concentrations supérieures et inférieures (quantités) d'analytes (y compris ces concentrations) dans un échantillon dont il a été démontré que la procédure analytique fournit des valeurs acceptables et possède un niveau approprié de fidélité, justesse et de linéarité(49).

V-2/ Type de validation

On distingue deux types de validation, la validation intra-laboratoire et la validation inter-laboratoire (49).

- **La validation intra-laboratoire**, c'est une validation interne concernant l'ensemble des méthodes analytiques développées par un laboratoire. La présente d'étude se limite intégralement à ce type de validation.
- **La validation inter-laboratoire**, concerne principalement les méthodes analytiques destinées à être utilisées par plusieurs laboratoires, ou bien dont les résultats vont servir lors d'échanges commerciaux. Ce type de validation nécessite de plus, le calcul des limites de reproductibilité de la méthode. En effet, il se rencontre rarement dans l'industrie pharmaceutique où les méthodes sont utilisées en interne, et très fréquemment dans l'industrie agro-alimentaire, donc il faut impérativement réaliser une validation inter-laboratoire pour des méthodes destinées à mesurer la conformité d'une denrée lors d'un échange commercial.

V-3/ Objectifs de la validation

Les principaux objectifs de la validation d'une procédure analytique sont (3) :

- Démontrer que la méthode est adaptée à l'usage auquel elle est destinée ;
- Argumenter son aptitude de donner des résultats conformes aux exigences normatives et réglementaires en vigueur ;
- Obtenir une estimation sur l'exactitude de la méthode ;
- Évaluer le risque statistique associé à son utilisation, qui peut être exprimé en termes d'incertitude de mesure associée aux résultats.

On entend par une incertitude, tout paramètre associé au résultat d'une mesure qui caractérise la dispersion des valeurs que l'on peut raisonnablement attribuer à un mesurage. En effet, l'introduction de concept du profil d'exactitude et la limite d'acceptabilité aux méthodes de validation basées sur l'estimation des critères classiques de validation comme la justesse, la fidélité et la linéarité permet d'évaluer et réduire le risque d'incertitude des résultats. Certes, parmi les principes de la validation est d'avoir des résultats très probables ça veut dire des valeurs obtenues appartiennent à un intervalle de tolérance où on s'attend à avoir une proportion ($\beta\%$) des futurs résultats. Cependant, il faut assurer que la différence entre chaque mesure X d'un échantillon et sa vraie valeur inconnue μ soit à l'intérieur de limites d'acceptabilité prédéfinies selon les objectifs de la méthode, ça permet encore de garantir que chaque mesure qui doit être réalisée en routine est comprise dans une limite d'acceptation appropriée au type de procédure analytique et au produit concerné (48).

V-4/ Les différents types de procédures analytiques à valider

Bien que toutes les procédures analytiques nécessitent une validation analytique avant toute application, mais la discussion sur la validation porte essentiellement sur les quatre types de procédures les plus courants qui sont énumérés ci-dessous (49) :

- **Les tests d'identification** sont destinés à vérifier l'identité d'un analyte dans un échantillon. Ceci est normalement réalisé en comparant une propriété de l'échantillon (par exemple, le spectre, le comportement chromatographique, la réactivité chimique, etc.) à celle d'un étalon de référence.

- **Les tests de dosage de la substance active ou autres composants du produit médicamenteux**, ces procédures sont destinées à mesurer l'analyte présent dans un échantillon donné. Dans ce contexte, le dosage représente une mesure quantitative du ou des principaux composants de la substance médicamenteuse. Pour le produit pharmaceutique, des caractéristiques de validation similaires s'appliquent également lors de l'analyse du composant actif ou d'autres composants sélectionnés. Les mêmes caractéristiques de validation peuvent également s'appliquer aux analyses associées à d'autres procédures analytiques (par exemple le test de dissolution).

- **Les tests quantitatifs pour la teneur en impuretés / les essais de limite pour le contrôle des impuretés**, l'un ou l'autre test est destiné à refléter avec précision les caractéristiques de pureté de l'échantillon. Des caractéristiques de validation différentes sont requises pour un essai quantitatif et pour un essai limite.

Il existe de nombreuses autres procédures analytiques, telles que la détermination de la taille des particules pour la substance médicamenteuse ou les tests de dissolution pour les produits médicamenteux, celles-ci n'ont pas été abordées dans le texte initial sur la validation des procédures analytiques. La validation de ces procédures analytiques supplémentaires est tout aussi importante que celles énumérées ci-dessus (49).

Le tableau suivant répertorie les critères plus importants qui doivent être évalués pour la validation de chaque type de procédure analytique :

Tableau 5. Types de méthode d'analyse à valider (49).

Type de procédure analytique Les critères de validation	Identification	Dosage des composants du médicament	Dosage des impuretés	Essais des limites d'impuretés
Justesse	-	+	+	-
Répétabilité	-	+	+	-
Fidélité intermédiaire	-	+ (1)	+ (1)	-
Spécificité (2)	+	+	+	+

Limite de détection	-	-	- (3)	+
Limite de quantification	-	-	+	-
Linéarité	-	+	+	-
L'écart d'utilisation	-	+	+	-

- : caractéristique n'est normalement pas évaluée.

+ : caractéristique est normalement évaluée.

(1) : dans les cas où la reproductibilité a été effectuée, la fidélité intermédiaire n'est pas nécessaire.

(2) : le manque de spécificité d'une procédure analytique pourrait être compensé par d'autres procédures analytiques complémentaires.

(3) : peut être nécessaire dans certains cas.

V-5/ Différents paramètres évalués pour la validation d'une méthode d'analyse (méthodologie)

Il est généralement 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, justesse et fidélité). En Outre, il faut utiliser des équipements qualifiés et des étalons de référence bien caractérisés et de pureté connue durant toutes les étapes de la validation. Le degré de pureté nécessaire dépend de l'usage préconisé (49).

V-5-1/ Spécificité

La notion de spécificité est définie en section V-1, et le tableau 5 montre qu'il convient d'évaluer la spécificité des tests d'identité, de dosage des impuretés et ses limites tolérables ainsi de la teneur. Le choix des moyens utilisés pour démontrer la spécificité dépend de l'objectif de la méthode d'analyse.

Pour une forme posologique finie, les composants d'intérêt comprennent des ingrédients placebo tels que des excipients et des conservateurs ainsi que des impuretés et des produits de dégradation. La spécificité d'une méthode est évaluée par une série d'études. Lorsque le profil d'impureté et de dégradation d'un principe actif et/ou d'un produit médicamenteux est bien établi, on doit ajouter dans la matrice d'échantillon un niveau approprié de chaque composant, et la démonstration d'une séparation adéquate dans des chromatogrammes représentatifs est une preuve particulièrement solide de la spécificité de la méthode. Des bons résultats de récupération provenant d'études avec placebo enrichi indiquent que la matrice n'interfère pas avec l'extraction ou la mesure de la substance active sont des preuves importantes montrant la spécificité de la méthode (40). Le cas échéant, lorsqu'une seule technique n'est pas suffisante pour démontrer la spécificité, il est recommandé d'utiliser au moins deux méthodes pour atteindre le degré de discrimination voulu (49).

Spécificité d'identification, Les tests d'identification acceptables doivent permettre la distinction entre des composés ayant une structure très proche qui sont susceptibles d'être présents. Le pouvoir discriminatif d'une méthode est confirmé lorsqu'on obtient des résultats positifs (éventuellement par comparaison avec un matériau de référence connu) avec des échantillons contenant l'analyte, couplés aux résultats négatifs avec des échantillons qui n'en contiennent pas. On peut de plus soumettre aux tests d'identification des substances semblables ou très proches de la substance à analyser pour bien vérifier qu'elles ne donnent pas de réaction positive. Le choix des substances susceptibles d'influencer les résultats de l'analyse doit être fondé sur une appréciation scientifique solide et éclairée dans laquelle on a tenu compte de l'influence que peuvent avoir les substances en question.

Spécificité des tests de dosage des impuretés (49) ,pour démontrer la spécificité des procédures chromatographiques, on doit utiliser des chromatogrammes représentatifs où chacune des composantes est convenablement identifiée et étiquetée de manière appropriée. Des considérations similaires s'appliquent aux autres techniques de séparation. L'examen des séparations chromatographiques critiques doit être aussi poussé qu'il est nécessaire. La spécificité de ces méthodes est démontrée par la résolution des deux composantes dont les pics d'éluion sont les plus proches l'un de l'autre Si la méthode de détermination de la teneur des impuretés dans l'échantillon à analyser 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 (spécifique à la substance médicamenteuse seulement), on pourra le compléter en ajoutant un test de dosage approprié pour les impuretés.

La validation des méthodes de détermination de la teneur des impuretés se fait suivant une approche semblable (49):

- **Lorsque les impuretés sont disponibles** ; pour le dosage, on démontre la discrimination de l'analyte en présence d'impuretés et/ou d'excipients. En pratique, on enrichit la substance pure (substance active ou produit fini) avec une quantité suffisante d'impuretés et/ou d'excipients et en démontrant que le résultat du test n'est pas influencé par la présence de ces ajouts (par comparaison au résultat du test obtenu avec des échantillons non enrichit).

Pour le test d'impuretés, la discrimination peut être établie en dopant la substance active ou le produit avec des niveaux appropriés d'impuretés et en démontrant la séparation de ces impuretés individuellement et/ou des autres composants dans la matrice de l'échantillon.

- **Lorsque les impuretés ne sont pas disponibles** ; si des étalons d'impuretés ou de produits de dégradation ne sont pas disponibles, on peut démontrer la spécificité en comparant les résultats obtenus avec des échantillons contenant des impuretés ou des produits de dégradation aux autres méthodes d'analyse bien connues, par exemple : méthode de la pharmacopée ou autre procédure analytique validée (procédure indépendante). Le cas échéant, certains nombres des échantillons analysés par ces procédures doivent avoir été exposés aux conditions de stress pertinentes : lumière, chaleur, humidité, hydrolyse acide/base et oxydation.

Une évaluation de pureté des pics peut être utile pour démontrer que le pic chromatographique correspondant à la substance à analyser n'est pas attribuable à plus d'une substance (par exemple on utilise la technique de dosage par HPLC couplée à un détecteur à barrette de diodes (ou HPLC-DAD), spectrométrie de masse) (49).

Tableau 6. Exemple d'une étude de spécificité d'une méthode de dosage (48).

Solution	Tr pic de marqueur (min)	Superposition spectrale (200-450 nm)
Blanc de dilution	Absence	
Standard d'étalonnage	20.353	Conforme
Standard de validation	20.380	

- **Blanc de dilution** : la phase mobile utilisée pour éluer la substance à analyser ;
- **Standard d'étalonnage** : une solution de témoin de pureté connue, préparée à des concentrations connues
- **Standards de validation** : des concentrations calculées à l'aide d'un modèle d'étalonnage qui permet de minimiser l'erreur associée aux conditions de l'analyse, donc de calculer des concentrations prédites les plus correctes possibles sur l'intervalle de dosage envisagé ;
- **Étalonnage** : une étape clé au cours de la validation d'une méthode analytique, qui consiste à construire un modèle permettant de prédire la concentration inconnue d'échantillon, par analogie avec des concentrations connues des solutions d'étalonnage.

La spécificité de la méthode est confirmée par :

- ✓ L'absence de pic au temps de rétention du pic de marqueur dans le chromatogramme obtenu avec le blanc de dilution ;
- ✓ Les temps de rétention du pic de marqueur pour le standard d'étalonnage et le standard de validation sont comparables ;
- ✓ Les spectres du pic de marqueur pour le standard d'étalonnage et le standard de validation sont comparables (200-450 nm).

V-5-2/ Linéarité

Une relation linéaire doit être évaluée dans l'ensemble de l'intervalle d'utilisation de la méthode d'analyse, en utilisant les données des premières répétitions de chaque niveau de concentration, pour les trois séries de validation. On peut démontrer l'existence de cette relation

en appliquant la méthode proposée directement à la substance médicamenteuse (en diluant, une solution-mère étalon) et /ou on utilise des portions pesées individuellement de mélanges synthétiques réunissant les composants du produit fini. Cette dernière approche peut être évaluée dans le cadre de la détermination de l'écart d'utilisation (49). La linéarité est évaluée dans un premier temps par comparaison visuelle des représentations graphiques des réponses instrumentales (Y) en fonction des concentrations introduites (X) de la substance à analyser selon la fonction $[Y = f(X)]$, pour la forme pharmaceutique reconstituée et pour les standards d'étalonnage. Dans un deuxième temps, elle est évaluée entre les concentrations retrouvées Z et les concentrations introduites X en représentant graphiquement la fonction $[Z = f(X)]$ pour les trois séries de validation conjointement. Une analyse statistique de la droite obtenue est effectuée, la pente est comparée à la valeur de référence 1, l'ordonnée à l'origine est comparée à la valeur de référence 0, et la vérification de l'ajustement est effectuée. (48)

Il faut déterminer le coefficient de corrélation R , l'ordonnée à l'origine, la pente de la droite tracée, ainsi que la somme des carrés des résidus. En outre, cinq concentrations différentes sont recommandées par les guides d'ICH (49). Par exemple, pour une méthode de dosage CLHP typique, 50, 80, 100, 120 et 150 % de la concentration cible sont préparés et analysés.

Parmi les paramètres typiques calculés à partir d'une analyse de régression linéaire est le coefficient de corrélation (R) avec un critère d'acceptation généralement supérieur à 0,99(40).

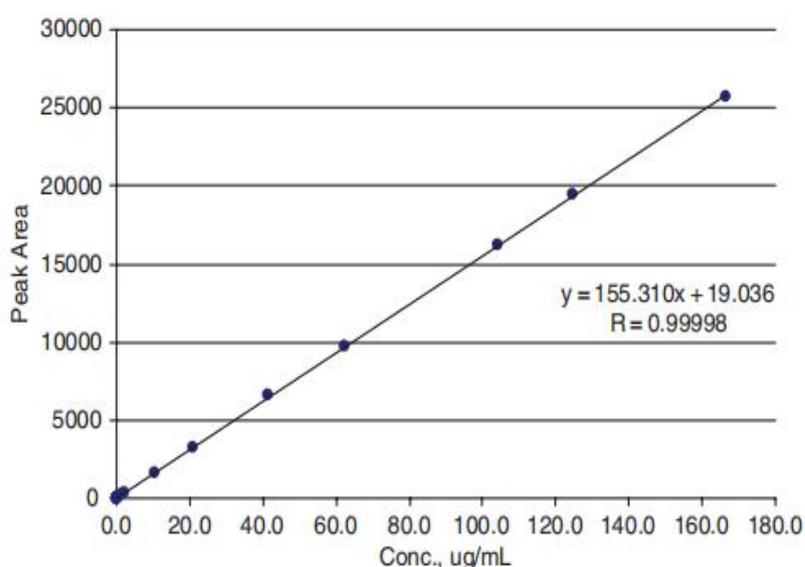


Figure 9. Exemple d'un graphe d'étalonnage représente les réponses instrumentales (Y) en fonction des concentrations théoriques (X) (40).

Le tableau 7 donne l'interprétation statistique de la droite de régression présentée dans la figure 9.

Tableau 7. Résultats de l'étude statistique sur la droite $[Y = f(X)]$

Paramètres calculés	Résultats
Pente	155.310
Ordonnée à l'origine	19.036
Coefficient de corrélation	0.99998

La droite d'étalonnage $[Y = f(X)]$, indique la linéarité de la méthode d'analyse avec un coefficient de corrélation entre les résultats obtenus proche de 1.

V-5-3/ L'intervalle d'utilisation

L'écart d'utilisation de la méthode est habituellement établi d'après la linéarité et dépend de l'usage auquel elle est destinée. On détermine l'écart d'utilisation en confirmant que la méthode permet d'atteindre un degré acceptable de linéarité, de justesse et de fidélité lorsqu'elle est appliquée à des échantillons renfermant des quantités de la substance à analyser comprises entre les extrêmes des limites ou aux limites d'utilisation spécifiées pour la méthode d'analyse (49).

Les valeurs minimales suivantes doivent être évaluées comme valeurs limites de l'écart d'utilisation (49) :

- Pour la teneur d'une substance médicamenteuse ou d'un produit fini (pharmaceutique) : normalement de 80 à 120 % de la concentration analysée ;
- Pour l'évaluation de l'uniformité de teneur au moins de 70 à 130 % de la concentration analysée, à moins qu'un écart plus étendu convienne mieux à la forme posologique considérée (par exemple s'il s'agit d'un aérosol-doseur) ;
- Pour le test de dissolution : valeurs limites spécifiées ± 20 %, par exemple pour un produit à libération contrôlée, les normes indiquent des valeurs de 20 % après une heure et de 90 % après 24 heures donc l'intervalle de dissolution

varie entre [20%-90%] pendant les premières 24 heures, dans ce cas l'écart d'application à valider doit être de 0 à 110 % de la valeur mentionnée sur l'étiquette.

- Pour le dosage d'une impureté : l'écart de mesure allant de la limite de report de cette impureté jusqu'à 120 % de la spécification ;
- Pour les impuretés ayant une activité exceptionnelle, une action toxique ou des effets pharmacologiques imprévus, la limite de détection et de quantification doivent correspondre au niveau où ces impuretés doivent être contrôlées.
- Si la teneur et la pureté sont analysées par un même test, et qu'on utilise uniquement un étalon pur à 100 %, la linéarité doit être vérifiée dans un écart allant de la concentration prescrite pour les impuretés jusqu'à 120 % de la limite de teneur spécifiée.

Pour la validation des méthodes d'analyse des impuretés durant la mise au point, il peut être nécessaire d'évaluer un écart d'application aux alentours d'une valeur limite supposée (probable). Dans notre travail, nous sommes intéressés à la marge d'utilisation qui concerne le dosage des impuretés de limite de report jusqu'à 120% de la spécification.

V-5-4/ Justesse

La justesse doit être vérifiée dans l'écart d'utilisation de la méthode d'analyse. Elle peut être évaluée selon diverses procédures(49).

1- Justesse de la composition

* Substance médicamenteuse

- a. Application de la méthode à une substance de pureté connue (une substance de référence) ;
- b. Comparaison des résultats obtenus de la méthode à valider avec ceux obtenus par une méthode bien caractérisée, dont la justesse est indiquée et/ou définie ;

* Produit fini

- a. Application de la méthode des mélanges synthétiques, en ajoutant à la composition du produit fini exempt du principe actif (matrice placebo) des quantités connues de substance active ;
- b. Lorsqu'il est impossible d'obtenir des échantillons de toutes les composantes du produit fini, il peut être acceptable de comparer les résultats obtenus avec ceux obtenus avec une autre méthode bien caractérisée dont la justesse est indiquée et/ou définie.

2- Justesse de la présence d'impuretés (détermination quantitative)

Pour évaluer la justesse de la méthode, on doit utiliser des échantillons (de la substance médicamenteuse ou du produit fini) enrichis de quantités connues d'impuretés à des niveaux compatibles avec l'intervalle prévu de la méthode, par exemple pour un intervalle de dosage [80%-120%] l'analyse des impuretés se fait de 0,1 (ou limite de quantification) à 120 % de la limite de spécification (40).

Lorsqu'il est impossible d'obtenir des échantillons de toutes les impuretés et/ou de tous les produits de dégradation, il est faisable de comparer les résultats avec ceux obtenus par autres méthodes de justesse connue indépendantes. Il faut décrire clairement comment les impuretés seront dosées, individuellement ou globalement (par exemple en pourcentage du poids (poids/poids) ou pourcentage d'air sous pic), toujours par rapport à la substance principale (49).

3- Recommandations concernant les données

Pour évaluer la justesse de la méthode à valider, il est recommandé d'utiliser au moins neuf résultats obtenus par l'analyse d'au moins trois concentrations (par exemple 70%, 100%, 130%) englobant l'écart d'utilisation c.-à-d. trois séries de mesurage avec trois concentrations pour chacune (49).

4- Expression pratique de la justesse

La justesse d'une méthode est définie dans la section V-1 au-dessus par deux paramètres essentiels (48) :

- La valeur de référence X de l'échantillon étudié ;
- La valeur moyenne Z de mesurages répétés sur ce même échantillon (la moyenne d'une série de mesure).

Dans le cadre d'une validation analytique, la justesse est donc obtenue en calculant la différence entre la moyenne des concentrations introduites Z et la moyenne des concentrations calculées (la valeur de référence X), qui peut être exprimée de plusieurs façons :

- a. Elle peut d'abord être exprimée sous forme de biais absolu ou relatif, selon les formules suivantes :

Biais absolu $B = \bar{z} - X$

Biais relatif $B = \left\{ \frac{\bar{z} - X}{X} \right\} \times 100$

\bar{z} : la moyenne des mesurages répétés dans une même série.
Après le calcul de biais, si la méthode analytique conduit à une surestimation de la quantité d'analyte à doser, le biais absolu ou relatif sera positif. Inversement s'il y a une sous-estimation ce biais sera négatif.

- b. Un autre mode d'expression de la justesse est le calcul du taux de recouvrement comme suit :

Taux de recouvrement $R\% = \frac{\bar{z}}{X} \times 100$

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

5- Erreur systématique influençant la justesse

La non-spécificité d'une méthode analytique intrinsèquement influence la justesse en entraînant un échec de calcul du biais de mesure (addition de deux ou plusieurs composants avec l'analyte à doser par manque de spécificité), et donc un défaut de justesse.

Ces erreurs systématiques sont liées probablement à un effet matrice de l'échantillon ou de l'équipement utilisé dans la méthode. Dans le cas où la matrice de l'échantillon est entièrement connue et l'équipement est intégralement maîtrisé, on peut aisément mettre en évidence l'origine de l'erreur. En revanche, lorsque les différents constituants de la matrice ne sont pas entièrement connus, il est plus difficile d'identifier les sources d'interférences possibles(48).

La droite de justesse est définie par l'équation :

$$Z = f(X)$$

Telles que :

- Z : les concentrations mesurées
- X : les concentrations introduites de référence

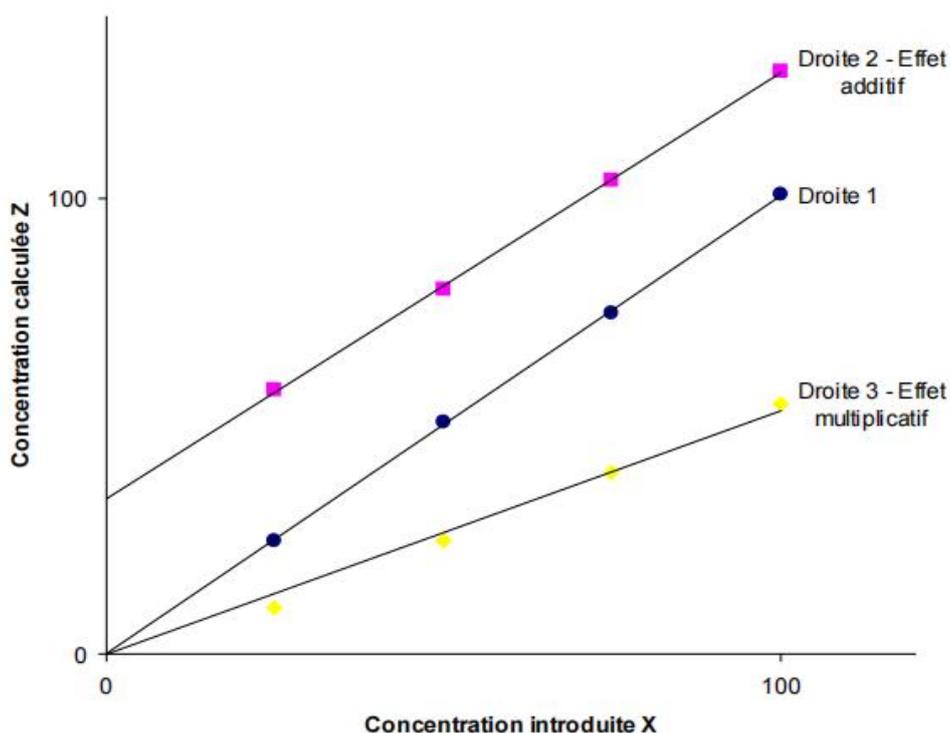


Figure 10. Exemple de trois situations possibles illustrant la droite de justesse (48) .

- la droite 1, représente un cas où il n'y a pas d'interférence ;

- la droite 2, représente un décalage systématique des concentrations calculées, il s'agit d'un effet additif ;

- la droite 3, représente un biais proportionnel à la concentration (biais relatif), il s'agit d'un effet multiplicatif.

Tableau 8. Représentation statistique de t²trois cas possibles lors des études de justesse

La concentration introduite X	La concentration mesurée Z		
	Pas d'interférence	Effet additif	Effet multiplicatif
X_1	$Z_1 = X_1$	$Z_1 = X_1 + b_1$	$Z_1 = b_0 X_1$
X_2	$Z_2 = X_2$	$Z_2 = X_2 + b_1$	$Z_2 = b_0 X_2$
X_3	$Z_3 = X_3$	$Z_3 = X_3 + b_1$	$Z_3 = b_0 X_3$

En pratique, il n'existe pas de techniques parfaites qui donnent des résultats sans interférence avec la valeur calculée théoriquement donc les effets de matrice sont souvent combinés, et l'équation de la droite de justesse est alors de la forme suivante :

$$Z = b_0 X + b_1$$

V-5-5/ Fidélité

La fidélité est une mesure de la différence entre des répétitions faites sur un même échantillon, comme il est indiqué dans la section V-1, elle peut être exprimée à trois niveaux selon les conditions de travail (répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité) (48).

En effet, C'est une estimation de l'amplitude avec laquelle une méthode disperse les répétitions, et ainsi elle fournit des indications sur les erreurs aléatoires.

Il est nécessaire de tenir compte de cette variabilité dans l'interprétation pratique des résultats d'un essai en routine.

1- Recommandations concernant chaque niveau de fidélité :

Les différentes sources de variations pouvant influencées la fidélité d'une méthode analytique sont organisées selon la loi des 5M (48) :

1. **La main d'œuvre.** Des opérateurs bien entraînés et qualifiés sont plus à même de faire des mesures proches les unes des autres.

2. **Le milieu.** Un laboratoire dont l'agencement est bien adapté aux mesures effectuées permet de réduire la variabilité entre répétitions.
3. **La méthode.** Même si une méthode est normalisée, il existe de légères variations dans la façon de l'appliquer (réactifs, qualité de la préparation des solutions d'étalonnage...).
4. **Le moyen.** L'utilisation d'appareillage qualifié est fondamentale.
5. **La matière.** La conservation des échantillons au sein du laboratoire influence la variabilité des mesures.

En revanche les trois conditions de travail à respecter pour estimer la fidélité sont énumérées comme suit (48) :

- Condition de répétabilité : les sources de variations listées ci-dessus sont minimisées autant que possible ;
- Condition de reproductibilité : contrairement au cas précédent, les sources de variations sont maximisées afin d'obtenir des mesures dans les conditions où le plus grand nombre de sources de variations sont intervenues, notre travail est basé sur le dosage par CLHP donc on peut même changer carrément les numéros de lot des colonnes utilisées, ainsi que différentes marques d'équipement peuvent être incluses pour élargir les limites de la méthode ;
- Condition intermédiaire de fidélité : dans ce cas également plusieurs sources de variations viennent interférer, mais les mesures sont effectuées au sein d'un même laboratoire.

2- Paramètres calculés pour évaluer la fidélité d'une méthode analytique

Selon les guides d'ICH, il est recommandé d'indiquer l'écart-type, l'écart-type relatif et l'intervalle de confiance pour chaque type de fidélité évalué (49).

- a. **Écart-type** : Le calcul d'écart-type consiste à utiliser une méthode appelée analyse de la variance à un facteur (*one-way ANOVA : Analysis of variance*). Elle permet de décomposer la variance totale de toutes les mesures, toutes séries confondues ou variance de fidélité intermédiaire en une variance intra-série et une variance inter-série. Les exigences de cette méthode sont la normalité de la distribution des données, l'homogénéité des variances inter-séries et l'indépendance des séries les unes par rapport aux autres (48).

La variance intra-série est calculée selon la formule suivante :

$$V_r = S_r^2 = \frac{SCE_r}{I(J-1)}$$

V_r : Variance intra série (variance de répétabilité)

S_r : L'écart-type de répétabilité

SCE_r : La somme des carrés d'écart à la moyenne intra-série

I : Le nombre de séries

J : Le nombre de répétitions par série.

On peut ainsi déduire l'écart-type de la répétabilité par la relation suivante : $S_r^2 = \sqrt{V_r}$

A partir de cette variance intra-série, on peut calculer la variance inter-séries et ensuite

l'écart-type de la fidélité intermédiaire :

$$V_1 = S_1^2 = \frac{\{SCE_1 - S_r^2\}}{J}$$

$$S_1 = \sqrt{V_1}$$

$$S_R = \sqrt{(V_1 + V_r)}$$

V_1 : Variance inter-série (variance de fidélité intermédiaire)

S_1 : L'écart-type de fidélité intermédiaire

SCE_1 : La somme des carrés d'écart à la moyenne inter-série

S_R : L'écart-type de reproductibilité.

Ces écart-types sont des indicateurs des limites maximales que l'on sera en droit d'atteindre lorsque des répétitions seront effectuées avec cette méthode (48).

- b. **Écart-type relatif** : L'évaluation des écart-types standards ne nous permettent pas en soi de juger la fidélité de la méthode analytique. Il nous faut donc trouver une approche permettant d'affirmer si les valeurs de fidélité obtenues sont correctes ou non, donc la variabilité d'une méthode est souvent exprimée sous forme de coefficient de variation. Il s'agit d'une mesure relative qui ne permet pas de caractériser de façon absolue une méthode, car ce paramètre dépend non seulement de l'écart-type des valeurs obtenues mais aussi de la moyenne de celles-ci, donc il ne peut pas à lui seul représenter la fidélité d'une méthode du fait d'un manque de robustesse (48).
- c. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage (RSD% : *relative standard deviation*) dont la valeur plus grande et la plus faible doivent être plus proche que possible(40).

$$RSD\% = \frac{S}{\bar{Z}} \times 100\%$$

En effet, un dosage par HPLC d'un produit médicamenteux à petite molécule ou un

dosage d'une substance médicamenteuse doit posséder un RSD% qui ne dépasse pas 2%. En outre, pour les mesures d'impuretés, le RSD% est d'autant plus élevé que la teneur en impuretés est faible par exemple pour des niveaux de 0,1 % d'impureté les critères d'acceptation sont des RSD de 10 à 25 %, tandis qu'à un niveau de 1 %, les RSD acceptés sont fixés à 3-5 % (40).

- d. **Intervalle de confiance (IC)** : il est déterminé au risque α % est un intervalle de valeurs qui a $(1-\alpha)$ % de chance de contenir la vraie valeur du paramètre estimé : par exemple, un intervalle de confiance avec un risque de 5% possède 95% de chance de contenir la vraie valeur du paramètre estimé (48).

Tableau 9. Exemple des paramètres évalués pour valider la fidélité d'une méthode de dosage des produits de dégradation (40).

Numéro d'échantillon	Pourcentage de la teneur en produit de dégradation A		
	0.1%	0.25%	0.5%
1	94.2	93.8	95.0
2	94.8	92.1	100.6
3	102.1	94.3	96.5
Les paramètres de la fidélité			
Variance (V)	19.3	1.3	8.4
L'écart-type (S)	4.4	1.2	2.9
La moyenne	97	93.4	97.4
L'écart-type relatif (RSD%)	4.5	1.2	3
Moyenne globale	95.9		
L'écart-type total	3.3		

V-5-6/ Limite de détection et limite de quantification

La limite de quantification (LQ) et la limite de détection (LD) sont définies dans la section V-1 chacune à part, elles sont déterminées pour les méthodes chromatographiques qui mesurent de faibles concentrations d'analyte, telles que les tests d'impureté et de produits de dégradation, les méthodes de solvant résiduel et les méthodes de résidu de nettoyage de l'équipement (40). En effet notre travail concerne les produits de dégradation, donc il est indispensable de déterminer ces deux paramètres pour valider les méthodes adoptées. La détermination de la limite de détection peut être effectuée par diverses techniques, celle la plus adaptée varie selon que la méthode à valider fait intervenir ou non des instruments. Ces techniques sont citées ci-dessous (49) :

1) Évaluation visuelle

Pour déterminer la limite de détection par cette technique, on analyse des échantillons renfermant des concentrations connues de la substance à analyser et l'on détermine la concentration minimale à laquelle la substance peut être détectée de façon fiable. La limite de quantification est généralement déterminée par l'analyse d'échantillons avec des concentrations connues d'analyte en déterminant la concentration minimale à laquelle la substance peut être quantifiée avec une exactitude acceptable.

2) Approche du rapport signal/bruit

La pratique la plus typique pour déterminer la LQ ou LD consiste à déterminer le rapport signal/bruit pour le pic en question. La valeur du signal est la hauteur du pic principal dans le chromatogramme, tandis que la valeur du bruit est la hauteur des petits pics à côté du signal. On peut déterminer ce rapport par comparaison de deux chromatogrammes différents, tel que le premier comprend un signal obtenu avec un échantillon contenant de faibles concentrations connues de la substance à analyser, et le deuxième comprend un signal obtenu avec des blancs (placebo), ce dernier signal correspond à la valeur du bruit de fond. A la fin, on détermine la concentration la plus faible à laquelle la substance peut être détectée ou quantifiée de façon fiable, en général :

- Un rapport signal/bruit de 3 ou 2 pour 1 est considéré comme acceptable pour l'estimation de la limite de détection.

- Une concentration d'analyte qui représente un rapport de 10 pour 1 est la limite de quantification.

3) Évaluation basée sur l'écart-type de la réponse et la pente de la courbe d'étalonnage

La troisième technique acceptable pour déterminer LQ ou LD est l'extrapolation à partir de la courbe d'étalonnage en utilisant la pente de la courbe (P) et l'écart type de la réponse (S) sur la base de mesures à blanc répétées.

Ces deux paramètres sont calculés à l'aide de ces deux équations :

$$LD = \frac{3.3S}{P}, \quad LQ = \frac{10S}{P}$$

Il faut préciser par quelle méthode on a déterminé la LD et LQ. Cependant, si on adopte l'évaluation visuelle ou le rapport signal/bruit, dans ce cas la présentation des chromatogrammes correspondants est considérée comme une justification acceptable. Néanmoins lorsqu'on a utilisé le calcul ou l'extrapolation, il convient de valider l'estimation en examinant un nombre suffisant d'échantillons dont la teneur en substance à analyser est proche de la limite de détection ou de quantification.

V-5-7/ Robustesse

La validation d'une méthode analytique est souvent effectuée dans les meilleures conditions telles que l'utilisation d'une nouvelle colonne sur un équipement qualifié dédié par un analyste expérimenté avec la méthode. Réellement, en routine dans un laboratoire de contrôle qualité très actif les échantillons commerciaux sont analysés par nombreux analystes afin d'améliorer la rentabilité. Pour cette raison, on a introduit la notion de la robustesse. L'évaluation de la robustesse établit la fiabilité de la méthode par rapport aux variations planifiées des paramètres de fonctionnement, évalue l'utilisation de différents lots de colonnes du fournisseur et détermine également la stabilité des échantillons et des solutions étalons. Elle se fait durant la phase de mise au point et dépend du type de la méthode considérée.

Si les résultats peuvent varier selon les conditions d'analyse, il faut veiller à ce que celles-ci soient adéquatement contrôlées. La robustesse a notamment pour conséquence la définition d'un ensemble de paramètres sur le caractère approprié de la méthode d'analyse (par exemple un test de résolution d'une paire critique de pics) qui permet de garantir la validité de cette méthode, quelles que soient les conditions d'utilisation.

*** En ce qui concerne les chromatographies en phase liquide (49) :**

- Variations du pH de la phase mobile ;
- Variations de la composition de la phase mobile ;
- Colonnes différentes (plusieurs lots provenant de différents fournisseurs) ;
- Température de la colonne ;
- Débit ;
- Volume d'injection.

*** En ce qui concerne les chromatographies en phase gazeuse (49) :**

- Colonnes différentes (provenant de lots ou de fournisseurs différents) ;
- Variation du gaz vecteur (l'hélium et l'azote peuvent être utilisés) ;
- Température de la colonne ;
- Débit.

Tableau 10. Quelques paramètres modifiés pour évaluer la robustesse d'une HPLC (40)

Composition de la phase mobile	Variation de la quantité du modificateur organique de $\pm 10\%$
PH de la phase mobile	Variation du pH de $\pm 0,2$ à 1 unité selon les analytes
Concentration du tampon	Faire varier la concentration du tampon de $\pm 10\%$
Température de la colonne	$\pm 5^\circ\text{C}$ (à condition $< 60^\circ\text{C}$)
Débit	$\pm 25\%$
Colonne	Différents lots provenant de différents fournisseurs
Volume d'injection	$\pm 25\%$

Dans le tableau précédent on a cité les conditions de travail par HPLC qui doivent être modifiées dans un intervalle bien déterminé. Selon la méthode en cours de validation, divers autres paramètres peuvent être mesurés (tels que la résolution, le facteur de traînée) pour déterminer l'adéquation de la méthode chromatographique aux extrêmes.

D'autres facteurs peuvent être évalués au cours des études de robustesse, y compris la qualification d'une colonne alternative (par exemple, le C18 d'un autre fournisseur, des dimensions de colonne ou une taille de particules différentes), l'utilisation d'un équipement de fournisseur différent, ou on modifie le type d'appareil (par exemple, agitateurs mécaniques, bains soniques) utilisés au cours de la préparation de l'échantillon à analyser.

Cette évaluation peut s'avérer très utile lors des transferts de méthode dans le cas par exemple où une marque particulière de colonne n'est plus disponible et qu'un produit commercial est en attente de test.

Objectifs

Ce chapitre présente les différents matériaux utilisés, la procédure de préparation des solutions de l'éconazole nitrate (EN) (le matériau à examiner dans cette étude), le programme expérimental et les méthodes de caractérisation. Les analyses et méthodes de caractérisation, ainsi que les essais utilisés dans cette étude sont : la détection et l'analyse quantitative de façon fiable, sélective et rapide des impuretés provenant de la dégradation forcée du nitrate d'éconazole sous forme de crème dermique. La méthode HPLC simple couplée avec un détecteur à barrette de diodes a été conformément validée et testée pour sa spécificité et sa stabilité indiquant les propriétés par résolution du principe actif à partir de ses produits de dégradation.

VI-1/ Appareils, équipements et verreries

L'ensemble des appareils, équipements et verreries utilisés lors de la réalisation des différents tests sont reportés dans le tableau 11 suivant :

Tableau 11. Différents types des appareils, équipements et verreries utilisés.

Appareils / équipements/ Verreries	Marque	Modèle
Appareil d'HPLC	WATERS Allians	2695
Ultrason		
Une balance électronique de précision	METTLER TOLEDO	MS 204 5/01
pH-mètre	Metrohm	
Etuve d'incubation à 60°C.	INCU-Line	
Incubateurs à 25°C.		
Agitateur magnétique	LMR	AG200
Barreaux aimantés		
Filtre hydrophile de porosité 0,45µm		

Béchers 250 ml		
Pipettes (5 ml, 20 ml) et poire.		
Fioles de (20 ml, 200ml)		

VI-2/ Réactifs chimiques

Dans ce mémoire, l'ensemble des réactifs chimiques utilisés sont :

- Méthanol de qualité HPLC ;
- L'acide chlorhydrique 1 N ;
- L'hydroxyde de sodium 1 N ;
- Peroxyde d'hydrogène ;
- Poudre de témoin SCR du nitrate d'éconazole ;
- Acétate d'ammonium ;
- Acétonitrile.

VI-3/ Produit d'essais

3-1/ PHANAZOL®

C'est une crème dermique fabriquée par groupe SAIDAL contenant un seul principe actif antifongique de la famille des imidazolés, c'est le nitrate d'éconazole à 1% conditionnée dans un tube de 30g.

Excipients (1) : myristate isopropylique, acide stéarique, alcool cétylique, polyoxyl 40 stéarate, méthyl hydroxybenzoate*, lauryl sulfate de sodium, propylène glycol*, butyl hydroxy toluène*, eau déminéralisée. (*) Excipients à effet notoire : méthyl hydroxy benzoate, propylène glycol et butyl hydroxy toluène.

3-2/ Caractérisation physicochimiques et pharmacologiques du nitrate d'éconazole

Les principales caractéristiques physico-chimiques et pharmacologiques du nitrate d'éconazole sont les suivantes (2) (3) :

a) Caractère :

- Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche.
- Nomenclature: nitrate de 1-[(2*RS*)-2-[(4-chlorobenzyl) oxy] -2-(2,4-dichlorophényl) éthyl] -1*H*-imidazole.
- Point de fusion: 165°C.
- Masse moléculaire: 444,7 g/mol.
- Formule brute: $C_{18}H_{16}Cl_3N_3O_4$.

b) Structure :

La structure du nitrate d'éconazole est présentée dans la figure 11 ci-dessous :

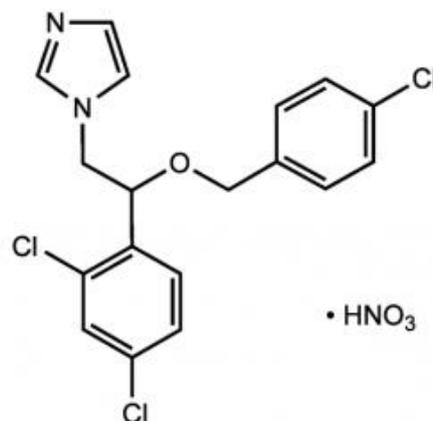


Figure 11. Structure chimique du nitrate d'éconazole

c) Solubilité :

Le nitrate d'éconazole est très peu soluble dans l'eau, soluble dans le méthanol, assez soluble dans le chlorure de méthylène, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

d) Pharmacologie :

L'éconazole est un antifongique de type imidazole utilisé par voie topique dans le traitement des candidoses superficielles, des dermatophytoses et du pityriasis

versicolor. Il possède une activité antimicrobienne contre certaines bactéries Gram-positives et une certaine activité anti protozoaire contre *Leishmania* spp.

VI-4/ Méthodes

VI-4-1/ Application des conditions de stress sur l'échantillon à analyser

VI-4-1-1/ Préparation des solutions d'éconazole nitrate à base de crème

* Le produit utilisé dans notre travail est : *PHANAZOL*® crème 1%.

* La dénomination commune internationale (DCI) : Econazole Nitrate (EN)

* Le fabricant : SAIDAL GROUPE, site : Dar El Beida, Alger.

* La quantité d'essai utilisée est : 32g.

* Le solvant de dilution est : Méthanol.

Les spécifications et les limites des impuretés ainsi les conditions opératoires sont bien expliquées dans la pharmacopée européenne.

La concentration initiale de l'EN prescrite par la pharmacopée européenne pour les essais des substances apparentées est 10 mg/mL (2).

*Dissolution de la crème *PHANAZOL*®

On pèse 32g de la crème *PHANAZOL*® 1% à l'aide d'une balance à précision, c'est l'équivalent de 320mg d'éconazole nitrate. Dans un bécher on va dissoudre cette quantité pesée de notre produit avec du méthanol R, puis on fait passer au bain ultrason et on agite manuellement au fur et à mesure pour assurer une complète dissolution.

On va mettre la solution préparée dans une fiole de 20ml, puis on complète avec du solvant (méthanol R) jusqu'au trait de jauge. On passe la préparation à travers une membrane de fine porosité (0.45µm). Un volume de 12,5ml de cette solution est mise dans une fiole jaugée de 20ml, puis on complète avec du méthanol jusqu'au trait de jauge pour arriver à la concentration d'essai de nitrate d'éconazole 10mg/ml.

VI-4-1-2/ Préparation des solutions placébos

* **L'échantillon utilisé** : la composition du produit *PHANAZOL*® exempte de son principe actif (sans nitrate d'éconazole)

* **Le fabricant** : SAIDAL GROUPE, site : Dar El Beida, Alger.

* **La quantité d'essai est** : 32g.

On pèse 32g de la composition à l'aide d'une balance à précision. Dans un bécher on va dissoudre cette quantité pesée avec du méthanol R, puis on fait passer au bain ultrason et on agite manuellement au fur et à mesure pour assurer une complète dissolution. On va mettre la solution préparée dans une fiole de 20 ml, puis on complète avec du solvant (méthanol R) jusqu'au trait de jauge. On passe la préparation à travers une membrane de fine porosité 0.45µm. Un volume de 12,5ml de cette solution est mis dans une fiole jaugée de 20ml, puis on complète avec du méthanol jusqu'au trait de jauge.

VI-4-1-3/ Préparation des solutions à base de la substance active seule

Cette solution est préparée par dissolution de 200mg d'éconazole nitrate dans 20mL de méthanol.

VI-4-1-4/ Réalisation de la dégradation forcée

On a appliqué les conditions de stress sur 10 échantillons de chaque solution préparée (solution à examiner, placebo et solution à base de l'EN seul). Le tableau 12 résume les conditions de stress appliquées sur les échantillons de travail.

Tableau 12. Conditions de stress appliquées sur les échantillons de travail

N° d'échantillon	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Condition de stress	HCl		NaOH		H ₂ O ₂		Température	Humidité	Lumière	Non traité
Degré de stress	1mL	3mL	1mL	3mL	1mL	3mL	60°C	80%	Source UV	

VI-4-1-5/Préparation de la solution témoin d'éconazole nitrate à 10mg/ml

La solution témoin d'éconazole nitrate (10 mg/ml) est préparée par dissolution de 200mg du nitrate d'éconazole pour conformité du système SCR avec du méthanol R (on peut accélérer la dissolution par un bain ultrason). Après la dissolution complète, on met la solution préparée dans une fiole de 20 ml, puis on complète avec le solvant correspondant jusqu'au trait de jauge.

VI-4-1-6/ Incubation

Toutes les solutions préparées dans des fioles vont être fermées hermétiquement, puis incubées dans des conditions particulières qui dépendent du stress exercé sur l'échantillon :

- Les solutions 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 10 sont incubées dans des conditions à atmosphère ambiante à l'abri de l'air et à l'abri de la lumière
- La solution 7 est incubée dans une étuve à température constante fixée à 60°C
- La solution 8 est mise dans une enceinte fermée à humidité relative fixée à 80%
- La solution 9 est incubée dans une étuve avec lampe UV.

L'incubation au maximum dure 10 jours, le dosage et la lecture s'effectuent à J0 (le premier jour), à J3 (après 72h), à J5 (après 120h), à J10 (après 240h).

Chaque jour avant toute injection, on injecte une solution à blanc (méthanol seul) afin d'éliminer le bruit de fond (test de conformité du système).

Avant de commencer la lecture des résultats, il faut s'assurer que la dégradation forcée de l'EN seul est suffisante (une dégradation de 5 à 15% est acceptée) (4)(5)(6).

On compare toujours les pics des solutions à analyser avec ceux des solutions placébos et solutions témoins.

VI-4-1-7/ Préparation des solutions reconstituées chargées par les produits de dégradation

Les solutions reconstituées sont des placébos chargés des impuretés achetées de types SCR (la substance chimique de référence), chaque solution contient une impureté individuelle (A, B, C ou autre impureté non spécifiée). Ces solutions sont préparées en vue de réaliser les études de la validation.

VI-4-2/ Instrumentation et conditions chromatographiques :

VI-4-2-1/ Instrumentation

- Instrument de dosage : un appareil HPLC avec un détecteur à barrette de diodes (DAD) de type « Waters 2695 Alliance »
- Logiciel de gestion des données chromatographiques : Empower™3
- La phase stationnaire : colonne de type Waters (gel de silice octadécylsilylé (C18))
- Dimensions de la colonne : 100×4.6 mm.
- La filtration des solutions avant l'injection par : des micro-filtres de cellulose de porosité "0.45 µm".

VI-4-2-2/ Conditions chromatographiques

Le protocole de la pharmacopée européenne a été appliqué sur les solutions à examiner comme suit :

- Température d'analyse : ambiante (25°C)
- Type de la méthode chromatographique adoptée : chromatographie de partage en mode inversé où la phase stationnaire est apolaire.
- **La constitution de la phase mobile** : C'est un mélange de deux phases :
 - **Solution A** : méthanol R, solution d'acétate d'ammonium R à 0.77g/L (20:80 V/V)
 - **Solution B** : méthanol R, acétonitrile R (40:60 V/V)

On applique un gradient de phase mobile comme suit :

Tableau 13. Description de la constitution de la phase mobile pendant l'analyse

Intervalle de temps (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0→25	60→10	40→90
25→27	10	90
27,1 →30	60	40

- Débit de la phase mobile : 1.5mL/min
- Le volume d'injection : 10 μ L
- Température de la colonne : 35 °C
- L'éluant est suivi par DAD de 190 à 400 nm
- Les chromatogrammes sont extraits à 225 nm.

VI-4-3/ Validation de la méthode

VI-4-3-1/ Principe

Le procédé a été validé par la détermination de la spécificité (sélectivité), la linéarité, fidélité, justesse, limites de détection (LD) et de quantification (LQ) selon les directives du conseil internationale de l'harmonisation (ICH) (7).

VI-4-3-2/ Mode opératoire

a. Spécificité

La spécificité d'une méthode d'analyse consiste à montrer que le pic mesuré ne provient que du composé à analyser, sans aucune interférence avec sa matrice (excipients, produits de dégradation, impuretés...).

L'étude de la sélectivité de la méthode passe par l'évaluation de la pureté du pic, ainsi par la comparaison effectuée entre la surface sous pic du chromatogramme obtenu à J0 (pic de la substance active initiale) et le bilan massique des pics du chromatogramme obtenu après l'apparition des produits de dégradation.

Bilan massique : C'est la somme des surfaces de toutes les aires sous pics obtenues.

Le bilan massique égal ou proche à la surface initiale du pic principale confirme la pureté des pics obtenus et la bonne résolution de ceux-ci.

b. Linéarité

La linéarité est la capacité d'obtenir à l'intérieur d'un certain intervalle des résultats directement proportionnels à la concentration de la substance analysée dans un échantillon.

Concernant les essais des substances apparentées, la linéarité doit être effectuée sur un large intervalle de mesure couvert par une série de cinq concentrations. Étant donné que la limite spécifiée des surfaces des impuretés A, B et C est 0,2%, et la limite de report des impuretés non spécifiées est 0,1 %, il est important que la méthode soit linéaire à partir de la limite inférieure des substances apparentées (0,1 %) à la concentration maximale de la substance médicamenteuse (100%). Pour s'assurer que la méthode sera en mesure de calculer les résultats avec précision en dessous de la limite de report ICH, l'extrémité inférieure de la marge de linéarité est d'environ 50 % de la limite de report ICH (dans notre cas, 50 % de 0,1 %, est de 0,05 %).

Avant l'injection des solutions, la colonne était équilibrée pendant au moins 20 min avec la phase mobile. Les aires des pics des analytes ont été tracées en fonction des concentrations de l'EN et ces produits de dégradation. La linéarité est évaluée selon le coefficient de détermination.

La linéarité est atteinte lorsque le coefficient de détermination : (R^2) est $\geq 0,98$.

c. Justesse

La justesse correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention. Elle est déterminée sur les cinq échantillons utilisés dans l'étude de la linéarité. Le principe de la justesse est de calculer les biais et les taux de recouvrements ($R\%$) entre les quantités retrouvées (Z) et les quantités introduites (X).

d. Fidélité

La fidélité de la procédure d'analyse 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 s'exprime par la mesure de la répétabilité et de fidélité intermédiaire. Dans notre pratique, on injecte à la fin du stress 7 fois chaque solution dans le même jour avec les mêmes conditions expérimentales pour étudier la répétabilité de la méthode. La fidélité intermédiaire doit être évaluée pendant 3 jours consécutifs. L'interprétation des résultats est effectuée au moyen des coefficients de variation calculés ($RSD\%$).

e. Limite de détection et limite de quantification

La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) ont été déterminées selon le rapport signal-bruit tel que défini par ICH (section V-5-6 de la partie 1). La limite de quantification d'une méthode est affectée à la fois par la sensibilité du détecteur et par la justesse de la préparation de l'échantillon à une concentration aussi faible. En pratique, la limite de quantification doit être inférieure à celle de report indiquée dans les tableaux d'ICH. Les substances apparentées sont exprimées sous forme de pourcentage de teneur par rapport à la réponse de la substance active. Le pourcentage de surface, est calculé par l'équation suivante : $\% \text{ de substance apparentée} = \frac{\text{La surface de la substance apparentée}}{\text{Bilan massique des surfaces}} \times 100\%$.

Le pourcentage de la teneur des substances apparentées à partir du pourcentage de surface en utilisant un facteur de correction (facteur de réponse relatif), c'est la technique la plus simple (elle ne nécessite pas une substance de référence). Ce facteur est déterminé selon la formule

Partie expérimentale : Matériels méthodes et discussions des résultats

suivante (8) : Facteur de réponse relatif $= \frac{\text{facteur de réponse de la substance à analyser}}{\text{facteur de réponse de la substance apparentée}} = \frac{F_1}{F_2}$

Les facteurs F_1 et F_2 sont donnés par : $F_1 = \frac{\text{surface d'EN}}{[EN]}$, $F_2 = \frac{\text{surface du PD}}{[PD]}$

La réponse des substances apparentées doit être similaire à celle de la substance médicamenteuse (c'est-à-dire le facteur de réponse relatif proche de l'unité). Sinon, une correction du facteur de réponse doit être utilisée dans le calcul. La pharmacopée européenne définit trois impuretés A, B et C. Le facteur de correction attribué à l'impureté A est égale à 1,4 (la correction du pourcentage de surface est obligatoire) (2).

f. Limites d'impuretés non spécifiées et dose journalière recommandée (DJR) :

Les limites d'impuretés sont discutées selon la dose journalière recommandée. Selon RCP (résumé des caractéristiques de produit) du PHANAZOL®, c'est un crème à usage dermique dont la posologie est biquotidienne jusqu'à disparition complète des lésions, en déposant quelques gouttes dans le creux de la main ou directement sur les lésions (9). Donc la quantité appliquée diffère selon le degré d'atteinte cutanée, et vu qu'il n'y a pas une dose journalière fixe recommandée par les experts médicaux, on va choisir la limite de report par rapport à la quantité complète contenue dans le tube comme s'il est utilisé totalement en une seule fois (c'est le pire scénario). Un tube de PHANAZOL® 1% contient 30g de la crème à l'équivalent de 0,3g d'EN par tube. Les limites des impuretés non spécifiées pouvant apparaître suite à la dégradation de l'EN (selon le tableau 14 d'ICH Q3B) sont :

Tableau 14. Limites d'impuretés non spécifiées d'EN selon l'ICH

Dose max	Limite de report (0,3 g < 1 g)	Limite d'identification (10mg < 0,3 g < 2g)	Limite de qualification (100mg < 0,3 g < 2g)
0,3g	0,1%	0,2%	0,2%
	0,3 mg/tube	0,6 mg/tube	0,6 mg/tube

VI-5/ Résultats et discussion

Les solutions à examiner sont bien préparées et les conditions de stress ont été appliquées conformément aux guides et règles en vigueur.

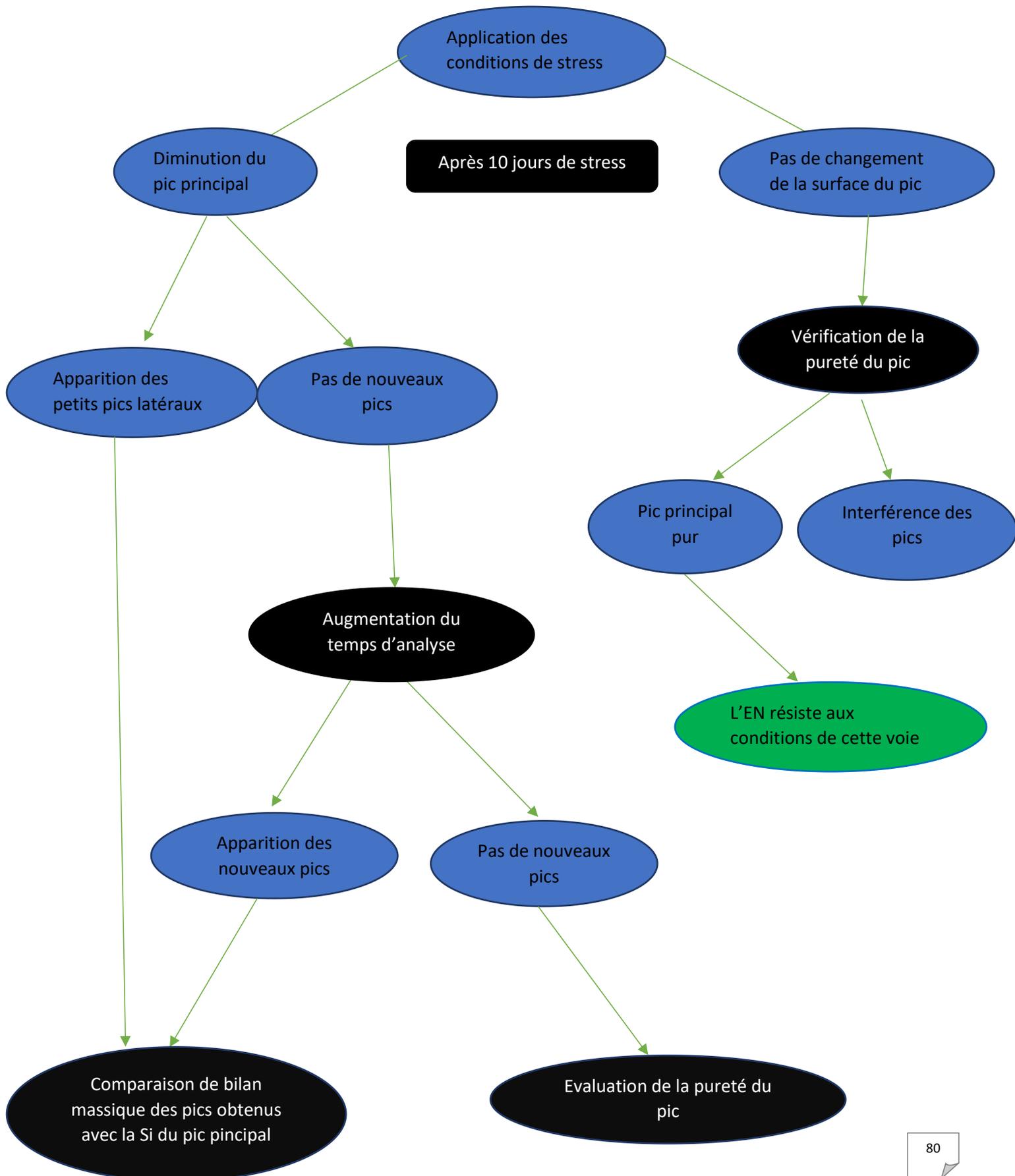
IV-5-1/Détermination de la voie de dégradation et évaluation de la sélectivité de la méthode

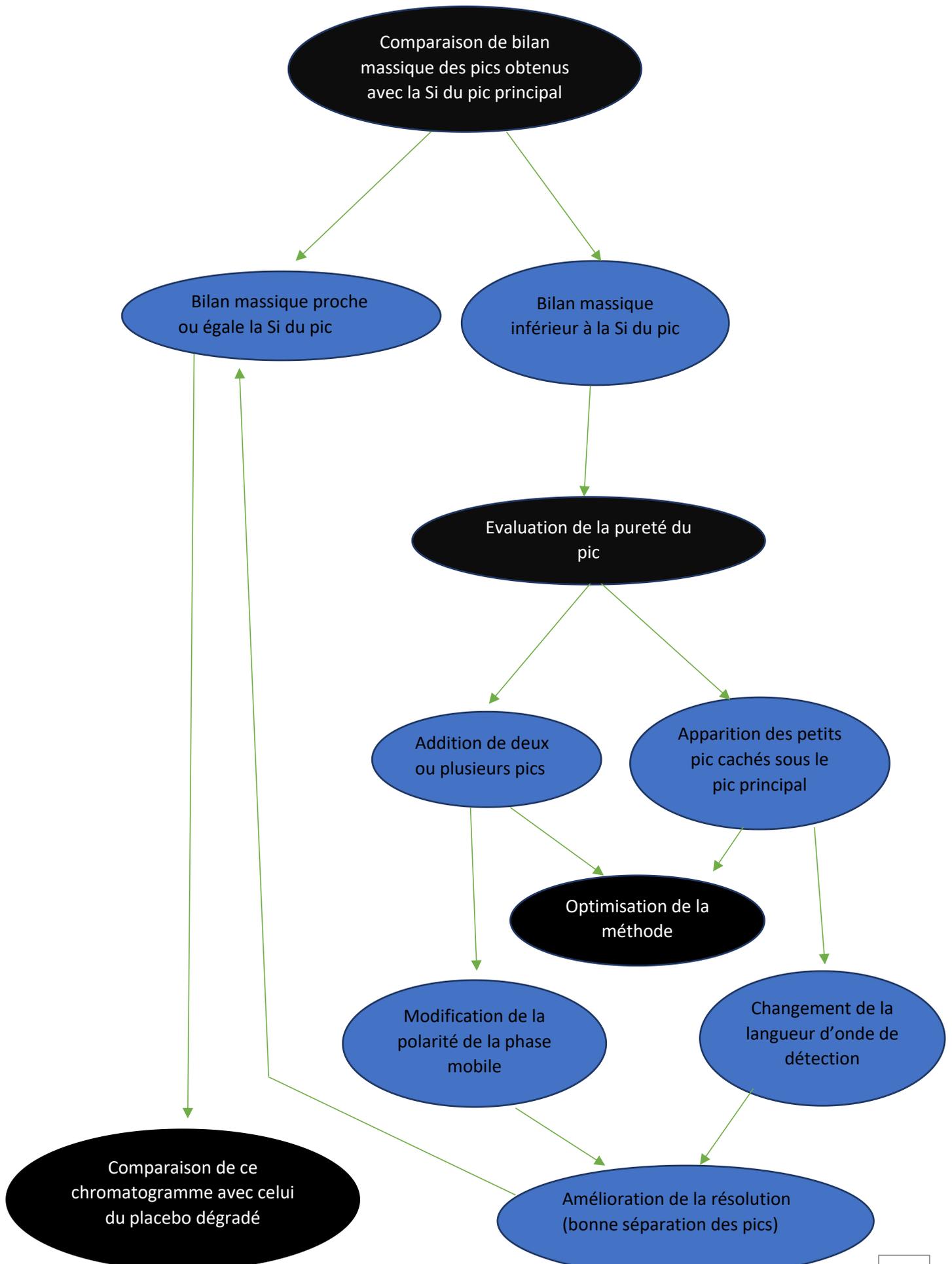
Les conditions de stress appliquées sont :

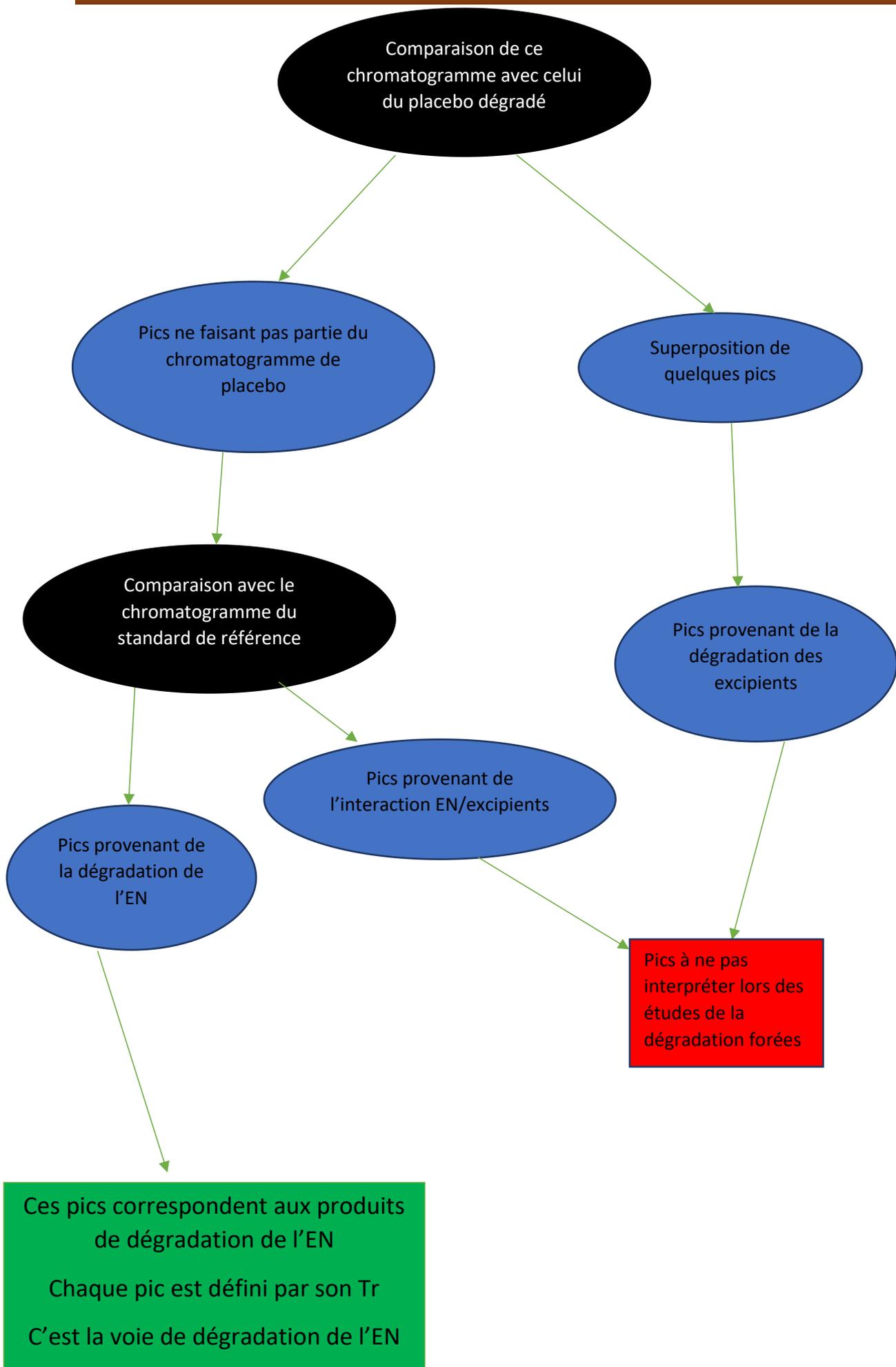
- ✓ **Acidité**
- ✓ **Alcalinité**
- ✓ **Oxydante**
- ✓ **Lumière**
- ✓ **Température**
- ✓ **Humidité**

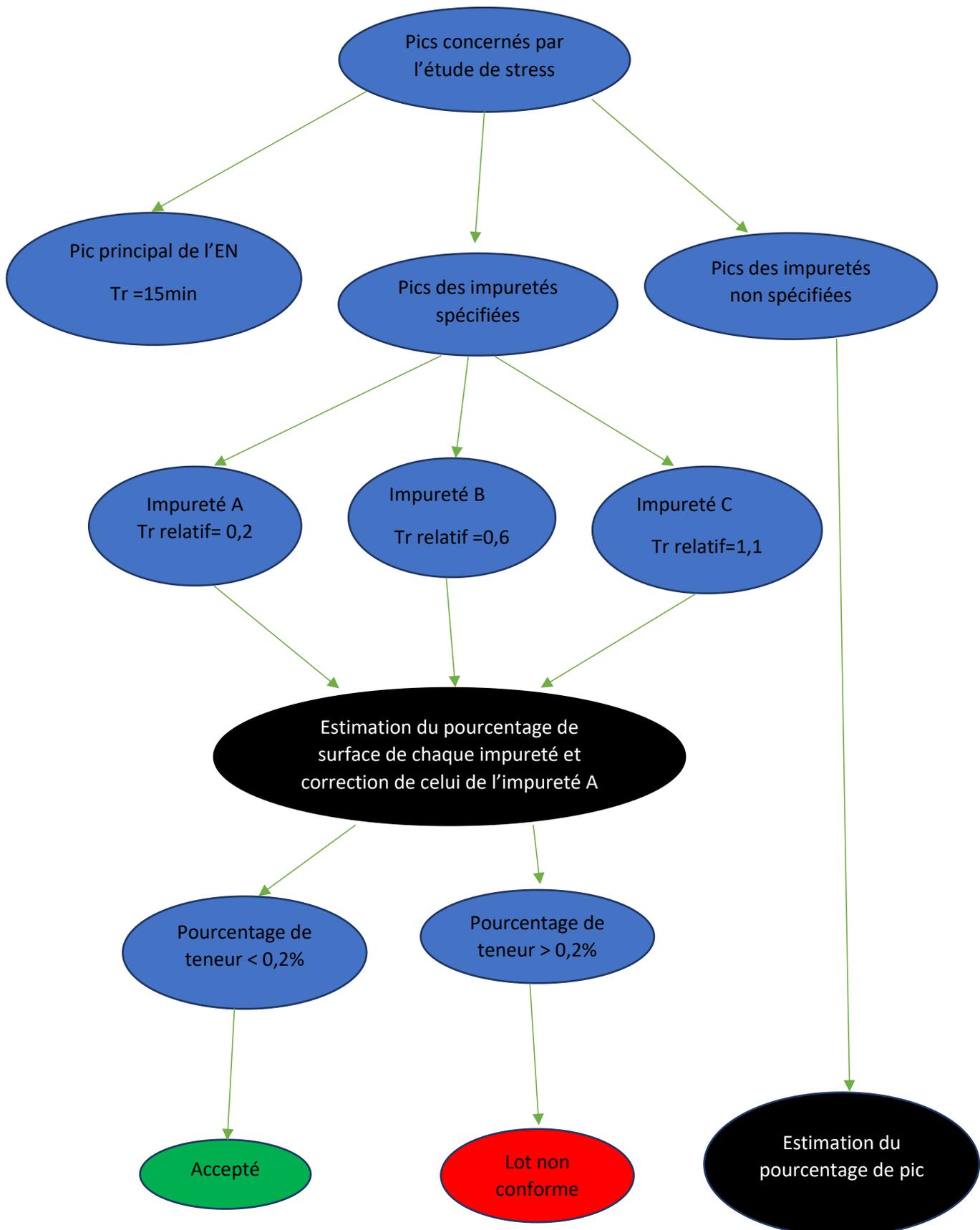
Lorsqu'on arrive à l'étape d'identification et de détermination des voies de dégradation possibles, on trouve que l'équipement HPLC ait été endommagé. De ce fait, on a fait des recherches bibliographiques sur les études antérieures de la dégradation forcée de l'EN, et on a trouvé que la voie principale de dégradation est la voie oxydative (10). L'organigramme suivant correspond à un arbre décisionnel qui montre la démarche à suivre pendant l'interprétation des résultats de la dégradation forcée de l'EN.

Organigramme 1. Arbre décisionnel de l'interprétation des résultats de dégradation forcée de l'EN











Clé de l'organigramme :

EN : Econazole nitrate

Tr : Temps de rétention de l'analyte

Si : Surface initiale

Selon les études antérieures de la dégradation forcée effectuée sur l'EN, un groupe brésilien avait trouvé deux dégradants (10) :

1. Alpha-(2,4-dichlorophényl) -2 -1H-imidazol-1yl) -éthanol (impureté spécifiée : qui est l'impureté A).
2. 4- Chlorobenzyl alcohol (CBA) (impureté non spécifiée).

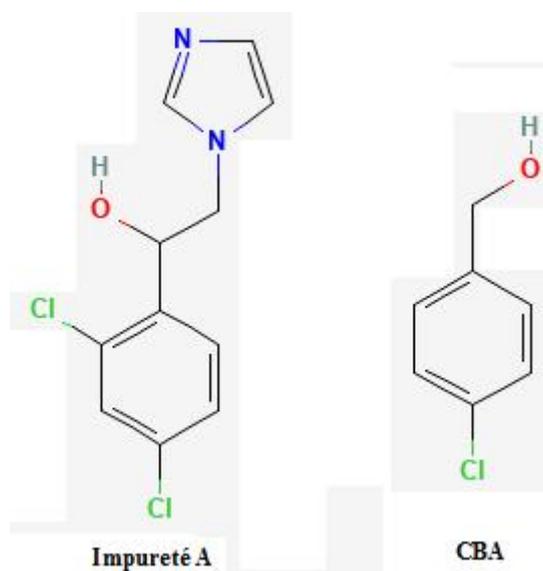


Figure 12. Structure des deux produits de dégradation de l'EN (Impureté A et CBA)

Pour les sites probables de la fragmentation de l'EN, conférer à l'annexe 1.

VI-5-2/ Validation de la méthode

VI-5-2-1/ Spécificité

La spécificité de la méthode est démontrée par la bonne résolution du pic de l'EN à ces produits de dégradation et aux excipients. La pureté du pic (a) a été vérifiée par la comparaison entre la surface du pic d'EN avant la dégradation et le bilan massique des pics obtenus après la dégradation (comme l'illustre la figure 13). Le logiciel EMPOWER qui facilite la lecture des résultats chromatographiques a confirmé la pureté et l'homogénéité de pic d'EN obtenu (figure 14), cela exclut la co-élution des substances.

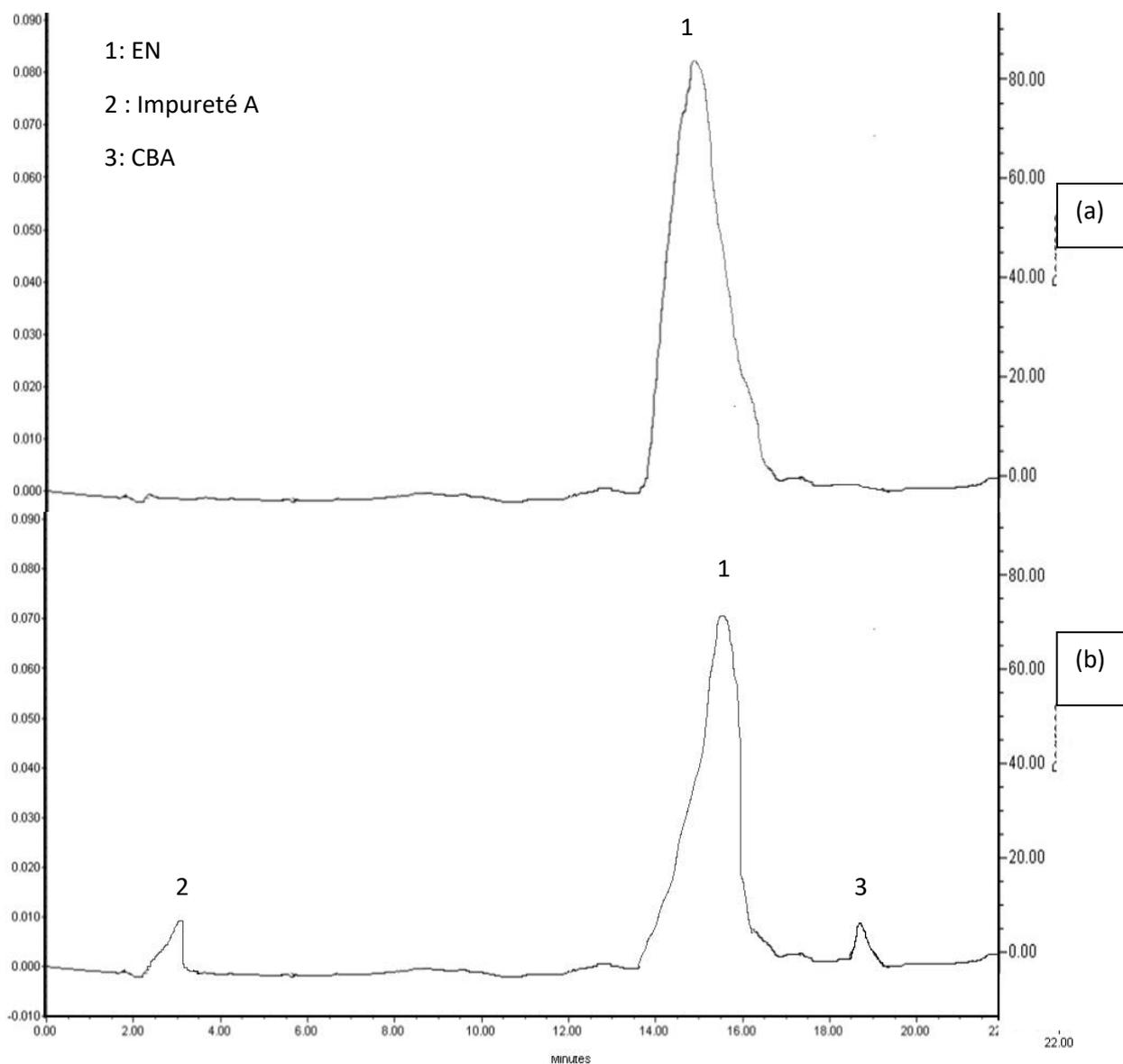


Figure 13. Pics d'EN et ses produits de dégradation avant (a) et après (b) la dégradation

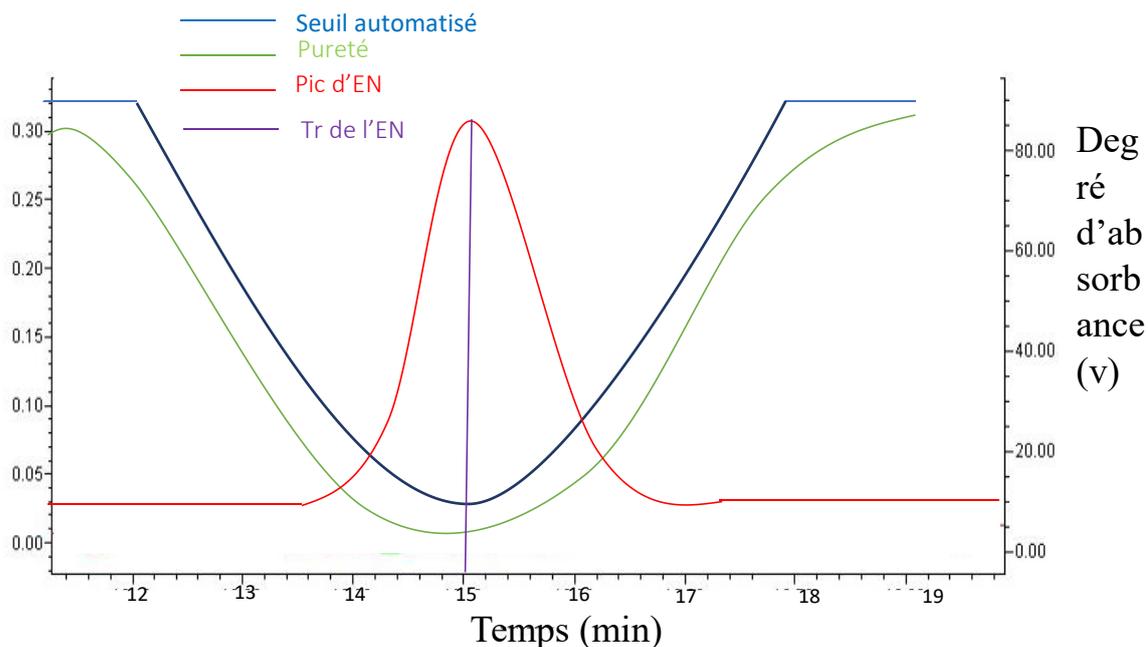


Figure 14. Pureté de pic d'EN selon l'automate EMPOWER

La spécificité se fait par injection de :

- ✓ Solution de placebo ;
- ✓ Solution de placebo dégradé ;
- ✓ Produit fini dégradé ;
- ✓ Solution substance active chargée avec produits de dégradation ;
- ✓ Solution des produits de dégradation (sup à 0.5%) ;
- ✓ Solution forme reconstituée chargée avec des produits de dégradation (PD).

Tableau 15. Intérêts des solutions utilisées dans l'étude de spécificité

Solution	Intérêt
Placébo	Eliminer les pics des excipients dans l'interprétation
Placébo dégradé	Eliminer les dégradants provenant des excipients
Substance active chargée avec produits de dégradation	Repérer une éventuelle interaction PA/PD

Forme reconstituée chargée avec produits de dégradation	Repérer une éventuelle interaction Excipient/PD
Solution des produits de dégradation	Vérifier la présence d'un effet matrice sur la réponse des PD
Produit fini dégradé	Objectif principal de ce travail

VI-5-2-2/ Linéarité

03 tests de la linéarité ont été effectués, avec pour chacun 05 niveaux de concentration ont été utilisés :

1. 05 niveaux de concentrations injectées du PA (EN) de 50 % limite de report à 100 % de la concentration de l'EN prescrite par la pharmacopée européenne et l'USP (10mg/ml). La linéarité dans cette marge prouve que les PD peuvent être quantifiés par rapport aux surfaces à une concentration théorique de 100% du PA.
2. 05 niveaux de 50 % limite de report à 150 % de la valeur spécifiée effectués avec les produits de dégradation trouvés individuellement.

VI-5-2-2-1/ Linéarité de l'EN dans l'intervalle[0,05% – 100%]

Tableau 16. Réponses chromatographiques suite à l'injection répétée de l'EN seul

Pourcentage théorique (cible en %)	Concentration injectée en (µg/ml)	Surface (µv/seconde)
0,05	4,89	3001
0,5	51,23	31245
5	496,7	345678
50	5011,7	3733579
100	10008,9	7384077

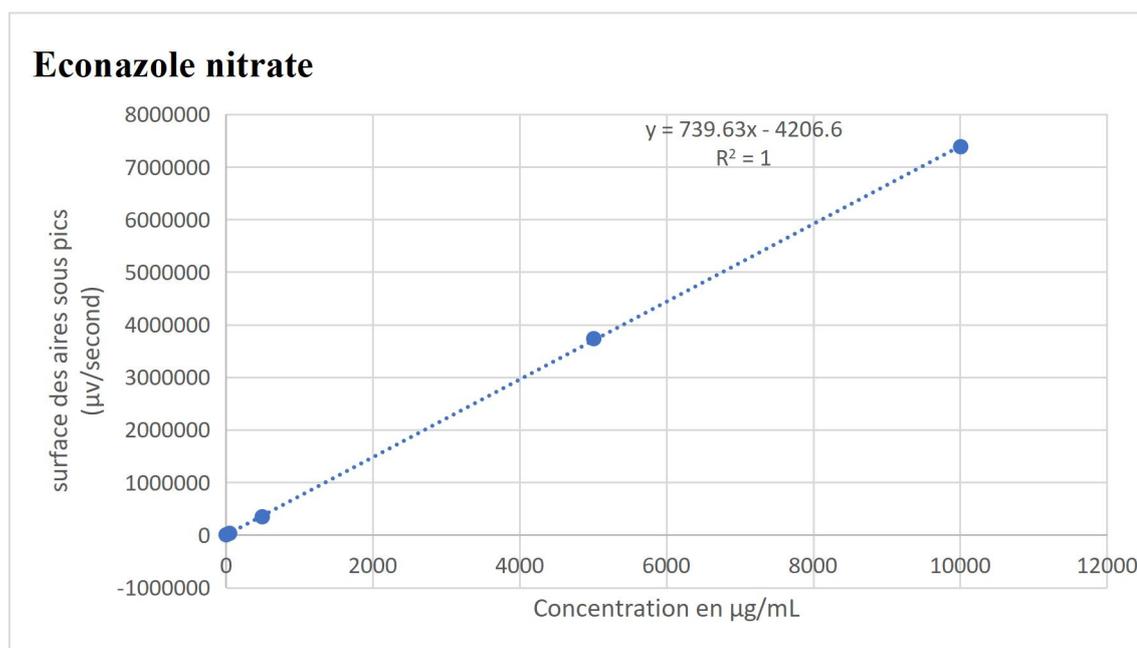


Figure 15. Droite de régression de l'EN pur

Le coefficient de régression de cette droite est $R^2 = 1$, c'est à dire la méthode de dosage de l'EN est linéaire sur l'intervalle de 0,05% à 100% de la concentration prescrite. Ceci nous permet de conclure qu'on peut calculer les pourcentages de PD par rapport à l'EN.

VI-5-2-2-2/ Linéarité des PD dans l'intervalle de 50% limite de report à 150% de la limite spécifiée

1- Résultats du produit de dégradation A

Tableau 17. Réponses chromatographiques suite à l'injection répétée de l'impureté A

Cible (%)	Série	Concentration injectée en (µg/ml)	Surface (µv/seconde)
0,05	01	5,020	2531
	02	5,170	1941
	03	4,950	2130
0,1	01	10,023	4645
	02	10,130	5079
	03	9,997	5145

0,15	01	15,030	7425
	02	15,142	6733
	03	14,983	8141
0,2	01	20,032	10526
	02	20,153	9422
	03	19,960	10452
0,3	01	30,013	15688
	02	30,130	15750
	03	28,870	14746

2- Résultats du CBA

Tableau 18. Réponses chromatographiques suite à l'injection répétée du CBA

Cible (%)	Série	Concentration injectée en ($\mu\text{g/ml}$)	Surface ($\mu\text{v/seconde}$)
0,05	01	4,970	3001
	02	5,010	2963
	03	4,950	3215
0,1	01	9,890	6312
	02	9,970	6007
	03	10,090	5941
0,15	01	15,070	10478
	02	14,990	9963
	03	15,020	10004
0,2	01	19,480	13847
	02	20,010	14235
	03	19,980	13571
0,3	01	29,350	20741
	02	30,010	21300
	03	30,130	21654

VI-5-2-2-3/ Tests statistiques

1- Interprétation de la linéarité de l'impureté A

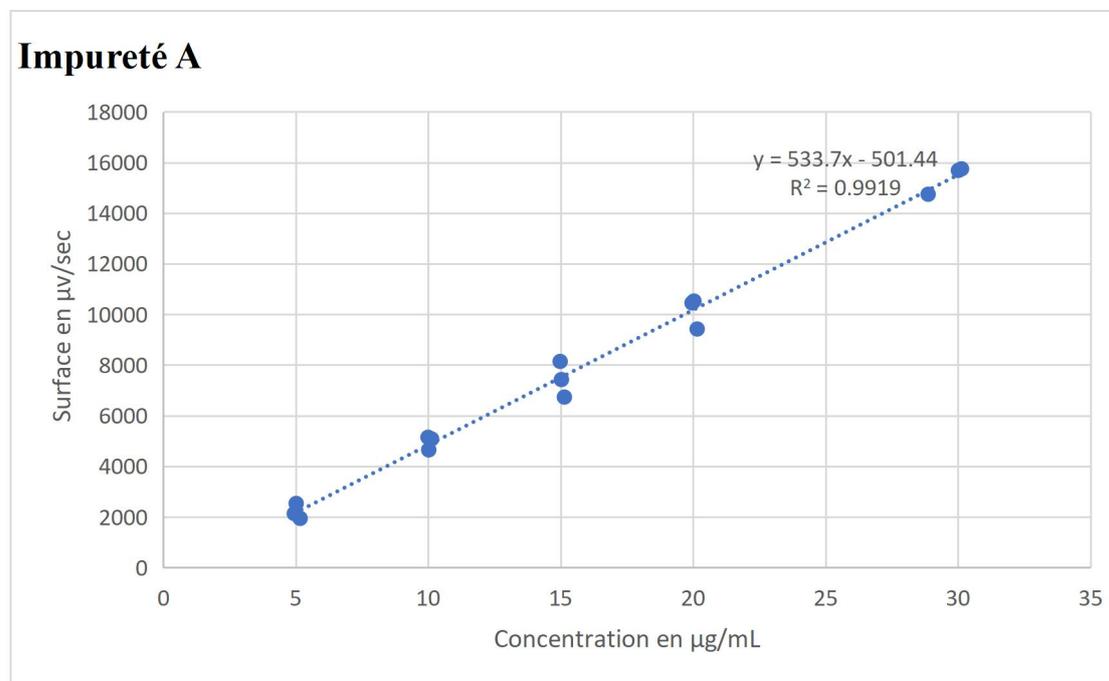


Figure 16. Droite de régression de l'impureté A

L'équation de régression linéaire obtenue, est de la forme ($Y = 533,7X - 501,44$), avec un coefficient de régression proche d'un ($R^2 = 0,99$), le tableau 19 résume les paramètres de corrélation.

Tableau 19. Paramètres de la linéarité de l'impureté A

Y = aX + b	
Pente (a)	533,698095
Ordonnée à l'origine (b)	-501,44
Coefficient de corrélation (R)	0,9959
Coefficient de régression (R ²)	0,9919

Partie expérimentale : Matériels méthodes et discussions des résultats

a. Test de Cochran (homogénéité des variances)

L'objectif de ce test est de vérifier l'homogénéité des variances constitutives de l'erreur expérimentale et ainsi de détecter la présence de valeurs suspectes.

Tableau 20. Homogénéité des variances dans [0,05% – 0,3%] du PD A

Concentration %	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3
Nombre série	3	3	3	3	3
Variance	90770,33	73785,33	495664	380865,33	316537,33
Somme des variances	1357622,32				
Variance max	495664				
Surface moyenne	2200,66667	4956,33333	7433	10133,3333	15394,6667
Coefficient de variation (%)	13,69	5,48	9,47	6,09	3,65

Tableau 21. Interprétation des résultats de l'impureté A selon le test de Cochran.

k (nombre d'essais)	n (nombre de répétition par série)	C calculé	C tabulé au risque 5% (C (0,05 ; k ; n-1))	C tabulé au risque 1% (C (0,01 ; k ; n-1))
5	3	0,3651	0,68	0,79
Conclusion	C calculé < C (0,05 ; 5 ; 2). Le test est valide au risque 5%, donc les variances sont homogènes			

b. **Test de Fisher** : C'est le test qui permet de vérifier l'existence d'une pente significative et la validité de la droite de régression.

-**Test de Fisher 1** : Le test de l'existence d'une pente significative consiste à comparer les variations dues à la régression et aux erreurs expérimentales et d'ajustement. L'objectif est de mettre en évidence la relation entre les surfaces et les concentrations. Les tableaux 22 et 23 regroupent les paramètres de l'existence d'une pente significative de l'impureté A et les résultats de l'impureté A selon le test de Fisher 1.

Tableau 22. Test de l'existence d'une pente significative de l'impureté A.

Origine de la variation	DDL	SCE	Variance
Var total	14	309779133,7	
Var due à la régression	1	307243589,4	307243589,4
Var résiduelle	13	2535544,4	195041,9

DDL : Degré de liberté

Var : Variation

SCE : Somme des carrés d'écart à la moyenne

Tableau 23. Interprétation des résultats de l'impureté A selon le test de Fisher 1.

k (nombre d'essais)	N (nombre total des répétitions)	F ₁ calculé	F ₁ tabulé au risque 5% (C (0,05 ; 1 ; N-2))	F ₁ tabulé au risque 1% (C (0,01 ; 1 ; N-2))
5	15	1575,27	4,67	9,07
Conclusion	F ₁ calculé > F ₁ tabulé (0,01 ; 1 ; 13). Nous pouvons conclure l'existence d'une pente significative.			

-Test de Fisher 2 : Ce test de validité de la droite de régression, est effectué pour prouver la linéarité de la relation. Les tableaux 24 et 25 montrent respectivement le test de validité de la droite de régression de l'impureté A et les résultats de l'impureté A selon le test de Fisher 2.

Tableau 24. Test de validité de la droite de régression de l'impureté A.

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Variance	F ₂ calculé
Erreur expérimentale	10	2437880.80	243788,08	0.13
Erreur de régression	3	97663.569	32554.52	

Tableau 25. Interprétation des résultats de l'impureté A selon le test de Fisher 2.

k (nombre d'essais)	N (nombre total des répétitions)	F ₂ calculé	F ₂ tabulé au risque 5% (C (0,05 ; 1 ; N-2))	F ₂ tabulé au risque 1% (C (0,01 ; k-2 ; N-k))
5	15	0,13	3,71	6,55
Conclusion	F₂calculé < F₂ tabulé (0,05 ; 3 ; 10). La droite de régression est valide au risque 5%			

c- Test de Student

Ce test permet de vérifier si l'ordonnée à l'origine est équivalente à 0. Les tableaux 26 et 27 illustrent les résultats du test de Student de l'impureté A.

Tableau 26. Test de Student de l'impureté A.

N	Ordonnée à l'origine (b)	Ecart type de l'ordonnée à l'origine	t _{calculé}	t tabulé (0,05 ; N-2)	t tabulé (0,01 ; N-2)
15	-501,44	242,23	2,07	2,16	3,01
Conclusion	t_{calculé} < t_{tabulé} (0,05 ; 13). L'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0 au seuil de probabilité α = 5% et la méthode est spécifique.				

Tableau 27. Récapitulatif de la linéarité de l'impureté A

Pente (b)		533,7			
Ordonnée à l'origine (a)		-501			
Coefficient de régression (R²)		0,9919			
Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0					
	t_{calculé}	t_{théorique} 5%	t_{théorique} 1%	Condition	Conclusion
	2,07	2,16	3,01	$t < t_{th.}$	Valide au risque 5%
Homogénéité des variances					
	C calculé	C_{théorique} 5%	C_{théorique} 1%	Condition	Conclusion
	0,37	0,68	0,79	$C < C_{th}$	Valide au risque 5%
Existence d'une pente					
	F_{1calcul} é	F_{théorique} 5%	F_{théorique} 1%	Condition	Conclusion
	1575, 27	4,67	9,07	$F_1 > F_{th.}$	Valide au risque 1%
Validité de la droite de régression					
	F_{2calcul} é	F_{théorique} 5%	F_{théorique} 1%	Condition	Conclusion
	0.13	3,71	6,55	$F_2 < F_{th.}$	Valide au risque 5%

2-Interprétation de la linéarité du 4-chlorobenzyl alcool (CBA)

La figure 17 montre la droite de régression du CBA.

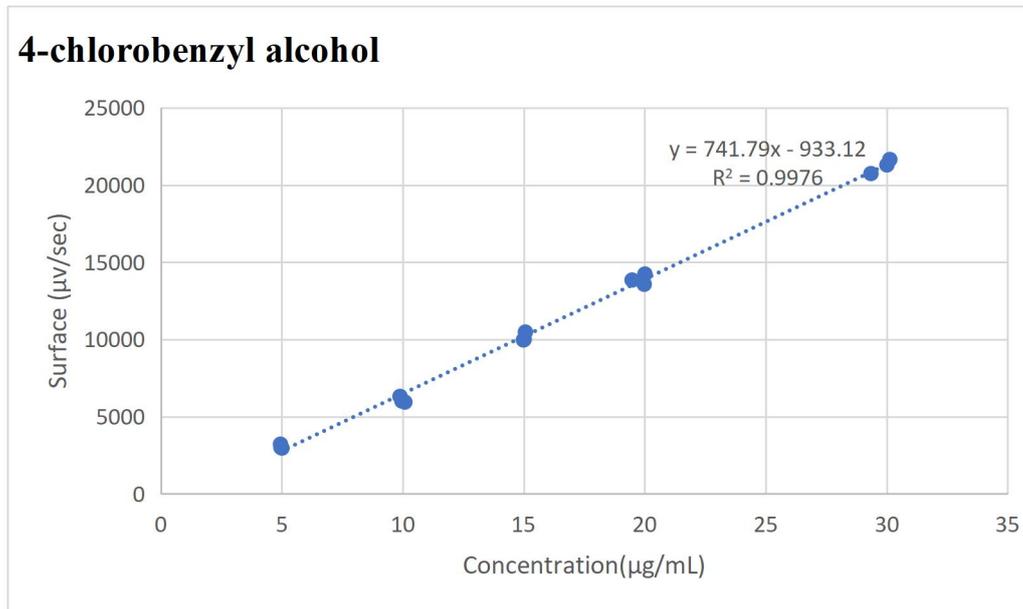


Figure 17. Droite de régression du CBA

La droite de corrélation obtenue est linéaire dont l'équation de la forme suivante :
($Y = 741,79X - 933,12$), avec les coordonnées suivantes :

Pente (a) : 741,791143

Ordonnée à l'origine (b) : -933,12

Coefficient de corrélation (R) : 0,9988

Coefficient de régression (R^2) : 0,9976

Partie expérimentale : Matériels méthodes et discussions des résultats

a. Test de Cochran (homogénéité des variances)

Les Tableaux 28 et 29 regroupent l'homogénéité des variances entre 0,05% et 0,3% du CBA l'interprétation des résultats du CBA selon le test de Cochran.

Tableau 28. Homogénéité des variances entre 0,05% et 0,3% du CBA.

Concentration %	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3
Nombre série	3	3	3	3	3
Variance	18457,33	39170,33	81930,33	111269,33	211894,333
Somme des variances	462721,667				
Variance max	211894,33				
Surface moyenne	3059,66667	6086,66667	10148,3333	13884,3333	21231,6667
Coefficient de variation (%)	04,44	03,25	02,82	02,40	02,17

Tableau 29. Interprétation des résultats du CBA selon le test de Cochran.

k (nombre d'essais)	n (nombre de répétition par série)	C calculé	C tabulé au risque 5% (C (0,05 ; k ; n-1))	C tabulé au risque 1% (C (0,01 ; k ; n-1))
5	3	0,4579	0,68	0,79
Conclusion	C calculé < C (0,05 ; 5 ; 2). Test valide au risque 5% , donc les variances sont homogènes			

b. **Test de Fisher** : test de l'existence d'une pente significative et test de validité de la droite de régression.

-Test de Fisher 1

Tableau 30. Test de l'existence d'une pente significative du CBA

Origine de la variation	DDL	SCE	Variance
Var total	14	603218457,0	
Var due à la régression	1	601739821,0	601739821,0
Var résiduelle	13	1478636,0	113741,2

DDL : Degré de liberté

Var : Variation

SCE : Somme des carrés d'écart à la moyenne

Tableau 31. Interprétation des résultats du CBA selon le test de Fisher 1.

k (nombre d'essais)	N (nombre total des répétitions)	F ₁ calculé	F ₁ tabulé au risque 5% (C (0,05 ; 1 ; N-2))	F ₁ tabulé au risque 1% (C (0,01 ; 1 ; N-2))
5	15	5290,43	4,67	9,07
Conclusion	F ₁ calculé > F ₁ tabulé (0,01 ; 1 ; 13). Test valide au risque 1% → nous pouvons conclure l'existence d'une pente significative.			

-Test de Fisher 2 :

Tableau 32. Validité de la droite de régression du CBA.

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Variance	F ₂ calculé
Erreur expérimentale	10	662478.56	66247.85	4.11
Erreur de régression	3	816157.396	272052.46	

Tableau 33. Interprétation des résultats du CBA selon le test de Fisher 2

k (nombre d'essais)	N (nombre total des répétitions)	F ₂ calculé	F ₂ tabulé au risque 5% (C (0,05 ; 1 ; N-2))	F ₂ tabulé au risque 1% (C (0,01 ; k-2 ; N-k))
5	15	4,11	3,71	6,55
Conclusion	F₂calculé < F₂ tabulé (0,05 ; 3 ; 10). La droite de régression est valide au risque 1%			

c- Test de Student : Ce test permet de faire la comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0.

Tableau 34. Test de Student du CBA

N	Ordonnée à l'origine (b)	Ecart type de l'ordonnée à l'origine	t _{calculé}	t tabulé (0,05 ; N-2)	t tabulé (0,01 ; N-2)
15	-933,12	181,59	5,14	2,16	3,01
Conclusion	t_{calculé} > t tabulé (0,05 ; 13). Test de student n'est pas valide				

Tableau 35. Récapitulatif de la linéarité du CBA

Pente (b)		742			
Ordonnée à l'origine (a)		-933			
Coefficient de régression (R²)		0,9976			
Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0					
	t _{calculé}	t _{théorique} 5%	t _{théorique} 1%	Condition	Conclusion
	5,14	2,16	3,01	t < t _{th.}	Non Valide
Homogénéité des variances					
	C calculé	C théorique 5%	C théorique 1%	Condition	Conclusion
	0,46	0,68	0,79	C < C _{th}	Valide au risque 5%
Existence d'une pente					

	$F_{1\text{calculé}}$	$F_{\text{théorique}} 5\%$	$F_{\text{théorique}} 1\%$	Condition	Conclusion
	5290, 43	4,67	9,07	$F_1 > F_{th.}$	Valide au risque 1%
Validité de la droite de régression					
	$F_{2\text{calculé}}$	$F_{\text{théorique}} 5\%$	$F_{\text{théorique}} 1\%$	Condition	Conclusion
	4,11	3,71	6,55	$F_2 < F_{th.}$	Valide au risque 1%

VI-5-2-3/ Exactitude

L'exactitude de la méthode est réalisée pour la forme reconstituée chargée par les PD. C'est évalué par le recouvrement moyen avec un intervalle de confiance à 95 %. Les recouvrements sont calculés par rapport au PA à 100 % réalisé dans le même le jour.

3-1/ Injection de l'étalon d'EN à 100%

Tableau 36. Résultats des injections répétées de 100% de l'EN

Concentration %	Série	Concentration injectée $\mu\text{g} / \text{ml}$	Surface ($\mu\text{V}/\text{seconde}$)
100	1	10000	6896100
	2	10000	7053200
	3	10000	7453200

3-2 / Validation de l'exactitude de l'impureté A

Le tableau 37 présente les paramètres de l'exactitude de la solution chargée par PD A.

Tableau 37. Paramètres de l'exactitude de la solution chargée par PD A

Cible %	Série	Concentration de la solution injectée (µg/ml)	Surface (µV/seconde)	Concentration trouvée en (µg/ml)	Recouvrement (%)	Variance
0.05	01	5,02	3327	4,82	96,10	49,73410 709
	02	4,72	2993	4,24	89,90	
	03	4,95	3836	5,15	103,98	
0.1	01	10,023	6668	9,67	96,47	19,09492 001
	02	10,13	6925	9,82	96,92	
	03	9,997	7768	10,42	104,25	
0.15	01	15,03	9981	14,47	96,30	0,135718 892
	02	15,142	10360	14,69	97,00	
	03	14,983	10813	14,51	96,83	
0.2	01	20,032	13918	20,18	100,75	54,08469 264
	02	20,153	14229	20,17	100,10	
	03	19,96	13047	17,51	87,70	
0.3	01	30,013	21664	31,41	104,67	45,31753 363
	02	30,13	19388	27,49	91,23	
	03	28,87	20924	28,07	97,24	

Les surfaces obtenues du produit de dégradation A sont multipliés par 1.4 (facteur de réponse relatif).

Calcul statistique

a. Test Cochran :

Tableau 38. Homogénéité des variances de recouvrement de l'impureté A.

Concentration %	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3
Nombre série	3	3	3	3	3

La somme des variances	54,0847
Variance max	168,3670
C calculé	0,3212
C tabulé au risque 5% (C (0,05 ; 5 ; 2))	0,68
C tabulé au risque 1% (C (0,01 ; 5 ; 2))	0,79
Conclusion	$C_{\text{calculé}} < C_{(0,05 ; 5 ; 2)}$. Les variations sont homogènes.

Conclusion

Les résultats indiqués dans le tableau 38, concernant l'homogénéité des variances de recouvrement de l'impureté A, ont montré que les valeurs *C tabulé au risque 5%*, sont supérieures aux valeurs calculées ce qui nous permet de conclure que les variations sont homogènes.

b. **Test de validité des moyennes**, ce test a pour but de prouver que les erreurs intra et intergroupes ne sont pas différentes. Les résultats de l'existence d'une variation intergroupe de l'impureté A, obtenus sont donnés dans le tableau 39.

Tableau 39. Test de l'existence d'une variation intergroupe de l'impureté A

	DDL	SCE	Variance	F ₁ calculé	F ₁ théorique 5%	F ₁ théorique 1%
Var total	14	354,25914	25,30422	0,13	3,48	5,99
Var intragroupe	10	336,73394	33,67339			
Var intergroupe	04	17,52520	4,38130			

Conclusion

Les résultats indiqués dans le tableau ci-dessus, ont montré que la validité des moyennes est non valide, ce qui entraîne, qu'il n'existe pas une variation intergroupe de l'impureté A (entre les groupes).

c. Calcul de recouvrement moyen et son intervalle de confiance à 95 %

L'intervalle de confiance de la méthode est déterminé avec un risque $\alpha = 5\%$ soit :

$$IC = \left[R\%m - \frac{\alpha}{2}, R\%m + \frac{\alpha}{2} \right] = [R\%m - 2,5\%, R\%m + 2,5\%]$$

R%*m* : La moyenne des taux de recouvrement trouvés

Tableau 40. Estimation de l'intervalle de confiance de l'impureté A

Recouvrement moyen		97,296	
Intervalle de confiance		94,86	99,73

Conclusion

Le taux de recouvrement trouvé est de (R% = 97,298), cette valeur appartient à l'intervalle [95% – 105%], donc l'exactitude de dosage de l'impureté A est validé, avec un intervalle de confiance $IC = [94,86 - 99,73]$ déterminé au risque 5%.

3-3 / Validation de l'exactitude du CBA :

Les résultats des paramètres de l'exactitude de la solution chargée par CBA sont donnés dans le tableau 41.

Tableau 41. Paramètres de l'exactitude de la solution chargée par CBA

Cible %	Série	Concentration de la solution injectée (µg/ml)	Surface (µV/seconde)	Concentration trouvée en (µg/ml)	Recouvrement (%)	Variance
0.05	01	5,02	3178	4,61	91,80	4,166149059
	02	4,86	3007	4,26	87,72	
	03	4,96	3324	4,46	89,92	
0.1	01	10,07	6668	9,67	96,02	3,703937544
	02	9,87	6925	9,82	99,48	
	03	9,95	7140	9,58	96,28	
0.15	01	15,01	9981	14,47	96,43	4,613089439
	02	15,06	10360	14,69	97,53	
	03	14,68	11004	14,76	100,57	
0.2	01	19,53	13170	19,10	97,79	7,364480233
	02	19,92	12985	18,41	92,42	
	03	20,04	14100	18,92	94,40	
0.3	01	30,02	20142	29,21	97,29	17,98262098
	02	29,97	21475	30,45	101,59	
	03	30,05	20854	27,98	93,11	

Calcul statistique

a. Test Cochran :

Tableau 42. Homogénéité des variances de recouvrement du CBA.

Concentration %	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3
Nombre série	3	3	3	3	3
La somme des variances	37,8303				
Variance max	17,9826				

Partie expérimentale : Matériels méthodes et discussions des résultats

C calculé	0,4753
C tabulé au risque 5% (C (0,05 ; 5 ; 2))	0,68
C tabulé au risque 1% (C (0,01 ; 5 ; 2))	0,79
Conclusion	$C_{\text{calculé}} < C_{(0,05 ; 5 ; 2)}$. Les variations sont homogènes.

Conclusion

D'après les résultats du test Cochran, concernant l'homogénéité des variances de recouvrement du CBA, on conclut que les variations sont homogènes.

b. Test de validité des moyennes :

Tableau 43. Test de l'existence d'une variation intergroupe du CBA

	DDL	SCE	Variance	F ₁ calculé	F ₁ théorique 5%	F ₁ théorique 1%
Var total	14	214,72183	15,33727			
Var intragroupe	10	75,66055	7,56606	4,59	3,48	5,99
Var intergroupe	4	139,06127	34,76532			

Conclusion

Les résultats obtenus montrent que le test validité des moyennes est vérifié au risque 1% mais il est non vérifié au risque 5%. On peut conclure qu'il n'existe pas une variation significative inter-groupe au seuil probabiliste de 5%.

C /Calcul de recouvrement moyen et son intervalle de confiance à 95 %

Tableau44. Estimation de l'intervalle de confiance du CBA

Recouvrement moyen		95,490	
Intervalle de confiance		93,10	97,87

Conclusion

Le taux de recouvrement trouvé est de (R%=95,49) qui appartient à l'intervalle [95% – 105%], ce qui entraîne que l'exactitude de dosage de l'impureté A est validé, avec un intervalle de confiance $IC = [93,1 - 97,87]$ au risque 5%.

VI-5-2-4/ Fidélité

C'est réalisé par répétition d'injection des concentrations proches à la limite de spécification 0.2 % (20 µg/mL) 7 fois chaque jour, pendant 3 jours dans la forme reconstituée et le calcul est estimé par rapport à une solution de PA à 100 % injectée trois fois dans le même jour.

4-1/ Injection de l'étalon d'EN à 100%

Le tableau 45 présente les résultats des injections répétées de 100% de l'EN.

Tableau 45. Résultats des injections répétées de 100% de l'EN

Concentration %	Série	Concentration injectée µg /ml	Surface(µV/seconde)
100	1	10000	6896100
	2	10000	7053200
	3	10000	7453200

4-2/ Solution reconstituée chargée par PD A

Les paramètres de la fidélité concernant la solution chargée par PD A, ont illustrés dans le tableau 46.

Tableau 46. Paramètres de la fidélité concernant la solution chargée par PD A

Série (jour)	Répétition	Concentration injectée µg/ml	Surface (µv/sec)	Concentration trouvée µg/ml	Recouvrement %	Variance
1	01	20,01	13012	18,87	94,30	8,238028 57
	02	20,01	13421	19,46	97,26	
	03	20,01	13527	19,62	98,03	
	04	20,01	13361	19,37	96,83	
	05	20,01	13203	19,15	95,68	
	06	20,01	13623	19,75	98,72	
	07	20,01	14258	20,68	103,33	
2	01	20,12	13161	18,66	92,74	1,881095 24
	02	20,12	12782	18,12	90,07	
	03	20,12	13009	18,44	91,67	
	04	20,12	13347	18,92	94,05	
	05	20,12	12945	18,35	91,22	
	06	20,12	12940	18,35	91,18	
	07	20,12	12836	18,20	90,45	
3	01	20,03	14533	19,50	97,35	3,335747 62
	02	20,03	14641	19,64	98,07	
	03	20,03	15089	20,24	101,07	
	04	20,03	14549	19,52	97,46	
	05	20,03	14772	19,82	98,95	
	06	20,03	14778	19,83	98,99	
	07	20,03	15249	20,46	102,15	

a. Test de Cochran

Le tableau 46 donne l'homogénéité des variances de recouvrement de l'impureté A.

Tableau 47. Homogénéité des variances de recouvrement de l'impureté A

Var max	8,2368
Somme des variances	13,4549
Ccalculé	0,6122
k (nb essais)	3
n (nb répétitions par essai)	7
Cthéorique 5%	0,68
Cthéorique 1%	0,76

Conclusion

Les résultats indiqués dans le tableau 47, concernant l'homogénéité des variances de recouvrement de l'impureté A, ont montré que les valeurs *C tabulé au risque 5%*, sont supérieures aux valeurs calculées [**C calculé < C (0,05 ; 5 ; 2)**] ce qui nous permet de conclure que les variances sont homogènes.

Le tableau 48 donne le calcul des coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité de l'impureté A

Tableau 48. Calcul des coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité de l'impureté A

Variance de répétabilité	4,484550861
Variance inter-groupes	15,335287
Variance de reproductibilité	19,81983786
Moyenne générale	96,16980658
CV_r(%) répétabilité	2,2%
CV_R(%) reproductibilité	4,63%

CV : coefficient de variation

Conclusion

Les valeurs du coefficient de variation de la répétabilité ainsi que de la reproductibilité sont conformes aux exigences d'ICH ($CV_I < 10\%$ et $CV_R < 10\%$)

4-3/ Solution reconstituée chargée par CBA

Le tableau 49 donne les paramètres de la fidélité concernant la solution chargée par CBA.

Tableau 49. Paramètres de la fidélité concernant la solution chargée par CBA

Série (jour)	Répétition n	Concentration injectée $\mu\text{g/ml}$	Surface ($\mu\text{v/sec}$)	Concentration trouvée $\mu\text{g/ml}$	Recouvrement %	Variance
1	01	20,04	13105	19,00	94,83	21,585390 5
	02	20,04	12993	18,84	94,02	
	03	20,04	13014	18,87	94,17	
	04	20,04	12874	18,67	93,16	
	05	20,04	13107	19,01	94,84	
	06	20,04	12063	17,49	87,29	
	07	20,04	14258	20,68	103,17	
2	01	19,99	13347	18,92	94,66	17,624814 3
	02	19,99	12170	17,25	86,32	
	03	19,99	13417	19,02	95,16	
	04	19,99	14017	19,87	99,42	
	05	19,99	12745	18,07	90,39	
	06	19,99	13458	19,08	95,45	
	07	19,99	12999	18,43	92,20	
3	01	20,02	13658	18,33	91,53	18,930147 6
	02	20,02	13126	17,61	87,97	
	03	20,02	14210	19,07	95,23	
	04	20,02	15012	20,14	100,61	
	05	20,02	13825	18,55	92,65	
	06	20,02	14389	19,31	96,43	
	07	20,02	14725	19,76	98,68	

Tableau 50. Homogénéité des variances de recouvrement du CBA

Variance max	21,5854
Somme des variances	58,1404
Ccalculé	0,3713
k (nb essais)	3
n (nb répétitions par essai)	7
Cthéorique 5%	0,68
Cthéorique 1%	0,76

Conclusion

Les résultats indiqués dans le tableau 50, concernant l'homogénéité des variances de recouvrement du CBA, ont montré que les valeurs C tabulé au risque 5%, sont supérieures aux valeurs calculées [C calculé < $C(0,05 ; 5 ; 2)$] ce qui nous permet de conclure que le test est valide au risque 5%, c'est-à-dire les variances sont homogènes.

Le tableau 51 regroupe le calcul des coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité du CBA

Tableau 51. Calcul des coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité du CBA

Variance de répétabilité	19,38450065
Variance inter-groupes	-2,241250803
Variance de reproductibilité	17,14324985
Moyenne générale	94,19913346
CV (%) répétabilité	4,67%
CV (%) reproductibilité	4,4%

Conclusion

Les valeurs du coefficient de variation de la répétabilité ainsi que de la reproductibilité mentionnées sur le tableau, sont conformes aux exigences d'ICH ($CV_r < 10\%$ et $CV_R < 10\%$).

VI-5-2-5-Limite de détection

Une solution de 0.05% (50% limite de report) est injectée, puis on calcule le rapport signal/bruit de la réponse. La limite de détection est définie par un rapport signal/bruit = 3

La limite de détection de la méthode est estimée par le calcul :

$$\left. \begin{array}{l} \text{LD} \longrightarrow 3 \\ 005\% \longrightarrow \text{Signal/bruit} \end{array} \right\} \text{LD}_{\text{théorique}} = \frac{0,05\% \times 3}{\text{rapport S/B}}$$

Rapport S/B : le rapport signal/bruit

Le tableau 52 résume les résultats du rapport signal/bruit après l'injection de 5 µg/mL de chaque produit de dégradation et ses LD.

Tableau 52. Calcul de la limite de détection de l'impureté A et du CBA

	Impureté A	CBA
Signal/bruit de solution de 0.05 %	10	12
Limite de détection en % calculée	0,015	0,013

VI-5-2-6-Limite de quantification

Une solution de 0.05% (50% limite de report) est injectée, puis on calcule le rapport signal/bruit de la réponse.

La limite de quantification est définie par un rapport signal/bruit = 3

La limite de quantification de la méthode est estimée par le calcul :

$$\left. \begin{array}{l} \text{LQ} \longrightarrow 10 \\ 005\% \longrightarrow \text{Signal/bruit} \end{array} \right\} \text{LD}_{\text{théorique}} = \frac{0,05\% \times 3}{\text{rapport S/B}}$$

Le tableau 53 résume les résultats du rapport signal/bruit de 50% de la limite de report et LQ calculées des impuretés de dégradation de l'EN.

Tableau 53. Calcul de la limite de quantification de l'impureté A et du CBA

	Impureté A	CBA
Signal/bruit de solution de 0.05 %	10	12
Limite de quantification en % calculée	0,05	0,042

a. Vérification de limite de quantification

On injecte 07 fois de la limite de quantification calculée de chaque produit de dégradation.

Il est à noter que le critère d'acceptation des RSD% pour des niveaux de 0,1 % d'impureté est de l'ordre de 15 %. Les surfaces obtenues après l'injection répétée de 5µg/mL de l'impureté A, sont donnés dans le tableau 54.

Tableau 54. Surfaces obtenues après l'injection répétée de 5µg/mL de l'impureté A

Injection	Surface (µv/sec)
1	2335
2	2338
3	2313
4	2313
5	2348
6	2335
7	2334
RSD (en %)	0,56

Conclusion

L'injection répétée de 5µg/mL de l'impureté A, a donné une valeur de RSD% < 15%, donc la LQ calculée est bonne.

Tableau 55. Surfaces obtenues après l'injection répétée de 4,2 µg/mL du CBA

Injection	Surface (µv/sec)
1	2746
2	2749
3	2715
4	2720
5	2761
6	2745
7	2744
RSD (en %)	0,60

Conclusion

L'injection répétée de 4,2 µg/mL du CBA, a donné une valeur de RSD% < 15%, cela veut dire que la LQ calculée est bonne.

b. Détermination du facteur de réponse relatif (RRF : *relative response factor*)

b-1/ Calcul de RRF

Ce facteur est calculé à l'aide de la méthode des pentes, à partir de la courbe de régression de la linéarité. Le facteur de réponse relatif (RRF) des deux impuretés, est donné par le rapport :

$$\text{RRF} = \frac{\text{pente PA}}{\text{pente PD}}$$

Le tableau 56 résume le calcul des facteurs de réponse relatif à l'aide des pentes de la linéarité.

Tableau 56. Calcul des facteurs de réponse relatif à l'aide des pentes de la linéarité

Pente de l'EN	Pente de l'impureté A	Pente du CBA
739,63	533,698	741,791
RRF (impureté A)	1,39	
RRF (CBA)	1,00	

Conclusion

Le facteur de réponse relatif de l'impureté A est différent d'un (RRF) $\neq 1$ donc une correction de la réponse à l'injection de cette impureté est nécessaire en multipliant par le facteur de correction qui est égale à 1,39, par contre pour CBA, le facteur de réponse est égal à un (RRF) = 1

b-2/ Injection d'une concentration connue de l'EN basse et une concentration connue

$$PD \text{ basse : } RRF = \frac{\text{surface } PA}{\text{surface } PD} \times \frac{[PD]}{[PA]}$$

Pour calculer ce rapport, on injecte individuellement les deux produits de dégradations et l'EN à des concentrations de 5 µg/mL. Le tableau 57 rassemble le calcul des facteurs de réponse relatif à l'aide des réponses de chaque analyte par rapport aux concentrations injectées.

Tableau 57. Calcul des facteurs de réponse relatif à l'aide des réponses de chaque analyte par rapport aux concentrations injectées.

	Concentration injectée (µg/mL)	Surface (µv/sec)	RRF
Impureté A	5,02	2231	1,38
CBA	4,97	3001	1,01
EN	4,89	2993	

Conclusion

Les résultats de calcul des facteurs de réponse relatif à l'aide des réponses de chaque analyte par rapport aux concentrations injectées, ont montré que le facteur de réponse relatif de l'impureté A est supérieur à l'unité (RRF = 1,38 > 1), ce qui impose la correction des aires sous les pics de l'impureté A, en multipliant par le facteur de correction (1,38). Par contre ce facteur est proche de l'unité pour le CBA, ce qui ne nécessite pas une correction de la surface.

Conclusion

Le médicament est une entité chimique possédant des propriétés curatives ou préventive à l'égard des maladies humaines. En contrepartie, il peut devenir néfaste pour l'organisme en altérant la sécurité ou l'innocuité. Ceci est lié au changement de l'intégrité chimique en dégageant des dégradants de la substance active dans la composition qui peuvent être toxiques.

La recherche et la caractérisation des impuretés de dégradation présente une grande importance dans le contrôle qualité pour garantir l'efficacité et la sécurité du médicament.

Notre travail porte sur la recherche des voies de dégradation de l'éconazole nitrate (EN), a montré qu'il est dégradable par le stress oxydatif et les deux produits de dégradation sont l'impureté A spécifiée et le 4-chlorobenzyl alcohol (CBA).

La chromatographie à haute performance couplée à détecteur à barrette de diode (HPLC-DAD) a été appliquée avec succès pour l'identification et le dosage de l'EN ainsi que ses produits de dégradation. Cette méthode proposée s'est avérée être une indication de stabilité par résolution de l'EN à partir de leurs produits de dégradation. De plus, la spécificité de celle-ci a été vérifiée par la résolution et la pureté des pics obtenus suite à l'injection des six solutions de différentes compositions.

La linéarité de l'EN a été prouvée dans l'intervalle $[5 - 10000\mu\text{g}/\text{mL}]$ avec un coefficient de régression égale à 1. Ainsi, la linéarité du dosage de l'impureté A et CBA a été validée dans l'intervalle $[5 - 30\mu\text{g}/\text{mL}]$ avec des coefficients de régression de 0,9919 et 0,9988 respectivement. Ce résultat est conforme aux normes en vigueur.

L'exactitude de la méthode a été validée par des taux de recouvrement moyens égales respectivement à 97,298 et 95,490 de l'impureté A et CBA.

La fidélité des deux produits de dégradation a été confirmée par les deux coefficients de variation qui égales à 4,63% et 4,4% de l'impureté A et CBA respectivement. (Les normes $<10\%$).

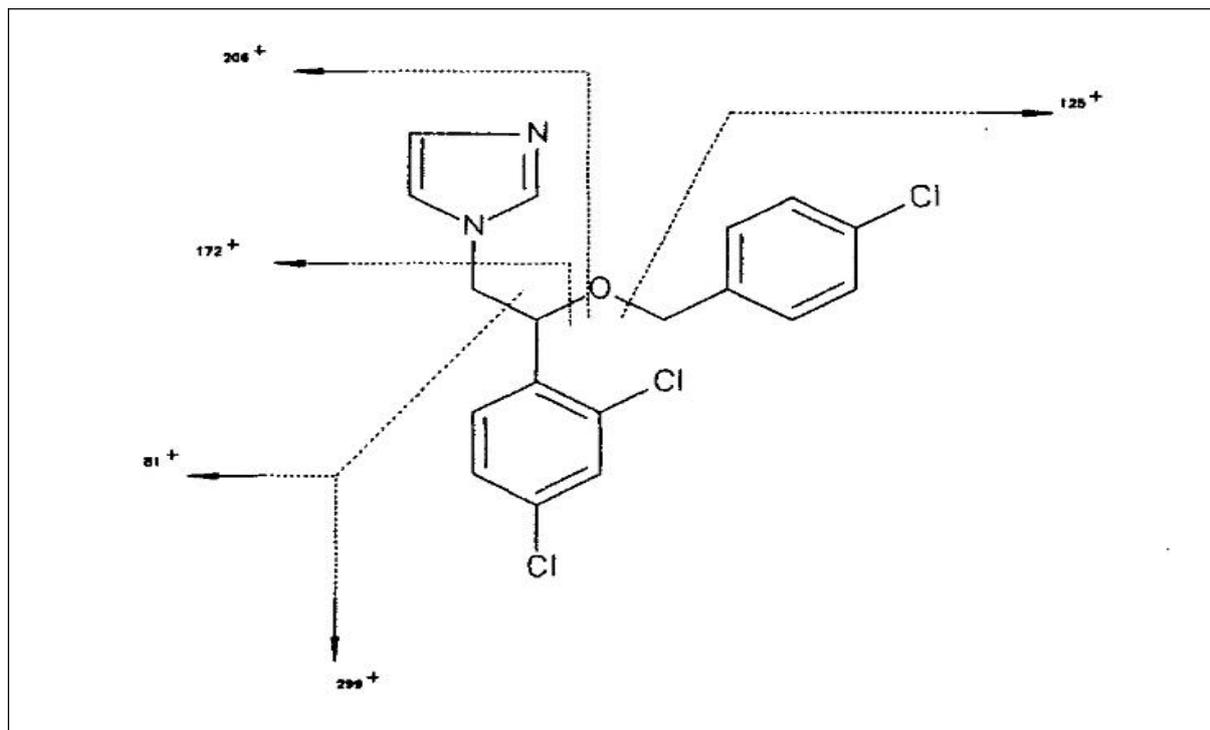
On a conclu aussi que la limite de quantification de chaque impureté trouvée est inférieure à celle de report, donc la méthode étudiée permet de détecter et quantifier avec fiabilité et certitude les impuretés de dégradation à des niveaux prescrits par les exigences réglementaires.

Conclusion

Ce modeste travail vient de démontrer le pouvoir de la dégradation forcée à indiquer la stabilité et la validité de la méthode. Mais ça nécessite un approfondissement à envisager sous forme de futures perspectives, notamment la qualification toxicologique de ces impuretés en administrant ces substances à l'animal dans le but d'estimer le seuil toxique de celles-ci, par la recherche d'éventuelle génotoxicité, ou également la mutagénicité et la tératogénicité, et bien sûr effectuer les études de stabilité habituelles pour consolider les résultats obtenus avec la dégradation forcée. Pour terminer nous proposons la problématique suivante : « Les substances trouvées sont-elles toxiques pour la santé humaine, et à quel seuil sont tolérables ? » qui sera considérée comme l'une des principales perspectives de cette étude.

Annexes

Annexe 1. Schéma de fragmentation probable de l'EN



Annexe 2. Equipements

	
pH mètre Metrohm®	Balance METTELER TOLEDO ®
	
HPLC Shimadzu®	HPLC Waters®

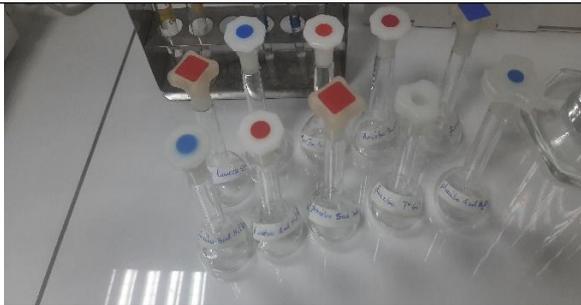
Annexe 3. Techniques analytiques



Préparation des solutions



Sonication des dilutions



Incubation des solutions de placebo stressé



Incubation des solutions du produit fini stressé

Résumé

Résumé

L'industrie pharmaceutique se heurte aux sérieux problèmes liés notamment à la dégradation des médicaments. La sécurité et l'efficacité du produit médicamenteux sont devenues une préoccupation majeure dans cette industrie. La détermination du profil des impuretés reflète à la fois la qualité de la substance active et du produit fini. Les impuretés de dégradation, font l'objectif essentiel dans la présente étude. L'approche adoptée dans ce travail repose d'une part sur l'évaluation de la stabilité chimique de l'éconazole nitrate en solution c'est à dire de sa réactivité chimique au travers des études de dégradation forcée, d'autre part sur la validation de la méthode indicatrice de la stabilité de cette substance. L'analyse chimique de l'éconazole nitrate, présentant un effet antifongique, a montré qu'il est très sensible à l'oxydation. Deux produits de dégradation ont été identifiés à savoir une première impureté spécifiée décrite par la pharmacopée européenne et l'USP, qui est l'impureté A et une deuxième impureté de dégradation non spécifiée qui est le 4-chloro-benzyl alcohol (CBA).

Mots clés : impuretés, dégradation, stabilité chimique, éconazole nitrate, limite de détection, limite de quantification.

ملخص

تواجه صناعة الأدوية مشاكل خطيرة تتعلق على وجه الخصوص بتدهور الأدوية. حيث أصبحت سلامة وفعالية المنتج الدوائي مصدر قلق كبير في هذه الصناعة. عكس تحديد ملف تعريف الشوائب جودة المادة الفعالة والمنتج النهائي. تفكك الشوائب، جعل الهدف الأساسي في هذه الدراسة. يعتمد النهج المتبع في هذا العمل أولاً على تقييم الثبات الكيميائي لنترات إيكونازول في المحلول، أي تفاعله الكيميائي من خلال دراسات التفكك القسري، وثانياً على التحقق من صحة الطريقة التي تشير إلى ثبات هذه المادة. أظهر التحليل الكيميائي لنترات إيكونازول، الذي أظهر تأثيراً مضاداً للفطريات، أنها حساسة جداً للأكسدة. تم تحديد اثنين من منتجات التفكك، وهما الشوائب المحددة الأولى التي وصفها دستور الأدوية الأوروبي ودستور الأدوية الأمريكي، وهي الشائبة A، وشوائب تفكك ثنائية غير المحددة وهي 4 كحول كلورو بنزيل (CBA).

في الجزء الثاني من هذه الدراسة ركزنا على تطوير والتحقق من الاستقرار الشامل الذي يشير إلى طريقة كروماتوجرافيا السائل عالية الأداء مع كشف صفيق الصمام الثنائي (HPLC-DAD)، من أجل التحديد المتزامن لنترات الإيكونازول (EN) ومنتجاتها المتفككة. تم التحقق من صحة النوعية والخطية والدقة والدقة للطريقة وتم تحديد حدود الكشف (DL) والتقدير الكمي (LOQ) لشوائب التفكك. حد التقدير الكمي (LOQ) للشوائب A و CBA الموجود أقل من حد الإبلاغ عن الشوائب غير المحدد بالإضافة إلى حد المواصفات. للكلمات المفتاحية: الشوائب، التفكك، الاستقرار الكيميائي، نترات إيكونازول، حد الكشف، حد القياس الكمي.

Abstract

The pharmaceutical industry faces serious problems related in particular to the degradation of drugs. The safety and efficacy of the drug product has become a major concern in this industry. The determination of the impurity profile reflects both the quality of the active substance and the finished product. Degradation impurities make the essential objective in the present study. The approach adopted in this work is based firstly on the evaluation of the chemical stability of econazole nitrate in solution, i.e. its chemical reactivity through forced degradation studies, and secondly on the validation of the method indicating the stability of this substance. Chemical analysis of econazole nitrate, exhibiting an antifungal effect, showed that it is very sensitive to oxidation. Two degradation products have been identified, namely a first specified impurity described by the European Pharmacopoeia and the USP, which is impurity A and a second unspecified degradation impurity which is 4-chloro-benzyl alcohol (CBA).

The second part of this study focuses on the development and validation of a comprehensive stability indicating high performance liquid chromatography method with diode array detection (HPLC-DAD), for the simultaneous determination of econazole nitrate (EN) and its degradation products. The specificity, linearity, precision and accuracy of the method were validated and the detection (DL) and quantitation (LOQ) limits of the two degradation impurities were determined. The limit of quantitation (LOQ) of impurity A and that of CBA found are below the unspecified impurity reporting limit as well as the specification limit.

Keywords: impurities, degradation, chemical stability, econazole nitrate, detection limit, quantitation limit

Ziadhamidi99@gmail.com

Références bibliographiques

Bibliographie

1. *LA LOI 18-11 (JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 46). SECRETARIAT GENERAL DU GOUVERNEMENT.* Dimanche 16 Dhou El Kaâda 1439 Correspondant au 29 juillet 2018, Vol. 40.
2. digischool ingénieurs. [En ligne] <https://www.ingenieurs.com/documents/cours/etapes-de-conception-d-un-medicament-337.php#:~:text=Le%20d%C3%A9veloppement%20gal%C3%A9nique%20a%20pour,'acceptabilit%C3%A9%20et%20d'innocuit%C3%A9..>
3. Ce que l'on doit savoir sur les essais cliniques . *AMIS FSH* . [En ligne] [Citation : 13 Février 2022.] <https://amisfsh.fr/%F0%9F%8F%A5-les-essais-cliniques/> .
4. Académie nationale de pharmacie. *Médicament générique.* 24 octobre 2012.
5. Agence Nationale de Sécurité de Médicament et des produits de santé. *GUIDE DES BONNES PRATIQUES DE FABRICATION.* France : s.n., 06/05/2019. Vol. 404.
6. Bathelot, B. *L'encyclopédie illustrée du marketing . définitions marketing* . [En ligne] <https://www.definitions-marketing.com/definition/qualite/>.
7. système de management de la qualité -exigences- . *iso 9001 :2015* . [En ligne] 09 2015. <https://www.iso.org/fr/publication/PUB100080.html>.
8. bonne pratique de laboratoire. *agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé.* [En ligne] 03 09 2021. <https://ansm.sante.fr/documents/reference/bonnes-pratiques-de-laboratoire>.
9. Pierre-Antoine, M. DURAFOUR. THESE Pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE. *L'IMPORTANCE DES ETUDES DE STABILITE DANS LE DOMAINE PHARMACEUTIQUE : QUALITE, REGLEMENTATION ET PROCESSUS GENERAL.* Saint-Etienne : s.n., 12 juin 2020 .
10. Gana, Inès. Caractérisation physique et chimique des substances à activité thérapeutique : application aux études de profil de stabilité et de préformulation . *THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES PHARMACEUTIQUES.* Paris : s.n., 2015. Vol. 238.
11. *la 10ème édition de la Pharmacopée Européenne.* 2020.
12. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. *IMPURITIES IN NEW DRUG PRODUCTS.* [En ligne] 02 juin 2006. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3B%28R2%29%20Guideline.pdf>.
13. European Medicines Agency. *ICH Topic Q 6 B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products.* [En ligne] septembre 1999. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-b-test-procedures-acceptance-criteria-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf.
14. *comité de l'OMS d'experts des spécifications relatives aux produits pharmaceutique série de rapports techniques 645 vingt-septième rapport.* 1979.
15. conformité du monitoring environnemental et des cartographies selon les directives FDA/ICH . *VAISALA / note d'application.* [En ligne] <https://www.vaisala.com/sites/default/files/documents/CEN-LSC-EMA-Better-Stability-Studies-Application-note-B211261FR-A-LOW.pdf>.

Références bibliographiques

16. **Comité OMS d'experts des spécifications relatives aux spécifications des produits pharmaceutique , trente et unième rapport.** Genève : s.n., 1990.
17. **ICH Topic Q 1 A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products .** *European Medicines Agency*. [En ligne] August 2003. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5_en.pdf.
18. **ICH. ICH TOPIC 6 A , Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances .** *European Medicines Agency*. [En ligne] Mai 2000. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-test-procedures-acceptance-criteria-new-drug-substances-new-drug-products-chemical_en.pdf.
19. **Stability considerations in dispensing practice . .** *U.S.PHARMACOPEIA* . [En ligne] [Citation : 06 février 2022.] http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1191.html . USP29-NF24. Page 3029..
20. **Khalifa, Nagwa Masaud. Empirical and Kinetic Models for the Determination of Pharmaceutical Product Stability .** *thesis requirement for the degree of Master of Applied Science in Chemical Engineering*. Canada : s.n., 2010. Vol. 111.
21. **World Health Organization .** *Annex 5 : Guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms* . 1996. WHO Technical Report Series, No. 863 .
22. **PAYEN, Nicolas. Les anomalies dans le circuit des médicaments thermosensibles à l'hôpital.** Ecole Nationale de La Santé Publique. RENNES : s.n., 2005.
<https://documentation.ehesp.fr/memoires/2005/phisp/payen.pdf>.
23. **STABILITY TESTING OF ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS AND FINISHED PHARMACEUTICAL PRODUCTS.** *Working document QAS/17.694 of WHO*. [En ligne] January 2017. [Citation : 06 février 2022.] https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/stblty-testing-APIsandFPPS-QAS17-694_12012017.pdf.
24. **Assurance de la qualité des produits pharmaceutiques .** *Organisation mondiale de la santé* . [En ligne] 1998. [Citation : 08 février 2022.]
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42015/924254504X_fre.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
25. **J.Y.VIDEAU. LA QUALITÉ DES MÉDICAMENTS DANS LES PAYS LES PLUS DÉFAVORISÉS.** [En ligne] 2006. [Citation : 08 Février 2022.] [https://www.jle.com/fr/MedSanteTrop/2006/66.6/533-537%20%20La%20qualit%C3%A9%20des%20m%C3%A9dicaments%20dans%20les%20pays%20les%20plus%20d%C3%A9favoris%C3%A9s%20\(Videau\).pdf](https://www.jle.com/fr/MedSanteTrop/2006/66.6/533-537%20%20La%20qualit%C3%A9%20des%20m%C3%A9dicaments%20dans%20les%20pays%20les%20plus%20d%C3%A9favoris%C3%A9s%20(Videau).pdf).
26. **Bouillon, Bédouier. CONCEPTION DES ETUDES DE STABILITE DES MEDICAMENTS.** *slideplayer* . [En ligne] [Citation : 08 Février 2022.] <https://slideplayer.fr/slide/1206458/>.
27. **PONT, Edouard. thèse pour diplôme d'état de docteur en pharmacie .** *CONTROLE DES IMPURETES DANS LES SUBSTANCES POUR USAGE PHARMACEUTIQUE SELON LA PHARMACOPEE EUROPEENNE : EVOLUTION DES CONNAISSANCES ET DES METHODES ANALYTIQUES DE CONTROLE* . Limoges : s.n., 2011 .
28. **SCODELLARO, Antoine. thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie .** *REVUE DU PROCESSUS DES ETUDES DE STABILITE DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE : DE LA REGLEMENTATION A LA REALISATION ET JUSQU'A L'EXPLOITATION DES TENDANCES OBSERVEES* . 2013 . Vol. 150.

Références bibliographiques

29. GUIDELINE FOR ELEMENTAL IMPURITIES Q3D(R1). *ICH HARMONISED GUIDELINE*. [En ligne] 22 Mars 2019. [Citation : 13 Février 2022.] https://database.ich.org/sites/default/files/Q3D-R1EWG_Document_Step4_Guideline_2019_0322.pdf.
30. ICH Q3A . *IMPURITIES IN NEW DRUG SUBSTANCES*. [En ligne] 25 octobre 2006. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A%28R2%29%20Guideline.pdf>.
31. pharmacie, Académie nationale de. *Médicament générique* . 24 octobre 2012 .
32. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE . *IMPURITIES IN NEW DRUG PRODUCTS Q3B*. [En ligne] 02 juin 2006. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3B%28R2%29%20Guideline.pdf>.
33. ., Institut National de Recherche et de Sécurité. *Fiches solvants (les solvants organique)* . Paris : s.n., 2009. ED 4220.
34. ICH. *guideline Q3C (R8) on impurities: guideline for residual solvents* . s.l. : European Medicine Agency, 20 May 2021 .
35. ELSEVIER MASON . *journal of pharmaceutical and biomedical Analysis "the contamination of valsartan and other sartans, part 1"*. Germany : s.n., 2019 .
36. SCODELLARO, Antoine. *REVUE DU PROCESSUS DES ETUDES DE STABILITE DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE : DE LA REGLEMENTATION A LA REALISATION ET JUSQU'A L'EXPLOITATION DES TENDANCES OBSERVEES. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie*. Rouen : s.n., 2013. Vol. 150.
37. *Current trends in forced degradation study for pharmaceutical product development*. Singh, Ranjit. Panjab Inde : s.n., June 2012.
38. *A Review on Stress Testing of Drug Substances and Drug Product*. Patil, Poonam Prakash. Décembre 2012.
39. JAVOY, Sandra. *Détermination de constantes de vitesse de réactions chimiques élémentaires importantes dans la combustion de l'hydrogène en régime d'écoulement supersonique*. France, 26 octobre 2001. thèse de doctorat .
40. Huynh-Ba, Kim. *Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development (Regulations, Methodologies, and Best Practices)* . New York U.S.A : s.n., juillet 2008.
41. *Stability Studies of a Mixture of Paracetamol and Ascorbic Acid, Prepared Extempore, at Elevated Temperature and Humidity Conditions*. Iwona Golonka, Andrzej Kawacki et Witold Musial. wroclaw, pologne : s.n., 5 juillet 2015.
42. Annick Rouessac, Francis Rouessac. *Techniques instrumentales d'analyse chimique*. Le Mans France : s.n., avril 2021.
43. W.DONG, RAPHAEL M.ORNAF et MICHAEL. *2 key concepts of HPLC in pharmaceutical analysis* . New York : s.n., 2005.
44. G.MAHUZIER, M.HAMON , D.FERRIER et P.PROGNON. *Chimie analytique Tome 2 technique de séparation 3ème édition*. Paris : Elsevier / Masson, 03/1999.
45. Sanjay Bajaj, Saranjit Singh. *Methods for Stability Testing of Pharmaceuticals* . India : s.n., 2018.

Références bibliographiques

46. Robert M Silverstein, Francis X Webster, David J Kiemle. *Identification spectrométrique de composés organiques* . s.l. : De Boeck 3ème édition, 2016.
47. RAYNAUD, Marianne. VALIDATION DU PROCEDE DE FABRICATION DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE, APPLIQUEE AUX FORMES SOLIDES ORALES. *THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE*. LIMOGES FRANCE : s.n., 11 avril 2011. Vol. 150.
48. Pinguet, Isabelle. 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*. bordeau : s.n., 2015. Vol. 92.
49. ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology . *European Medicines Agency* . [En ligne] juin 1995. [Citation : 15 Mars 2022.]
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf.
50. *Dictionnaire des médicaments SAIDAL CRD*. édition 2005.
51. Editorial staff of the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. *Martindale 35 The complete Drug Reference*.
52. *Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs* . M, Ruchi D. PatelPrajesh N. PrajapatiY.K. Agrawa Blessy. Gujarat, India : s.n., 10 septembre 2013 .
53. *SELECTION OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHODS IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS*. G. SZEPESI*, M. GAZDAG and K. MIHALYFI. Netherlands : s.n., 1989.
54. *A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis* . Glaxo Group Research . Britain : s.n., 1990.
55. SONS, A JOHN WILEY &. *ANALYTICAL METHOD VALIDATION AND INSTRUMENT PERFORMANCE VERIFICATION* . Canada : s.n., 2004.
56. ANSM. *RÉSUMÉ DES CARACTÉRISTIQUES DU PRODUIT*. 23/08/2012.
57. Mostafa M. Baker, Tarek S. Belal, Mohamed S. Mahrous Hytham M. Ahmed Hoda G. Daabees. *Validated Stability-Indicating HPLC-DAD Method for Simultaneous Determination of Econazole Nitrate, Triamcinolone Acetonide, Benzoic Acid and Butylated Hydroxyanisole in Cream Dosage Form*. Alexandria, Egypt : s.n.
58. *Simultaneous determination of econazole nitrate, main impurities and preservatives in cream formulation by high performance liquid chromatography*. Angel Arturo Gaona-Galdos *, Pedro López García, María Segunda Aurora-Prado, Maria Inês Rocha Miritello Santoro, Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann. Sao Paulo Brésil : s.n., 2008.