



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne démocratique et populaire



-----oOo-----

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

-----oOo-----

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

جامعة مولود معمري
كلية الطب
قسم الصيدلة
تيزي وزو

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES EN VUE DE L'OBTENTION D'UN
DIPLÔME DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenu publiquement le : 14/07/2022

Mise au point et validation d'une nouvelle méthode de
dosage du Fluconazole dans le plasma humain par
HPLC-UV

Réalisé par :

M^{elle} BOUKHARI Dihya

M^{elle} CHERIFI Khaoula

M^{elle} TIMHADJELT Bayane

Encadrées par :

Dr. BEN SI SAID Hassan

Co-encadrées par :

Dr. CHEKROUN Tassadit

Devant le jury :

Pr. MAMOU Marzouk

MCAHU-Faculté de médecine UMMTO

Président de jury

Dr. BEN SI SAID Hassan

MAHU-Faculté de médecine UMMTO

Promoteur

Dr. ABDERRAHIM Wissem

MAHU-Faculté de médecine UMMTO

Examinatrice

Dr. YAMANI Arezki

Assistant-Faculté de médecine UMMTO

Examineur

Dr. CHEKROUN Tassadit

Résidente-Faculté de médecine UMMTO

Co-promotrice

Année universitaire : 2021/2022

Remerciement

Nous remercions tout d'abord le Grand Dieu de nous avoir donné du courage et de la volonté et de nous avoir entouré de bonnes personnes pour pouvoir finir ce travail.

Nous tenons à remercier très sincèrement **Dr BEN SI SAID Hassan**, maître-assistant en chimie analytique au département de pharmacie de la faculté de médecine de l'Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, notre cher promoteur et l'un des meilleurs enseignants qu'on a pu avoir durant notre cursus au sein de cette faculté, pour sa patience et sa bienveillance envers nous, pour nous avoir suivi, conseillé, guidé et soutenu sans relâche durant tout ce travail. Votre sérieux, sympathie, modestie et l'accueil chaleureux que vous nous accordez à tout moment, nous ont marqués à tout jamais. Veuillez agréer l'expression de notre profonde admiration pour toutes vos qualités humaines et scientifiques qui nous servent d'exemple.

Nous voudrions remercier également **Dr CHEKROUN Tassadit** résidente en chimie analytique CHU Tizi-Ouzou / UMMTO pour son dévouement et son sérieux irréprochable, pour ses conseils précieux qui nous ont guidé tout le long et qui a été une co-promotrice exemplaire, très adorable et serviable à tout moment.

Nous remercions **Dr ABDENNOURI Abdelhamid** résident en chimie analytique CHU Tizi-Ouzou et toute l'équipe du laboratoire de chimie analytique de la faculté pour nous avoir accueilli et nous ouvrir les portes du laboratoire.

Nous remercions l'ensemble des membres du jury : **Pr MAMOU.M** professeur en chimie analytique au département de pharmacie de Tizi-Ouzou et président de jury, **Dr. ABDERRAHIM.W** maître-assistante hospitalo-universitaire en parasitologie CHU Tizi-Ouzou / UMMTO et **Dr. YAMANLA** assistant en toxicologie CHU Tizi-Ouzou, pour l'honneur qu'ils nous ont attribué en acceptant d'évaluer et d'examiner notre travail.

En dernier lieu, que toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation et à l'aboutissement de ce travail soit vivement remerciée.

Dédicace

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Je dédie ce mémoire à mes parents qui m'ont doté d'une éducation digne et qui n'ont jamais cessé de formuler des prières à mon égard.

Mon cher **Abi**, qui m'a toujours épaulé et encouragé dans tout ce que je fais, qui a beaucoup sacrifié pour moi et qui a toujours été mon exemple de courage et de force.

Mamy, l'être le plus cher de ma vie, mon pilier et mon soutien morale au quotidien, qui a tout donné pour que je puisse avancer durant toutes mes années d'études.

Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler.

J'espère vous rendre fière avec ce modeste travail, et durant toute ma vie. Sans vous, je ne serai jamais arrivée là où j'en suis aujourd'hui.

À **Oussama**, le meilleur frère au monde, mon complice et mon bras droit qui a toujours été là pour moi dans les hauts et les bas. À ma sœur **Zina**.

À toute ma famille, mes grands-parents, mes oncles, mes tantes et mes cousins.

À **Khoukha**, ma sœur de cœur, mon double, ma confidente et ma meilleure amie. Avec qui j'ai vécu les meilleurs moments de ma vie, on a su surmonter nos joies et nos peines ensemble. Merci d'être la personne que tu es, les mots ne suffiront pas pour exprimer à quel point je t'aime, et je t'aimerai toujours.

À **Dyhia** qui a donné à mes années d'études un goût spéciale, malgré nos différents on a toujours réussi à se retrouver et à créer des moments qui resteront gravés dans mon cœur à tout jamais.

À tous mes amis, à **Kahina**, **Mina chan**, **Soumii**, **Hafidh**×2, **Nènè**, **Samou**, **Assoum**, **Lamou** et notamment, **Bidouche** my partner in crime et ma meilleure découverte à la fac, une personne qui m'est très chère et qui a marqué ma vie.

À mon enseignant et mon promoteur **Dr BEN SI SAID** à qui je dois tout mon respect et ma considération d'avoir été un prof exemplaire durant tout mon cursus.

À mes chats que j'aime énormément, notamment, **Mchawcha**, **Thelja** et **Luffy** qui nous ont quitté trop tôt et qui me manquent beaucoup

À tous ceux qui ont contribué de prêt ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Bayane

Dédicace

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

C'est avec une joie immense et le cœur ému que je dédie ce travail

A mes très chers parents

Pour leur affection inépuisable et leurs précieux conseils, qui n'ont jamais cessé de prier pour moi durant mon cursus, qui m'ont encouragé au quotidien et qui ont toujours été là dans les moments les plus marqués de ma vie. Je ne saurai jamais vous remercier assez pour tous vos sacrifices.

A mes chers frères **Nassim** et **Mazigh**

A mes chères sœurs **Naima** et **Saliha**

Pour leur soutien, attention et leur présence à mes côtés durant les moments difficiles, qui n'ont jamais hésité à me donner tout l'amour et le confort dont j'avais besoin

A mon neveu **Moumouh** et à mes nièces **Lina**, **Céline** et **Ania**

A tous mes amis

Mes binômes **Khaoula** et **Bayane** qui sont des amies en or avec qui j'ai partagé six années pleines de joie et de moments formidables.

A **Lina** et **Nadine** qui m'ont toujours donné confiance pour aller de l'avant et qui étaient à l'écoute à tout moment

A **Dr BEN SI SAID**, le meilleur promoteur que j'ai pu avoir, que je remercie énormément pour ses conseils précieux et son encouragement et à qui je dois beaucoup de respect

A toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail et à tous ceux que j'ai omis de citer.

Dyhia

Dédicace

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

A ma chère tante **Aicha** qui est partie avant qu'on puisse célébrer ce jour ensemble, mon exemple. Je n'oublierai jamais ton soutien et tes encouragements, ta douceur et ton sourire. Tu vivras à jamais dans mon cœur et dans ma mémoire. Je te dédie toutes mes réussites.

A ma mère **Ouahiba**, à mon père **Mohammed**, qui ont toujours fait de leur mieux pour nous. Je vous témoigne ma profonde reconnaissance pour tous vos innombrables sacrifices. Vous m'avez accompagné durant les différentes étapes de ma vie, de mon premier jour à l'école avec ma blouse rouge jusqu'à ce jour. Je ne saurais m'exprimer à propos de vous, je vous porterai dans mon cœur pour toujours. Je suis là aujourd'hui grâce à vous.

A mes sœurs **Maysoune et Cerine**, à mes frères **Aymene et Mouad**, les petits qui sont devenus grands. Gros cœur sur vous.

A mon amie d'enfance, mon amie de tous les temps, à toi **Bayane**. Les souvenirs qu'on a créé durant ces longues années ne s'effaceront jamais de ma tête. Ce fut un plaisir de sortir avec toi, de préparer les examens avec toi, de partager les stages avec toi, ce fut un plaisir de t'avoir dans ma vie. J'attends avec impatience les surprises que la vie nous réserve. Ka nahmaq alik.

A **Dyhia** qui a donné un autre goût à ces six années d'études. Je te remercie pour les jolis moments qu'on a pu passer ensemble, tu as été une personne simple, sincère et honnête. Les heures interminables à la bibliothèque, nos TP, nos rigolades et nos appels qui dureraient une éternité me manqueront à jamais.

A mon meilleur ami **Mouh** qui, malgré le peu de temps qu'on passe ensemble, a toujours été présent dans les moments de joie comme ceux de tristesse et qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'écouter. Mon ami sur qui je peux compter et qui est toujours là pour me rassurer, celui qui m'a vu dans mes différents états et qui a toujours été là pour me rappeler de qui je suis. Je te remercie pour tout.

A ma jolie **Sarah**, j'adore notre relation simple et flexible qui est née d'une rencontre assez spéciale et spontanée, tu es l'une des meilleures.

A mes tantes paternelles : **Aicha** déjà partie, **Fadhela, Tassadit, Drifa et Rzika**, ainsi que mes oncles : **Amar et Hassane**, à mes cousins **Lamia et Lyes**, mes amis d'enfance, à mes cousines **Hanane, Chahrazed et Malek**. Je vous remercie pour les jolis moments qu'on ne cesse de créer. Vous êtes les meilleurs de tous les temps, je vous aime fort.

A ma grand-mère maternelle **Jamila**.. à mes tantes : **Saliha, Hinda et Hamida**.. à mon oncle **Ziad**.. à mes cousines : **Imene et Hanane**, je vous aime.

Khaoula

Table des matières

Table des matières	i
Liste des abréviations	v
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	ix
Introduction	1
Objectifs	3

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I : Fluconazole

1. Définition.....	4
2. Propriétés physicochimiques	4
3. Propriétés pharmacologiques.....	5
4. Usages.....	6
4.1. Indications	6
4.2. Posologie	7
4.3. Effets indésirables	7
4.4. Contre-indications	7
4.5. Précautions d'emploi.....	8
4.6. Interactions médicamenteuses	8
5. Fertilité, grossesse et allaitement.....	10
6. Surdosage et toxicité.....	11

Chapitre II : Validation des méthodes de dosage

1. Définition de la validation analytique	12
2. Objectifs de la validation	12
3. Aspect réglementaire et normatif	13
3.1. Documents ISO 17025	13
3.2. Documents ICH.....	13
3.3. Documents de la FDA (guidance of industry).....	13
3.4. Documents des commissions de la SFSTP.....	13
4. Cycle de vie d'une méthode analytique.....	14
5. Protocole de validation	15
6. Domaines d'application.....	17
7. Etapes de validation.....	18
8. Procédures à valider.....	18

9.	Niveaux de validation.....	19
9.1.	Une validation complète.....	19
9.2.	Une validation partielle	20
9.3.	Une validation croisée	20
10.	Critères et statistiques de validation	20
10.1.	Spécificité/Sélectivité.....	20
10.2.	Fonction de réponse.....	22
10.3.	Alignement des observations.....	24
10.4.	Prédiction inverse	25
10.5.	Linéarité de la concentration prédite	26
10.6.	Fidélité.....	27
10.7.	Justesse	28
10.8.	Exactitude	29
10.9.	Sensibilité	29
10.10.	Limite de détection.....	29
10.11.	Limite de quantification	30
10.12.	Robustesse.....	30
10.13.	Stabilité de la solution.....	30
11.	Le choix des critères de validation	31
12.	Le profil d'exactitude	31
12.1.	Règles de décision	32
12.2.	Application	33
12.3.	Profil d'exactitude proprement dit.....	33
Chapitre III : Analyse biologique et suivi thérapeutique pharmacologique		
1.	Analyse biologique.....	35
1.1.	Nature du milieu biologique et mode de prélèvement.....	35
1.2.	Effet matrice.....	35
1.3.	Prétraitement	36
1.4.	Techniques de dosage en bioanalyse	38
1.5.	Choix de la technique de dosage	39
1.6.	Interprétation des résultats.....	39
2.	Suivi thérapeutique pharmacologique	39
2.1.	Définition.....	39
2.2.	Caractéristiques des médicaments nécessitant un suivi.....	39
3.	Niveau de preuve du suivi thérapeutique du Fluconazole	40
3.1.	Situations recommandant un suivi thérapeutique	41

PARTIE PRATIQUE

Matériel et méthode

1. Matériel.....	44
1.1. Verrerie et autres	44
1.2. Matières premières	45
1.3. Réactifs	45
1.4. Equipements et appareillage.....	46
2. Méthodes	49
2.1. Optimisation de la méthode :.....	49
2.2. Méthodologie de la validation analytique	51
2.3. Préparation des standards	53
2.4. Conditions Chromatographiques	53
2.5. Préparation de la feuille de calcul	54

Résultats et discussion

1. Résultats	55
1.1. Chromatogrammes obtenus du dosage du Fluconazole et de la Métronidazole (étalon interne)	55
1.2. Temps de rétention obtenus.....	56
1.3. Calcul de la résolution.....	56
1.4. Informations concernant les données brutes.....	57
1.5. Sélectivité et effet matrice	57
1.6. Fonction de réponse.....	62
1.7. Profils d'exactitude obtenus	71
1.8. Choix de la fonction de réponse	72
1.9. Alignement des observations.....	73
1.10. Prédiction inverses	75
1.11. Justesse	75
1.12. Fidélité.....	76
1.13. Exactitude.....	76
1.14. Erreur totale et profil d'erreur totale.....	77
1.15. Intervalle de tolérance	78
1.16. Profil d'exactitude	78
1.17. Linéarité.....	79
1.18. Limites de quantification.....	81
2. Discussion.....	81
2.1. Résolution.....	81
2.2. Sélectivité et effet matrice	81

2.3. Choix de la fonction de réponse	82
2.4. Justesse	84
2.5. Fidélité.....	83
2.6. Erreur totale.....	83
2.7. Profil d'exactitude	83
2.8. Limites de quantification et intervalle de dosage	84
2.9. Linéarité de la concentration prédite	84
3. Comparaison avec une autre étude	85
Conclusion.....	88
Bibliographie	
Annexes	
Résumé	

Liste des abréviations

ACN : Acétonitrile

ALAT : Alanine Amino-tansférase

ARA II : Antagoniste des Récepteurs de l'Angiotensine II

ASAT : Aspartate Amino-tansferase

ASC : Air Sous la Courbe

AUC : Air Under the Curve

BPF : Bonne Pratique de Fabrication

C_{max} : Concentration maximale

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CV : Coefficient de Variation

CYP : Cytochrome P450

DRESS : Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms

EI : Etalon Interne

FDA : Food and Drug Administration

HCl : Chlorure d'hydrogène

HMG-CoA : Hydroxy methylglutaryl CoA

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

ICH : Conseil International d'Harmonisation

IR : Infra Rouge

ISO : Organisation International de Standardisation

IV : Intraveineux

LCR : Liquide Cephalo-Rachidien

LQ : Limite de Quantification

PA : Principe Actif

PAL : Phosphatase Alcaline

pH : Potentiel d'Hydrogène

PNN : Polynucléaire Neutrophile

RMN : Résonance Magnétique Nucleaire

SE : Standard d'étalonnage

SCE : Sommes de Carrées des Ecart

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

SM : Spectrométrie de Masse

STP : Sciences et Technique Pharmaceutique

SV : Standard de Validation

TCA : Acide Trichloroacétique

UV : Ultra-violet

VIH : Virus d'Immuno-déficience Humaine

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique du Fluconazole	4
Figure 2 : Cycle de vie d'une méthode analytique	15
Figure 3 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation.....	16
Figure 4 : Différentes étapes d'une validation complète.....	19
Figure 5 : Représentation schématique du profil de linéarité.....	26
Figure 6 : Domaine d'application du profil d'exactitude	32
Figure 7 : Profil d'exactitude.....	34
Figure 8 : représentation de la zone thérapeutique.....	40
Figure 9 : Le matériel utilisé	44
Figure 10 : Réactifs utilisés.....	46
Figure 11 : Appareil HPLC.....	47
Figure 12 : Colonne utilisée	47
Figure 13 : Balance analytique.....	48
Figure 14 : Vortex	48
Figure 15 : Centrifugeuse.....	49
Figure 16 : Chromatogramme du Fluconazole et de Métronidazole (EI) sans matrice.	55
Figure 17 : Chromatogramme du Fluconazole et de Métronidazole (EI) avec matrice.....	55
Figure 18 : Détermination des largeurs des pics à la base et des temps de rétention à partir du chromatogramme sans matrice.....	56
Figure 19 : Chromatogramme du diluant non chargé.	58
Figure 20 : Chromatogramme de Plasma non chargé.	58
Figure 21 : Chromatogramme du Fluconazole sans matrice (dans le diluant).....	59
Figure 22 : Chromatogramme du Métronidazole (EI) sans matrice (dans le diluant).....	59
Figure 23 : Chromatogramme du Fluconazole et du Métronidazole (EI) dans le Plasma (avec matrice).....	60
Figure 24 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $y = bx + a$ (série 1)	63
Figure 25 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $y = bx + a$ (série 2)	64
Figure 26 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $y = bx + a$ (série 3)	64
Figure 27 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $y = bx$ (Série 1).65	

Figure 28 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $y = bx$ (Série 2).	66
Figure 29 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $y = bx$ (Série 3).	66
Figure 30 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 1).	67
Figure 31 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 2).	68
Figure 32 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 3).	68
Figure 33 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 1).	69
Figure 34 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 2).	70
Figure 35 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 3).	70
Figure 36 : Profil d'erreur totale du Fluconazole.	78
Figure 37 : Profil d'exactitude du Fluconazole ($\beta = 85\%$ et $\lambda = 15\%$).	79
Figure 38 : Droite de linéarité entre la concentration prédite en fonction de la concentration introduite du Fluconazole.	80
Figure 39 : HPLC SHIMADZU LC 20.	100
Figure 40 : Représentation schématique de l'appareillage de l'HPLC.	101
Figure 41 : Colonne chromatographique.	103
Figure 42 : Renseignements apportés par un chromatogramme.	107
Figure 43 : Présentation schématique du temps de rétention et du temps mort.	108
Figure 44 : schéma montrant la performance d'une colonne HPLC.	110
Figure 45 : chromatogramme montrant la qualité de la séparation chromatographique.	110
Figure 46 : Méthode de dosage par étalonnage externe.	112
Figure 47 : courbe d'étalonnage obtenue pour un étalon externe.	113
Figure 48 : chromatogramme lors d'une analyse par étalonnage interne.	114
Figure 49 : courbe d'étalonnage obtenue par un étalonnage interne.	115

Liste des tableaux

TABLEAU I : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi	17
TABLEAU II : le choix des fonctions de réponses.....	24
TABLEAU III : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses	25
TABLEAU IV : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses	25
TABLEAU V : Le choix des critères de validation	31
TABLEAU VI : Verrerie et autres	44
TABLEAU VII : Matières premières.....	45
TABLEAU VIII : Les réactifs utilisés.....	45
TABLEAU IX : HPLC Shimadzu LC 20.....	46
TABLEAU X : Equipements et appareillage.....	48
TABLEAU XI : Les conditions chromatographiques.....	54
TABLEAU XII : Temps de rétention et largeur du pic à la base des deux PA.....	57
TABLEAU XIII : Résultats de la superposition des chromatogrammes.....	60
TABLEAU XIV : Résultats obtenus de l'étude de la sélectivité et de l'effet matrice : standards d'étalonnage (sans matrice) du Fluconazole.....	61
TABLEAU XV : Résultats obtenus de l'étude de la sélectivité et de l'effet matrice : standards de validation (avec matrice) du Fluconazole.....	61
TABLEAU XVI : Comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine du Fluconazole seul et du Fluconazole dans le plasma.....	62
TABLEAU XVII : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Fluconazole avec la fonction : $y = bx + a$ (sans matrice).....	63
TABLEAU XVIII : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Fluconazole avec la fonction : $y = bx$ (sans matrice).....	65
TABLEAU XIX : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Fluconazole avec la fonction : $\ln y = f(\ln x)$ (sans matrice).....	67
TABLEAU XX : Résultats du Fluconazole obtenus avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (sans matrice).....	69
TABLEAU XXI : Profils d'exactitude obtenus pour le Fluconazole.....	71
TABLEAU XXII : tableau d'alignement des réponses observées des trois séries de validations du Fluconazole.....	74
TABLEAU XXIII : Concentrations calculées par prédiction inverse pour le Fluconazole. ..	75

TABLEAU XXIV : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration pour le Fluconazole.	75
TABLEAU XXV : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration pour le Fluconazole.	76
TABLEAU XXVI : Résultats du calcul de l'exactitude relative pour le Fluconazole.	77
TABLEAU XXVII : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration du Fluconazole.	77
TABLEAU XXVIII : Limites de tolérance du Fluconazole.	78
TABLEAU XXIX : Évaluation statistique de la linéarité du Fluconazole.	80
TABLEAU XXX : Comparaison de la pente avec 01 et de l'ordonnée à l'origine avec 0.	80
TABLEAU XXXI : Calcul des limites de quantification	81
TABLEAU XXXII : Signification des résultats des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine entre elles pour le Fluconazole	82
TABLEAU XXXIII : Les conditions de l'étude	86
TABLEAU XXXIV : Tableau comparatif entre deux études	86
TABLEAU XXXV : Indications et posologies du Fluconazole	95
TABLEAU XXXVI : Les effets indésirables du Fluconazole.	97

Introduction

Les infections fongiques invasives représentent un grave problème de santé publique ; ce sont des affections graves et leur incidence est en progression significative ces trente dernières années.

Ces infections sont associées à une élévation significative de la morbidité et de la mortalité des patients hospitalisés et les sujets dont les défenses immunitaires sont affaiblies [1]. De plus, leur impact économique ne peut être négligé car elles sont associées à des séjours prolongés à l'hôpital et des coûts élevés de leur contrôle et prise en charge.

Jusqu'en 1978, les options thérapeutiques se limitaient à l'amphotéricine B et à la flucytosine. Depuis, l'arsenal thérapeutique s'est élargi avec l'apparition des antifongiques azolés qui sont mieux tolérés que l'amphotericine B et représentent à ce jour la classe la plus utilisée dans le traitement des mycoses systémiques et superficielles. Leur pharmacocinétique diffère selon les molécules et justifie pour certains un suivi thérapeutique pour s'assurer des concentrations circulantes.

Malgré la mise au point de nouvelles molécules, le Fluconazole demeure le médicament le plus utilisé, c'est l'antifongique de choix pour le traitement des infections à *Candida*. En raison de son élimination majoritairement rénale, il est nécessaire d'adapter la posologie chez le patient insuffisant rénal.

Pour l'évaluation de ses concentrations plasmatiques, il est important d'utiliser une méthode analytique correctement validée afin d'obtenir des résultats fiables qui pourront être ainsi interprétés de façon satisfaisante. Le principe de la validation des procédures analytiques quantitatives est aujourd'hui largement répondu dans tous les domaines d'activité où des mesures sont réalisées.

Pour cela, toute nouvelle méthode d'analyse mise en œuvre au sein d'un laboratoire doit systématiquement faire l'objet d'une validation analytique avant sa mise en routine, cette dernière repose sur un ensemble de mesures expérimentales et de tests statistiques qui permettent de prouver qu'une procédure est suffisamment exacte et fiable. De nos jours une nouvelle tendance et de nouveaux concepts scientifiques apparaissent et proposent de revoir les bases mêmes de la validation analytique pour une démarche harmonisée, avec notamment l'apparition de l'utilisation de profil d'exactitude comme outil de décision, permettant de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation [2, 3].

Ce travail porte sur le développement et l'optimisation d'une nouvelle méthode quantitative permettant le dosage plasmatique par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) du Fluconazole. Pour montrer qu'elle correspond à l'utilisation pour laquelle elle est proposée et qu'elle donne des résultats fiables pouvant ainsi être utilisée en routine, elle a été validée en se reposant sur le profil d'exactitude.

Afin d'apporter une réponse à cette problématique posée et de valider la méthode de dosage du Fluconazole dans le plasma humain par HPLC, nous avons réparti notre travail en deux (02) parties.

La première partie est théorique. Elle est subdivisée en trois chapitres :

- Chapitre I : Fluconazole
- Chapitre II : Validation des méthodes de dosage.
- Chapitre III : Analyse biologique et suivi thérapeutique pharmacologique.

Quant à la seconde partie de cette recherche, elle est consacrée à l'expérimentation. Nous présenterons dans un premier temps le matériel et les méthodes utilisées avant d'exposer les résultats et la discussion. Cette partie est suivie d'une conclusion qui fera la synthèse sur la validité de la méthode de dosage plasmatique du Fluconazole. Il est évident que cette synthèse se fera sur la base des résultats et de la discussion en intégrant les notions théoriques expliquées dans la première partie.

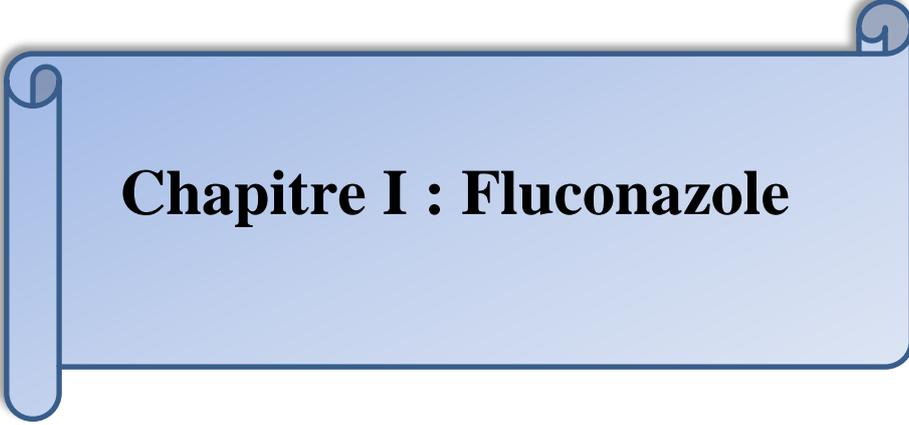
Objectifs

Objectif

L'objectif principal de notre étude effectuée au sein du laboratoire de chimie analytique et de biochimie du département de pharmacie à l'Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou (UMMTO) est de développer, optimiser et valider une nouvelle méthode chromatographique de dosage plasmatique du Fluconazole par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en utilisant le profil d'exactitude, afin qu'elle soit utilisée pour d'éventuelle dosages plasmatiques de ce médicament.



PARTIE THEORIQUE



Chapitre I : Fluconazole

1. Définition

Le Fluconazole introduit en 1990 sous le nom de Triflucan. C'est un antifongique utilisé dans le traitement et la prévention des infections fongiques superficielles et systémiques [4].

Il appartient à la classe des triazolés. Ce sont pour certains des analogues structuraux stricts des imidazolés dans lesquels l'imidazole est remplacé par un 1H-1,2,4-triazole afin de palier l'importante inactivation métabolique responsable de la faible biodisponibilité par voie orale et des faibles taux plasmatiques [5].

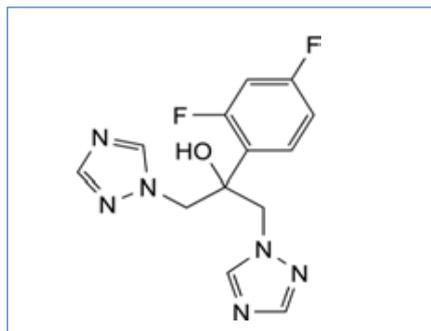


Figure 1 : Structure chimique du Fluconazole

- **Formule brute :** $C_{13}H_{12}F_2N_6O$
- **CAS:** [86386-73-4]
- **Masse molaire :** 306.3 g.mol^{-1}
- **Formule chimique:** 2-(2,4-Difluorophényl)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol.
- **Teneur :** 99,0 pour cent à 101,0 pour cent (substance desséchée).
- **Classe thérapeutique :** antifongique [6].

2. Propriétés physicochimiques

Aspect : poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique.

Solubilité : peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans le méthanol, soluble dans l'acétone.

Il se distingue par sa solubilité en milieu aqueux à $\text{pH} \leq 6$ en raison de ses pôles hydrophiles : hydroxyle et triazole, ceci constitue un avantage indéniable lors de la formulation des préparations pour usage parentéral.

Le Fluconazole présente le phénomène du polymorphisme [6].

Spectre d'absorption : dans le méthanol il absorbe à $\lambda = 261 \text{ nm}$ [7], dans l'acide chlorhydrique il absorbe à $\lambda = 266 \text{ nm}$ [8].

3. Propriétés pharmacologiques

3.1. Pharmacocinétique

Les formes orales et intraveineuses du Fluconazole sont équivalentes du point de vue pharmacocinétique. Son hydrosolubilité conditionne largement les paramètres pharmacocinétiques [9].

- **Absorption**

Après administration orale, le Fluconazole est bien absorbé, les taux plasmatiques (et la biodisponibilité systémique) représentent plus de 90% des taux atteints après l'administration intraveineuse.

Les concentrations plasmatiques maximales à jeun sont atteintes 30min à 1heure et demi après la prise, et 3 à 4h après un repas. 90% des taux à l'état d'équilibre sont atteints 4 à 5 jours après l'administration de la dose quotidienne unique répétée.

L'administration d'une dose de charge (au premier jour), égale au double de la dose habituelle, permet aux taux plasmatiques de s'approcher de 90% des taux à l'état d'équilibre au deuxième jour [9].

- **Distribution**

Le volume de distribution apparent est proche du volume d'eau corporel totale. Sa liaison aux protéines plasmatiques est faible (11-12%) en raison de son caractère hydrophile [10].

L'excellente diffusion du Fluconazole dans le LCR constitue un net avantage notamment dans le traitement des méningites d'origine fongique comme la cryptococcose, la concentration retrouvée représente environ 80% des taux plasmatiques correspondants [11].

- **Métabolisme**

Le Fluconazole n'est que faiblement métabolisé (10 à 25% de la dose administrée) [1]. C'est un inhibiteur modéré des isoenzymes CYP2C9 et CYP3A4, et un inhibiteur puissant de la CYP2C19.

- **Elimination**

La demi-vie d'élimination du Fluconazole est d'environ 30h [12].

Son élimination est pratiquement urinaire (70 à 90% de la dose administrée) essentiellement sous forme inchangée (70%), ce qui impose une surveillance en cas d'insuffisance rénale.

La clairance au Fluconazole est proportionnelle à la clairance à la créatinine. Il subit une forte filtration glomérulaire et une réabsorption tubulaire, c'est l'antifongique de choix dans le traitement des mycoses du système urinaire.

Aucun métabolite circulant n'a été mis en évidence [13].

➤ **Populations particulières :**

Les variations pharmacocinétiques doivent être prises en considération chez :

- ✓ L'insuffisant rénal [14] ;
- ✓ La population pédiatrique [15] ;
- ✓ Les sujets âgés [16] ;
- ✓ La femme allaitante [17].

3.2. Pharmacodynamie

Le Fluconazole est un fongistatique dont le mode d'action principale est l'inhibition de la déméthylation en 14 alpha du lanostérol médié par le cytochrome P450, une étape essentielle dans la biosynthèse de l'ergostérol fongique.

L'accumulation de stérols méthylés en 14 alpha est corrélée avec la perte subséquente d'ergostérol dans la membrane cellulaire fongique et pourrait être responsable de l'activité antifongique du Fluconazole [18]. Il est plus sélectif vis-à-vis des enzymes à CYP 450 fongiques que de divers systèmes enzymatiques à CYP 450 chez les mammifères [19].

Une résistance innée a été élucidée chez quelques espèces de *Candida* : *C. glabrata*, *C. kruzei* et *C. auris* [20, 21].

4. Usages

4.1. Indications

Le Fluconazole est indiqué dans les infections fongiques suivantes [22]:

- ✓ La méningite à cryptocoque (enfants+++);
- ✓ Coccidioidomycose ;
- ✓ Candidose invasive ;

- ✓ Candidose des muqueuses, y compris les candidoses oropharyngées (nourrissons et enfants+++), œsophagiennes, la candidurie et les candidoses cutanéomuqueuses chroniques ;
- ✓ Les candidoses buccales atrophiques chroniques (douleurs résultant du port d'une prothèse dentaire) lorsque l'hygiène dentaire ou un traitement local sont insuffisants.

Il est également utilisé pour la prévention des récurrences d'infections chez les patients à risque (rechutes, Virus d'immuno-déficience humaine VIH+ et leucémies).

4.2. Posologie

Le Fluconazole peut se présenter sous forme d'ampoules IV, gélules, gel et de suspension buvable [23].

La dose devra être basée sur la nature et sévérité de l'infection fongique. Le traitement des infections nécessitant des administrations répétées devra être poursuivi jusqu'à ce que les paramètres cliniques ou les analyses biologiques indiquent que l'infection active a régressé.

L'intervalle thérapeutique du Fluconazole [32-64] µg/mL [1], il est considéré comme toxique lorsque sa concentration plasmatique est supérieur à 80 µg/mL [24].

Une période inadéquate de traitement peut entraîner la récurrence de l'infection active.

Les indications et les posologies du Fluconazole sont détaillées dans « l'annexe II ».

4.3. Effets indésirables

Le Fluconazole est généralement bien toléré, les effets indésirables les plus fréquemment rapportés (>1/10) sont les céphalées, douleurs abdominales, diarrhées, nausées, vomissements, augmentation de l'alanine aminotransférase (ALAT), augmentation de l'aspartate aminotransférase (ASAT) , augmentation de la phosphatase alcaline sanguine (PAL) et éruption cutanée [25].

Les effets indésirables du Fluconazole sont détaillés dans « l'annexe III ».

4.4. Contre-indications

Hypersensibilité : à la substance active, à d'autres dérivés azolés ou à l'un des excipients.

La coadministration avec la terfénadine est contre-indiquée chez les patients traités par le Fluconazole à doses répétées supérieures ou égales à 400 mg par jour sur la base des résultats d'une étude d'interaction à doses répétées [26].

La coadministration avec d'autres médicaments connus pour prolonger l'intervalle QT (correspond à la durée de la systole électrique du ventricule sur l'ECG) et ceux métabolisés par les cytochromes P450 3A4 tels que cisapride, astémizole, pimozide, quinidine et érythromycine est contre-indiquée chez les patients traités par le fluconazole [27].

4.5. Précautions d'emploi

Le Fluconazole ne doit pas être utilisé pour traiter la teigne du cuir chevelu (Tinea capitis).

L'étude de l'efficacité du Fluconazole dans le traitement des Mycoses endémiques profondes (Les dimorphiques) et les cryptococcoses (hors méningites) est limitée.

Le Fluconazole doit être utilisé avec prudence dans [28] :

- Insuffisance rénale et surrénalienne ;
- Altération de la fonction hépatique ;
- Atteinte cardiovasculaire ;
- Réactions dermatologiques (surtout chez les patients sidéens) et hypersensibilité ;
- Médicaments à marge thérapeutique étroite et métabolisés par Cytochrome P450 (CYP2C9, CYP2C19 et CYP3A4).

4.6. Interactions médicamenteuses

4.6.1. Associations contre-indiquées

L'administration concomitante du Fluconazole avec certaines molécules peut causer des événements cardiaques ; allongement de l'intervalle QTc et torsade de pointe, à savoir [26] :

- ✓ Cisapride (stimulant de la motricité digestive) ;
- ✓ Terfénadine, Astémizole (antihistaminiques) ;
- ✓ Pimozide (antipsychotique typique de la famille des diphénylpipéridine) ;
- ✓ Quinidine (antiarythmique de classe 1) ;
- ✓ Erythromycine : antibiotique de la classe des macrolides (pouvant aller jusqu'à une mort subite).

4.6.2. Associations déconseillées

- ✓ Halofantrine : un antipaludique. Cette association majore le risque de cardiotoxicité [29].

4.6.3. Associations nécessitant une précaution d'emploi

- ✓ Amiodarone : un antiarythmique. Cette association entraîne un allongement de l'intervalle QT [30].

4.6.4. Effet d'autres médicaments sur le Fluconazole

- ✓ Rifampicine (antibiotique antituberculeux) : Cette association est responsable d'une baisse de l'ASC et une réduction de demi-vie du Fluconazole [31].
- ✓ Hydrochlorothiazide (diurétique) : cette association est responsable d'une augmentation de la concentration plasmatique du Fluconazole [25].

4.6.5. Effet du Fluconazole sur d'autres médicaments

Outre les interactions observées ci-dessus, il existe un risque d'augmentation des concentrations plasmatiques d'autres médicaments métabolisés par le CYP2C9, le CYP2C19 et le CYP3A4 en cas d'administration concomitante avec le Fluconazole [32].

Par conséquent, ces associations doivent être administrées avec prudence et le patient doit être étroitement surveillé [33] :

- ✓ Alfentanil, Fentanyl, Méthadone (antalgiques majeurs) ;
- ✓ Amitriptyline, nortriptyline (antidépresseurs) ;
- ✓ Amphotéricine B, Voriconazole (antifongique) ;
- ✓ Anticoagulants ;
- ✓ Benzodiazépines à courte durée d'action ;
- ✓ Carbamazépine, Phénytoïne (anticonvulsivant) ;
- ✓ Antagonistes des canaux calciques ;
- ✓ Inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase (une statine) ;
- ✓ Ciclosporine, Sirolimus, Tacrolimus, Evérolimus (Immunosuppresseurs) ;
- ✓ Losartan (antihypertenseur ARA II) ;
- ✓ Anti-inflammatoires stéroïdiens (Prednisone) et non stéroïdiens ;
- ✓ Rifabutine, Azithromycine (antibiotiques) ;
- ✓ Saquinavir, Zidovudine (antiviraux) ;
- ✓ Sulfamides hypoglycémisants ;

- ✓ Théophylline, Ivacaftor (broncho-dilatateur) ;
- ✓ Vinca-alcaloïdes, Cyclophosphamide (anticancéreux) ;
- ✓ Vitamine A ;
- ✓ Contraceptifs oraux.

4.6.6. Résistance croisée au Fluconazole

Candida glabrata, qui peut devenir résistant au Fluconazole, constitue une cause fréquente de candidémie. Une étude a été effectuée pour déterminer la portée des résistances croisées aux nouvelles molécules azolées d'isolats de *C. glabrata* observée dans le cadre d'infection chez des receveurs de greffe de cellules souches hématopoïétiques traités par dérivés azolés [34].

La résistance au Fluconazole chez *C. glabrata* est associée à une augmentation relative des niveaux d'ARNm pour les transporteurs à ATP binding cassette, CgCDR1, CgCDR2, et CgSNQ2 qui semble se produire lors de l'exposition du patient au Fluconazole [35]. Plus récemment, l'évaluation des mécanismes moléculaires observés dans des isolats compatibles et non compatibles a montré que l'augmentation de l'ARNm des gènes codant pour CgCDR1, CgCDR2, et CgSNQ2 était associée à des CMI élevées du Fluconazole et du Voriconazole [36].

Ces observations suggèrent que *C. glabrata* présente une résistance croisée élevée, cliniquement significative, entre les dérivés azolés les plus anciens (Fluconazole et Itraconazole) et le Voriconazole. La prudence s'impose donc si l'on envisage de traiter par Voriconazole une candidémie à *C. glabrata* chez des patients ayant déjà été lourdement exposés aux dérivés azolés [34].

5. Fertilité, grossesse et allaitement

• Fertilité

Le Fluconazole n'affecte pas la fertilité [26].

• Grossesse

Une étude d'observation a suggéré un risque accru d'avortement spontané chez les femmes traitées par le Fluconazole au cours du premier trimestre [37].

Le Fluconazole administré à des doses standard et les traitements à court terme ne doivent pas être utilisés pendant la grossesse sauf nécessité absolue.

L'administration du Fluconazole à fortes doses et/ou en traitement prolongé doit être réservée, au cours de la grossesse, aux cas mettant potentiellement en jeu le pronostic vital [38].

- **Allaitement**

Le Fluconazole est excrété dans le lait à des concentrations inférieures à celles du plasma. L'allaitement peut être maintenu après l'administration d'une dose unique standard. Il est déconseillé après administration répétée ou de fortes doses de Fluconazole [39].

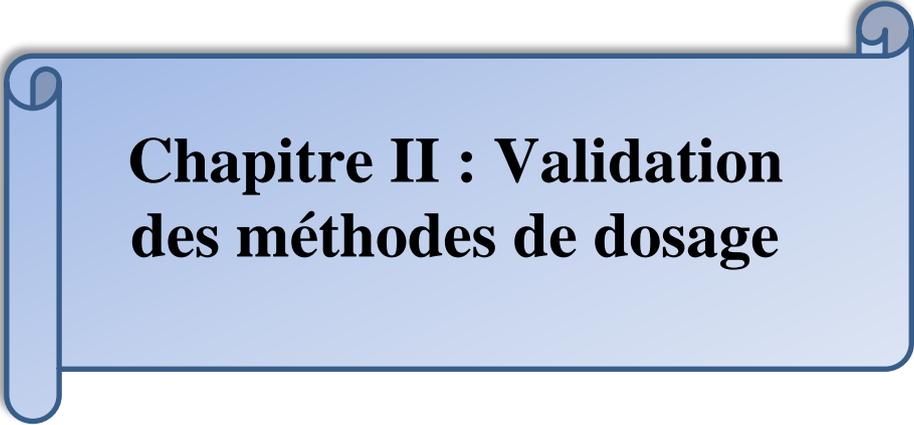
6. Surdosage et toxicité

Des cas de surdosage avec le Fluconazole ont été rapportés et associés à des hallucinations et à un comportement paranoïaque [40, 41].

En cas de surdosage une prise en charge avec un traitement symptomatique et un lavage gastrique si nécessaire, peut être adéquate.

Le Fluconazole est largement éliminé dans les urines, une diurèse forcée augmenterait probablement le taux d'élimination.

L'hépatotoxicité associée au Fluconazole est généralement réversible à l'arrêt du traitement. Aucune relation avec la dose totale quotidienne, la durée du traitement, le sexe ou l'âge des patients n'a été mise en évidence [23].



Chapitre II : Validation des méthodes de dosage

Les méthodes analytiques sont indispensables pour quantifier les médicaments et leurs métabolites dans les prélèvements biologiques. Pour pouvoir être utilisées, ces méthodes doivent être validées pour garantir des résultats fiables et reproductibles.

La maîtrise de la qualité des analyses est une préoccupation importante. La démarche à suivre ne se limite pas à la production de procédures dont le suivi assure la traçabilité totale des résultats, conditions nécessaires à l'accréditation ; elle intègre également la qualification de l'appareillage utilisé, son suivi et surtout la validation de la méthode de dosage qui permet de prouver que cette méthode répond bien aux besoins pour lesquels elle a été développée, avec la possibilité de la transférer dans un autre laboratoire. Ceci impose une caractérisation précise des critères de la méthode : sélectivité, spécificité, exactitude, répétabilité, reproductibilité, linéarité, seuils de quantification et de détection, et robustesse.

1. Définition de la validation analytique

- **Selon l'ICH Q2A** : « L'objectif d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle est appropriée à l'usage auquel elle est destinée » [42]
- **Selon la norme ISO17025** : La validation est « La confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » [43]
- **Selon la FDA** : « Valider une méthode consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevée et sous une forme documentée que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications à l'avance » [26]
- **Selon la pharmacopée américaine** : « Processus par lequel il est établi, par des études au laboratoire, que les caractéristiques de performance d'une méthode satisfont aux exigences pour ses applications analytiques prévues » [44]
- **Selon les BPF** : « l'établissement d'une preuve documentée, en conformité avec les principes des BPF, que la mise en œuvre, ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système, permet réellement d'atteindre les résultats escomptés » [45].

2. Objectifs de la validation

La validation est une exigence réglementaire clairement évoquée dans la ligne directrice 15 des BPF.

Le but d'une validation analytique est de démontrer l'aptitude et la fiabilité de la méthode vis-à-vis des référentiels opposables et de donner aux laboratoires ainsi qu'aux autorités compétentes les garanties que chaque mesure qui sera réalisée ultérieurement en routine, une fois la procédure validée, sera suffisamment proche de la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable, en fonction de la finalité de la procédure [46].

L'objectif est de minimiser le risque tant au niveau du producteur que du futur consommateur.

3. Aspect réglementaire et normatif

Les procédures de validation analytiques sont décrites dans les principaux référentiels suivants [47] :

3.1. Documents ISO 17025

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

3.2. Documents ICH

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

3.3. Documents de la FDA (guidance of industry)

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

3.4. Documents des commissions de la SFSTP

- SFSTP « guide de validation, rapport d'une commission SFSTP »
 - ✓ Méthodologie (1992)
 - ✓ Exemples d'application (1992)
- SFSTP « dosage dans les milieux biologiques par des méthodes chromatographiques » (1997).

- SFSTP « validation des procédures analytiques : harmonisation des démarches »
 - ✓ Partie I : généralités, parues dans STP Pharma Pratique en 2003
 - ✓ Partie II : statistiques, parues dans STP Pharma Pratique en 2006
 - ✓ Partie III : exemples d'application :
 - Parus dans STP Pharma Pratique en 2006
 - Parus dans Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis en 2008
- SFSTP « analyse des performances d'une méthode analytique Evaluation des risques lors d'une utilisation en routine » (2011).

4. Cycle de vie d'une méthode analytique

La mise en œuvre d'une procédure de dosage peut se décomposer essentiellement en six phases successives [48]:

- 4.1- Phase de sélection :** qui permet de définir les objectifs et les conditions opératoires initiales ;
- 4.2- Phase de développement :** avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences (optimisation robuste) ;
- 4.3- Phase de validation intra-laboratoires ou interne :** elle est conduite dans un seul laboratoire ;
- 4.4- Phase de validation inter-laboratoires ou externe :** elle n'intéresse en principe, que les méthodes utilisées par plusieurs laboratoires dont les résultats servent lors d'échanges commerciaux ou de contrôles officiels ; on peut la considérer comme optionnelle ;
- 4.5- Phase d'application en routine :** incluant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle ;
- 4.6- Revalidation :** après un certain temps d'utilisation, on peut être amené à apporter des améliorations qui, selon leur importance, amènent à une revalidation plus ou moins complète.

La revalidation a pour but de s'assurer que la procédure analytique conserve ses caractéristiques de performance essentielles, son degré dépend de la nature du changement.

La validation d'une méthode doit donc s'inscrire comme un élément intervenant après le développement d'une nouvelle procédure d'analyse, et de ce fait ses performances vont évoluer au cours des différentes phases de son cycle de vie. La confiance que l'on peut accorder aux résultats analytiques va considérablement évoluer au cours des deux premières phases pour aller vers une confiance accrue dont le bien-fondé est attesté en phase de validation.

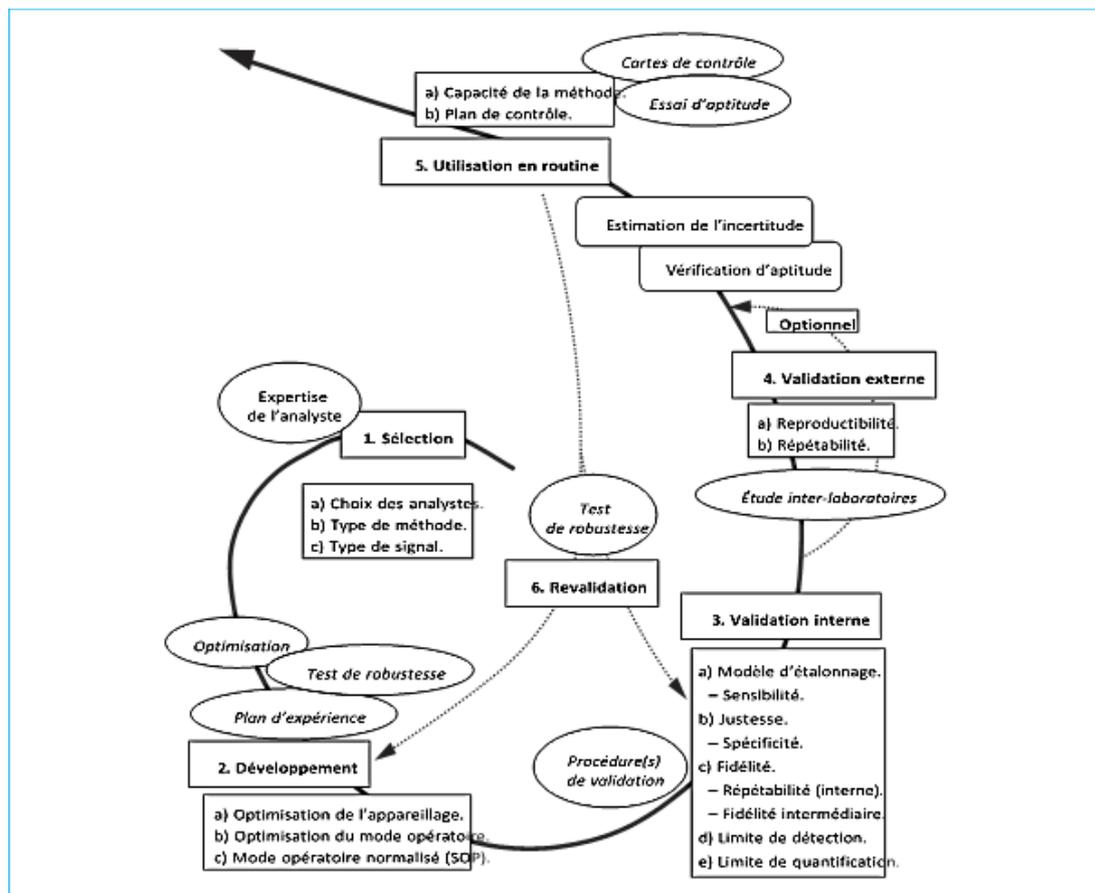


Figure 2 : Cycle de vie d'une méthode analytique [48]

5. Protocole de validation

L'ensemble des données de la phase de validation doit faire l'objet d'un rapport détaillé dans lequel tous les résultats obtenus doivent être documentés. Au terme de la phase de validation et avant son exploitation en routine, la procédure d'analyse doit être complètement décrite sous forme d'un mode opératoire standardisé.

Les standards d'étalonnage (SE) doivent être préparés selon le protocole qui sera appliqué en routine tant au niveau du mode opératoire que du nombre de niveaux de concentration (point d'étalonnage) et du nombre de répétitions par niveau.

Les standards de validation (SV) doivent quant à eux être préparés dans la matrice et être des échantillons indépendants (variance intra-série) dans la mesure où c'est applicable. En effet, ils représentent, en phase de validation, les futurs échantillons que la procédure analytique aura à quantifier. Chaque standard de validation est préparé et traité de façon indépendante comme un futur échantillon. Ce caractère d'indépendance est fondamental pour l'estimation correcte de la variance inter-séries [49].

Le guide SFSTP 2003 suggère un logigramme concis pour choisir un protocole de validation, dont dépendra impérativement la préparation des SV et SE. Il faudra également prendre en compte la nécessité et les caractéristiques de la méthode de dosage qui sera évaluée ultérieurement.

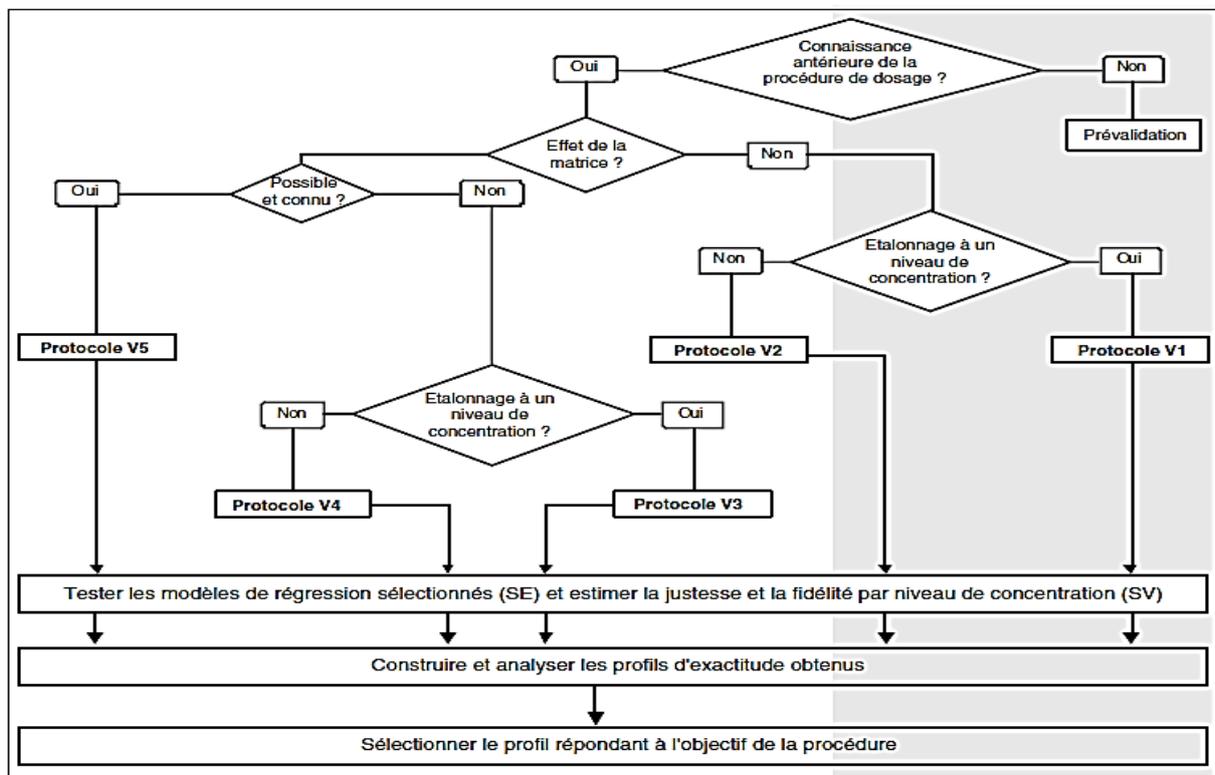


Figure 3 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation [49]

Le protocole de validation qui sera sélectionné selon le guide de la SFSTP 2006 déterminera le nombre des standards d'étalonnage (SE) et des standards de validation (SV) sur lequel les essais seront effectués.

TABLEAU I : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi [49].

Standards	Niveaux de concentrations	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE. Etalonnage sans la matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	2 ⁽²⁾	2	2 ⁽²⁾	
	Haut	2 ⁽¹⁾	2	2 ⁽¹⁾	2	
SE. Etalonnage avec matrice	Bas				2	2
	Médian			2	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾
	Haut			2 ⁽¹⁾	2	2
	Additif					2 ⁽³⁾
SV. Validation avec la matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nombre minimum de séries		3	3	3	3	3
Nombre total d'essais		33	45	39	63	45

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

⁽²⁾ Suppression possible du niveau de concentration médian pour l'étalonnage sur la base du modèle de régression retenu pour exprimer la fonction de réponse (exemple : modèle plus simple comme le modèle mathématique des moindres carrés). Dans ce cas, le nombre total est de 39 essais pour les protocoles V2 (sans matrice) et V5 (avec la matrice). Le nombre d'essais est de 51 pour le protocole V4.

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

6. Domaines d'application

Les méthodes analytiques concernées par la validation sont [50] :

- Les méthodes non normalisées ;
- Les méthodes conçues/développées par le laboratoire ;
- Les méthodes normalisées employées en dehors de leur domaine d'application prévu ;
- Les amplifications ou modifications de méthodes normalisées ;
- Une méthode alternative par rapport à une méthode de référence.

Les méthodes inscrites dans la pharmacopée sont considérées comme étant validées.

7. Etapes de validation

Une étude de validation ne démarre que lorsqu'on dispose d'un mode opératoire complètement rédigé. L'organisation pratique des essais dépend du guide de validation choisi [51, 52] ;

1. Disposer du mode opératoire et définir l'analyte ;
2. Définir le domaine de validation (gamme de concentrations) et l'objectif attendu de la méthode sous la forme d'un intervalle d'acceptabilité ;
3. Sélectionner des échantillons de validation dont les valeurs de référence sont connues ;
4. Choisir un plan d'expérience de validation ;
5. Pour les méthodes indirectes, choisir un plan d'expérience d'étalonnage ;
6. Collecter les données ;
7. Pour les méthodes indirectes, calculer les concentrations retrouvées par étalonnage inverse ;
8. Calculer les critères de validation à partir des concentrations retrouvées : principalement les écarts-types de fidélité intermédiaire et des biais de justesse ;
9. Calculer les intervalles de tolérance et construire le profil d'exactitude ;
10. Interpréter les résultats et décider si la méthode est valide ou non.

8. Procédures à valider

La validation des procédures analytiques porte sur les cinq types de procédures les plus courantes [53] :

- Tests d'identification ;
- Tests de quantification des impuretés ;
- Tests limites du contrôle des impuretés ;
- Tests quantitatifs de la fraction active dans des échantillons, des substances médicamenteuses ou de produits médicamenteux ou d'un autre composant sélectionné dans ce dernier ;
- Tests quantitatifs de la fraction active dans des échantillons biologiques.

9. Niveaux de validation

On distingue trois niveaux de validation :

9.1. Une validation complète

Elle est nécessaire dans les conditions suivantes :

- Dosage d'un analyte pour la première fois ;
- Utilisation de la méthode mise au point pour le dosage de la molécule mère au dosage des métabolites [54].

Les différentes étapes d'une validation complète sont schématisées dans la figure ci-dessous

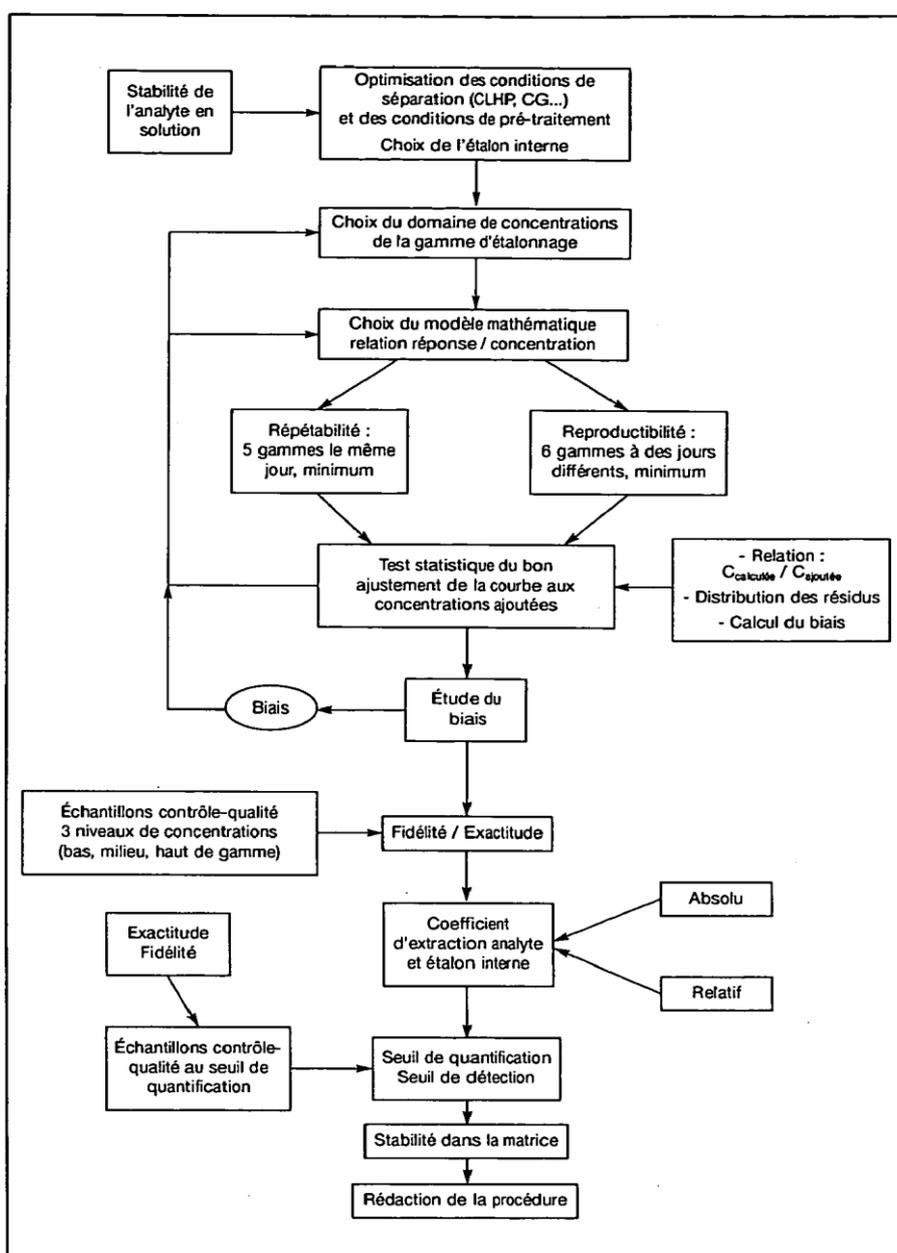


Figure 4 : Différentes étapes d'une validation complète [55]

9.2. Une validation partielle

Il s'agit d'une modification d'une méthode déjà validée qui ne requiert pas de validation complète [56]. Les changements qui nécessitent une validation partielle peuvent être [55] :

- Le transfert d'une méthode analytique entre laboratoires ;
- Une modification d'appareillage ou de logiciel de gestion ;
- Un changement d'espèce pour une matrice donnée ou un changement de matrice dans une même espèce.

Les paramètres qui devront faire l'objet de cette validation sont [54] :

- L'étude de la relation concentration / réponse (6 gammes d'étalonnage à des jours différents) ;
- La vérification de l'exactitude et de la fidélité (dosage d'échantillons contrôle-qualité : bas, milieu et haut de gamme à des jours différents (n = 6)).

9.3. Une validation croisée

Elle est réalisée si deux méthodes analytiques différentes sont utilisées pour générer des données dans une même étude [56]. La validation croisée s'effectue par une comparaison statistique des paramètres de validation de chacune des méthodes, l'une d'elles servant de référence et l'autre de test, puis inversement [55].

Si l'étude est conduite de façon multicentrique, la validation croisée s'effectue par le dosage d'échantillons contrôle-qualité de concentrations connues et d'échantillons de plasma de patients dans chacun des laboratoires concernés. Les résultats sont ensuite analysés statistiquement [54].

10. Critères et statistiques de validation

10.1. Spécificité/Sélectivité

10.1.1. Définitions

- ✓ Selon la norme ISO 17025 : Une procédure d'analyse est dite « spécifique » lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser. Il s'agit de démontrer que la ou les substance(s) quantifiée(s) au sein de la matrice sont bien le ou les analyte (s) recherché(s) [43].

- ✓ Selon l'ICH Q2R1 : La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Ces dernières peuvent inclure des impuretés, des produits de dégradation, la matrice, etc [42].

Cette définition renvoie à plusieurs aspects :

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

10.1.2. Vérification de la spécificité

Les interférences peuvent être dues à un effet matrice de l'échantillon, et conduisent à des erreurs systématiques additives et proportionnelles se traduisant par un biais sur la réponse analytique. Dans le cas où la matrice de l'échantillon est entièrement connue et maîtrisée, la mise en évidence de ses effets est aisée. 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 [57].

On peut vérifier la spécificité d'une méthode par deux approches : une approche empirique et une approche statistique.

10.1.2.1. Approche empirique

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

- Une solution placebo ;
- Une solution standard à 100% (par rapport à la concentration théorique) ;
- Une solution échantillon à 100% (par rapport à la concentration théorique).

Les résultats obtenus doivent suivre une logique comme suit :

La solution placebo dans un cas normal doit donner une réponse nulle. Quant aux signaux des deux solutions standards 100% et échantillon 100% ils doivent être similaires en termes de temps de rétention et d'air du pic [58].

10.1.2.2. Approche statistique

La droite obtenue avec les standards de validation sera comparée avec celle obtenue à partir des standards d'étalonnage.

La comparaison de la pente a_1 de la droite de régression D_1 de la gamme sans matrice avec la pente a_2 de la droite D_2 de la gamme avec matrice, connaissant l'écart type de a_1 et a_2 respectivement (σ_{a1} et σ_{a2}) permettra d'appliquer le test t de **STUDENT** comme suit [49] :

$$t_{calculé} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\sigma_{a1}^2 + \sigma_{a2}^2}}$$

Le $t_{calculé}$ est comparé à la valeur t° (α ; $n_1 + n_2 - 4$) lue sur la table de **STUDENT**.

- α étant le risque d'erreur accepté ;
- n_1 et n_2 tailles des échantillons réalisés sur les deux gammes ;
- $n_1 + n_2 - 4$ le degré de liberté.

Si $t_{calculé} < t^\circ$: les pentes sont comparables, donc absence d'effet matrice.

La comparaison de l'ordonnée à l'origine b_1 de la droite de régression D_1 de la gamme sans matrice avec l'ordonnée à l'origine b_2 de la droite D_2 de la gamme avec matrice, connaissant l'écart type de b_1 et b_2 respectivement (σ_{b1} et σ_{b2}) permettra d'appliquer le test t de **STUDENT** comme suit :

$$t_{calculé} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\sigma_{b1}^2 + \sigma_{b2}^2}}$$

Si $t_{calculé} < t^\circ$: les ordonnées à l'origine sont comparables, donc absence d'erreur systématique.

La méthode est donc spécifique.

10.2. Fonction de réponse

10.2.1. Définition

La fonction de réponse d'une procédure analytique traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée « courbe de calibration ».

Elle peut être linéaire (droite), mais il n'y a aucune raison de la rattacher obligatoirement à ce type de modèle. En effet, il existe des situations de non-linéarité, liées notamment à certains systèmes de détection ou à l'étendue de l'intervalle de dosage.

En revanche, il est nécessaire que la fonction de réponse soit strictement croissante ou décroissante, c'est-à-dire monotone [59].

10.2.2. Etude statistique

L'établissement de la relation entre la réponse instrumentale Y et la concentration de l'analyte X se fait après avoir rassemblé les résultats des expériences opérées sur les standards d'étalonnage (SE).

Cette relation est définie par une fonction f

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

- ε : l'erreur associée à la fonction de réponse dénommé erreur résiduelle [60].

L'évaluation des paramètres du modèle se fera dans le but de réduire l'erreur résiduelle en ajustant la fonction de réponse.

Les fonctions de réponse utilisées pour la validation d'une méthode de dosage sont diverses et chacune est employée pour un type de méthode particulier [49] :

- ✓ Si c'est une méthode physicochimique le choix se portera régulièrement sur une fonction linéaire, par conséquent sa représentation sera une droite passant par l'origine ou non ;
- ✓ Si c'est une méthode bioanalytique il est recommandé d'utiliser une fonction quadratique ;
- ✓ Si c'est un immuno-dosage, il est recommandé d'utiliser les fonctions logistiques à 4 ou 5 paramètres.

Le choix des fonctions de réponse est représenté dans le tableau II

TABLEAU II : le choix des fonctions de réponses [60]

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

10.3. Alignement des observations

Si, pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries (souvent pour de raisons de pesées qui doivent être indépendantes), il est indispensable de procéder à un alignement sur la concentration moyenne dès lors qu'un calcul de variance doit être effectué (estimation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire).

Cela consiste à transformer les réponses observées ($y_{ijk} \rightarrow y_{ijk,c}$) afin de les aligner sur cette concentration moyenne.

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

En validation, l'alignement s'applique aux réponses obtenues avec les échantillons de validation en utilisant les équations ou fonction de réponses obtenues avec les standards de d'étalonnage [61].

Ainsi l'alignement des n_{ij} répétitions du niveau de concentration j de la série i s'effectue comme suit [60]:

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

Les règles d'alignement des différentes fonctions de réponse sont résumées dans le tableau III

TABLEAU III : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses [60]

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

10.4. Prédiction inverse

La prédiction inverse s'agit de calculer des concentrations en retour avec la fonction de réponse. Il est préférable de s'assurer préalablement que les concentrations sont toutes identiques au sein d'un niveau de concentration, si ce n'est pas le cas, il vaut mieux les aligner comme décrit dans la section précédente [60].

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

TABLEAU IV : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses [60]

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

10.5. Linéarité de la concentration prédite

10.5.1. Définition

- ✓ Selon la norme ISO 17025 : Capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans l'échantillon pour laboratoire [43].
- ✓ Selon l'ICH Q2R1 : La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité de donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon [42].

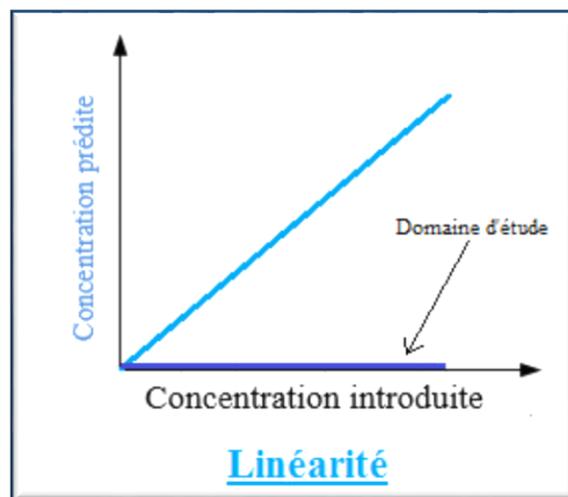


Figure 5 : Représentation schématique du profil de linéarité

10.5.2. Etude statistique

Pour l'intervalle de concentration à valider, la linéarité est vérifiée en utilisant les données des premières répétitions de chaque niveau de concentration, pour les trois séries de validation.

La linéarité de la relation entre les concentrations retrouvées (x_{calc}) et les concentrations introduites (x) est examinée en représentant graphiquement la fonction $[f(x) = x_{\text{calc}}]$ pour les 3 séries de validation conjointement.

La droite obtenue est analysée statistiquement en comparant la pente à la valeur de référence 1 et l'ordonnée à l'origine à la valeur de référence 0 [57].

Il est à noter que la linéarité de la fonction $[f(x) = x_{\text{calc}}]$ est un prérequis à l'estimation de la justesse, en revanche elle n'implique pas que la méthode soit juste [49].

10.6. Fidélité

10.6.1. Définition

- ✓ Selon la norme ISO 17025/ ICH Q2R1 : La fidélité exprime l'étroitesse d'accord entre plusieurs résultats d'essai issus d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites [42, 43].

10.6.2. Etude statistique

L'erreur expérimentale est considérée indépendante de la série. C'est une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma^2_{w,j}$.

La variance de répétabilité est estimée par l'évaluation de la variance intra-série.

$$\text{Répétabilité : } \hat{\sigma}_{Re,j}^2 = \hat{\sigma}_{W,j}^2$$

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

La variance de fidélité intermédiaire est calculée par la somme des estimations des variances intra et inter-série.

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

$$CV \text{ Fidélité intermédiaire} = 100 \sigma_{I,P} / x_{j,calc}$$

$\hat{\sigma}_{W,j}$ Variance intra-série.

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

Il faut noter qu'à chacun des niveaux j niveaux de concentration pris en considération, une estimation statistique est réalisée selon le modèle ci-dessous [61] :

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

- X_{ijk} est la $k^{\text{ème}}$ concentration calculée du niveau j de la $i^{\text{ème}}$ concentration ;
- μ_j est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration j ;
- α_{ij} est l'écart entre la moyenne de la $i^{\text{ème}}$ série et la moyenne μ_j . au niveau j, α_{ij} est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance σ^2_{Bj} ;
- ε_{ijk} est l'erreur expérimentale.

La méthode de maximum de vraisemblance restreint est employée pour évaluer à chaque niveau de concentration j les paramètres $\mu_j, \sigma^2_{w,j}, \sigma^2_{B,j}$ du modèle [62]:

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

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

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

- Si $MSE_j < MSM_j$;

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

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

- Si $MSE_j > MSM_j$;

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

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

Avec :

- **MSM_j** et **MSE_j** : Maximum des vraisemblances des moindres carrés pour chaque niveau de concentration j
- $\bar{X}_{ij,calc}$: Moyenne des concentrations calculées du niveau j de la série i
- $x_{ijk,calc}$: Concentration calculée du niveau j de la série i répétition k
- $\bar{X}_{j,calc}$: Moyenne des concentrations calculées du niveau j
- **n** : nombre de répétitions
- **p** : nombre de série.

10.7. Justesse

10.7.1. Définition

- ✓ Selon la norme ISO 17025 : La justesse exprime la différence entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence. Elle est déterminée par rapport à un matériau de référence certifié (MRC). En l'absence de MRC, une valeur qui est acceptée comme une valeur conventionnellement vraie peut être utilisée [43].
- ✓ Selon l'ICH Q2R1 : 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. L'exactitude est confondue avec la justesse [42].

10.7.2. Etude statistique

La justesse nommée également biais de la méthode au niveau de concentration est obtenue en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées.

Elle peut s'exprimer en termes absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites [60].

$$\begin{aligned} \text{biais}_j &= \hat{\mu}_j - \bar{x}_j \\ \text{biais}(\%)_j &= 100 \times \frac{\hat{\mu}_j - \bar{x}_j}{\bar{x}_j} \\ \text{Recouvrement}(\%)_j &= 100 \times \frac{\hat{\mu}_j}{\bar{x}_j} \end{aligned}$$

$\hat{\mu}_j$: Moyenne des concentrations prédites
 \bar{x}_j : Moyenne des concentrations introduites

10.8. Exactitude

- ✓ Selon la norme ISO 17025 : L'exactitude sera déterminée par comparaison d'une valeur de concentration théorique avec la valeur expérimentale. En général exprimée sous forme de pourcentage de recouvrement. Cette évaluation devra être confirmée sur 9 préparations minimum (en général 3 préparations sur 3 niveaux) en recouvrant la gamme de validation [43].
- ✓ Selon l'ICH Q2R1 : L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention. L'exactitude est confondue avec la justesse [42].

10.9. Sensibilité

- ✓ Selon la norme ISO 17025 : La sensibilité d'une procédure d'analyse peut être définie comme étant le rapport de la variation de la réponse de la méthode d'analyse à la variation de la quantité d'analyte [43].

10.10. Limite de détection

- ✓ Selon la norme ISO 17025 : Limite de Détection, correspond à la plus petite concentration de la substance pouvant être détectée, mais non quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. Autrement dit, il s'agit de la limite en-dessous de laquelle l'analyte est considéré comme « non détecté » [43].
- ✓ Selon l'ICH Q2R1 : La limite de détection d'une méthode d'analyse individuelle correspond à la plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de détecter, sans nécessairement fournir la valeur exacte [42].

10.11. Limite de quantification

- ✓ Selon la norme ISO 17025 : La limite de Quantification, correspond à la plus petite concentration de la substance pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode [43].
- ✓ Selon l'ICH Q2R1 : C'est la concentration la plus basse quantifiable. Les seuils seront déterminés en analysant la substance à des concentrations de plus en plus faibles jusqu'à ses limites [42].

10.12. Robustesse

- ✓ Selon la norme ISO 17025 : qualité d'une méthode capable de donner des résultats d'une exactitude et d'une précision acceptables dans des conditions diverses [43].
- ✓ Selon l'ICH Q2R1 : La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité 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 [42].

10.13. Stabilité de la solution

- ✓ Selon l'ICH Q2R1 : Les essais de stabilité fournissent des données sur la manière dont la qualité d'un produit pharmaceutique varie en fonction du temps et sous l'effet de divers facteurs environnementaux (la température et l'humidité). Ceci permet de définir, les conditions de conservations et de déterminer la durée de validité des produits.

Les études de stabilité doivent être menées sur toutes les dimensions et types de conditionnements prévus pour la mise sur le marché du produit [42].

Il est nécessaire de vérifier deux types de stabilité dans l'échantillon biologique : la stabilité à court terme (+ 20° C, +4° C, -20° C) et la stabilité à long terme (-20° C, -80° C). Ces essais de stabilité seront réalisés dans toutes les matrices dans lesquelles on sera amené à doser l'analyte.

Des essais de stabilité de l'analyte dans le sang total peuvent également être réalisés afin de valider la procédure de prélèvement sanguin. Des essais de congélation / décongélation (3 cycles) doivent être aussi effectués.

Les concentrations obtenues après stockage ne doivent pas varier de plus de 10-15 % par rapport à la concentration théorique [55].

11. Le choix des critères de validation

Le choix des critères de validation diffère selon le type de méthode utilisé, il est représenté dans le tableau V

TABLEAU V : Le choix des critères de validation [63]

Type du test caractéristique	Dosage	Impuretés		Identification	Dosage bioanalyse
		Quantitatif	Essais limites		
Exactitude	✓	✓			✓
Répétabilité	✓	✓			✓
Fidélité intermédiaire	✓	✓			✓
Spécificité	✓	✓	✓	✓	✓
Limite de détection		✓	✓		✓
Limite de quantification		✓			✓
Linéarité	✓	✓			Fonction de réponse
Intervalle de mesure	✓	✓			✓
Robustesse	✓	✓			

12. Le profil d'exactitude

L'objectif d'une méthode analytique quantitative est de quantifier la valeur de l'échantillon avec une exactitude connue et acceptable. Traditionnellement, selon la démarche classique, ceci est accompli en examinant deux critères statistiques inhérent à la performance de la méthode analytique qui sont habituellement mesurés séparément : le biais ou « justesse » et la précision ou « fidélité ». Cette approche suppose que si la méthode est bonne, alors les mesures qu'elle fournit seront aussi bonnes ; cependant ce n'est pas toujours le cas.

En effet, une nouvelle commission SFSTP a publié un guide en 2003 qui propose de revoir les bases mêmes de la validation analytique pour une démarche harmonisée, au lieu de mesurer la justesse et la fidélité séparément, il est possible d'évaluer l'exactitude d'une manière globale. Cette nouvelle approche est basée sur l'erreur totale (biais + écart type) avec l'introduction du profil d'exactitude comme outil de décision [64].

12.1. Règles de décision

Pour qu'une méthode d'analyse quantitative soit exacte, l'écart du résultat d'analyse et de la valeur vraie inconnue doit être inférieur à une limite d'acceptation (λ) qui peut être variable selon les exigences de l'analyste (et/ou du client) et de la finalité de la méthode d'analyse [65].

12.1.1. Les limites d'acceptabilité $\pm\lambda$

Elles servent à traduire les objectifs pratiques des utilisateurs. Elles délimitent un intervalle autour de la valeur de référence. Le plus souvent, ces limites sont réglementaires ou issues de la réglementation, mais dans le cas où il n'existe pas de référence établie, il convient de prendre en compte les attentes des utilisateurs finaux comme une LQ donnée [66].

12.1.2. La proportion β

Elle représente la proportion de futurs résultats qui seront en moyenne compris dans les intervalles de tolérance. La valeur choisie pour β dépend largement du champ d'application. Il est évident que plus β est petit plus la méthode risque de produire des résultats qui ne correspondent pas aux spécifications annoncées. C'est pourquoi, dans la méthode du profil d'exactitude cette proportion doit être supérieure à 80 %, au moins [66].

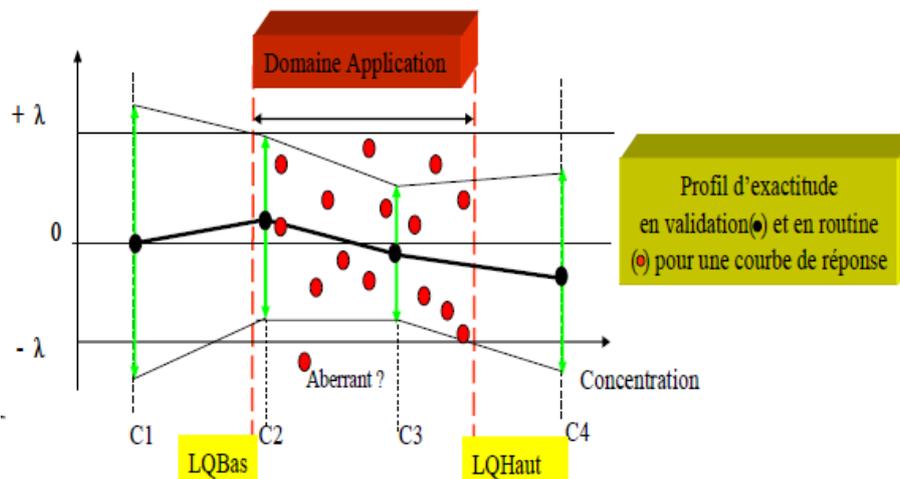


Figure 6 : Domaine d'application du profil d'exactitude

La règle de décision, à la fois pratique et visuelle, repose sur l'intégration du profil d'exactitude (erreur totale) dans des limites d'acceptation pour un modèle d'étalonnage déjà défini pour une courbe de réponse linéaire, par exemple.

Construit à partir des intervalles de tolérance des résultats de mesure sur des matériaux de référence avec matrice et de valeurs connues, ce profil d'exactitude permet de définir une zone capable de quantifier avec une exactitude calculée et un risque fixé par l'analyste.

Cette zone deviendra le domaine d'application validé pour la méthode d'analyse en définissant une limite de quantification basse et haute.

Si l'objectif de l'analyste ne peut être atteint, il doit, sous sa propre responsabilité, soit modifier son modèle d'étalonnage, soit augmenter les limites de tolérance si aucunes ne sont définies au niveau d'une norme, soit accepter un risque plus grand. En cas d'échec, il sera nécessaire de choisir une autre méthode d'analyse puisque celle-ci n'offre pas suffisamment de garanties quant à sa capacité à répondre à l'objectif fixé [67].

12.2. Application

Rappelons que toute méthode d'analyse se caractérise par un « vrai biais » ou erreur systématique, et une « vraie fidélité » ou erreur aléatoire mesurée par un écart-type. Ces deux paramètres qui caractérisent la méthode d'analyse sont inconnus, tout comme la « valeur vraie » de l'échantillon à analyser.

En fait, les expériences réalisées lors de la validation permettront d'estimer ce biais et cette fidélité qui seront d'autant plus fiables que les expériences effectuées sur des échantillons connus (matériaux de référence) seront adaptées et le nombre d'essais appropriés.

Ces estimateurs de biais et de fidélité ne sont pas une fin en soi ; ils sont une étape intermédiaire obligatoire pour pouvoir évaluer si la méthode d'analyse peut répondre à son objectif qui est de pouvoir ou non quantifier avec une exactitude suffisante chacun des échantillons [67].

12.3. Profil d'exactitude proprement dit

L'estimation de l'erreur totale d'une procédure est fondamentale pour juger de la validité d'une méthode. Celle-ci, comme indiqué ci-dessous, est la somme de la justesse (biais) et de la fidélité [62].

$$\begin{aligned}
 xi &= \mu T + \textit{justesse} + \textit{fidélité} \\
 xi - \mu T &= \textit{justesse} + \textit{fidélité} \\
 xi - \mu T &= \textit{exactitude (ISO)} = \textit{erreur totale} \\
 |xi - \mu T| &< \textit{erreur totale} < \lambda
 \end{aligned}$$

Où : x_i : valeur trouvée

μT : vraie valeur

λ : limite d'acceptation ($\pm 5\%$)

Le dernier critère indispensable pour construire le profil d'exactitude est la fidélité intermédiaire.

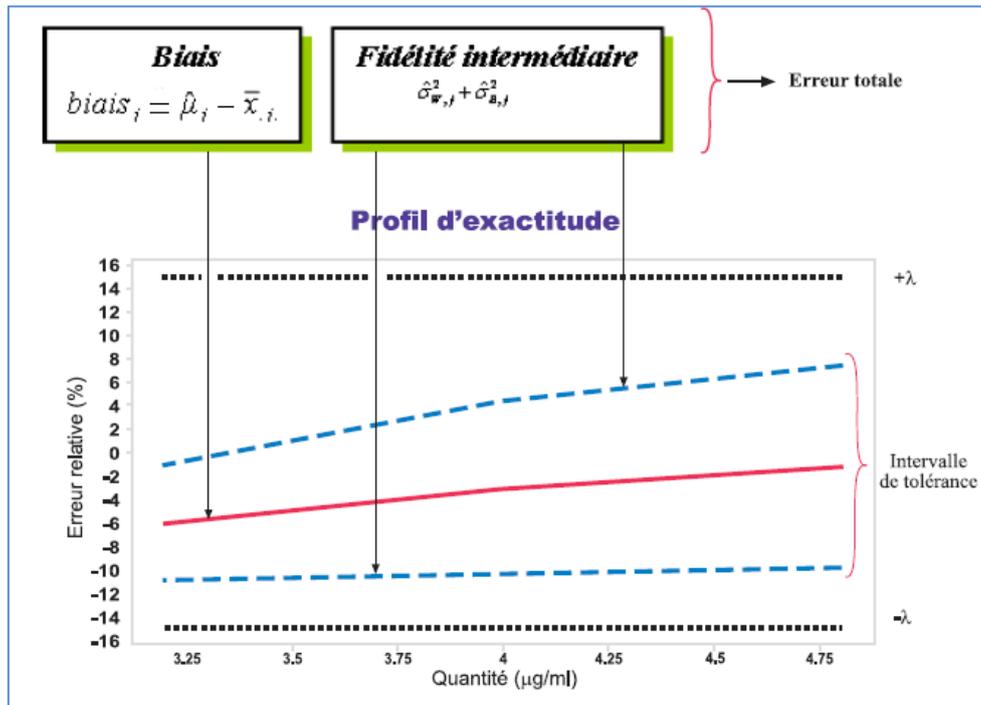
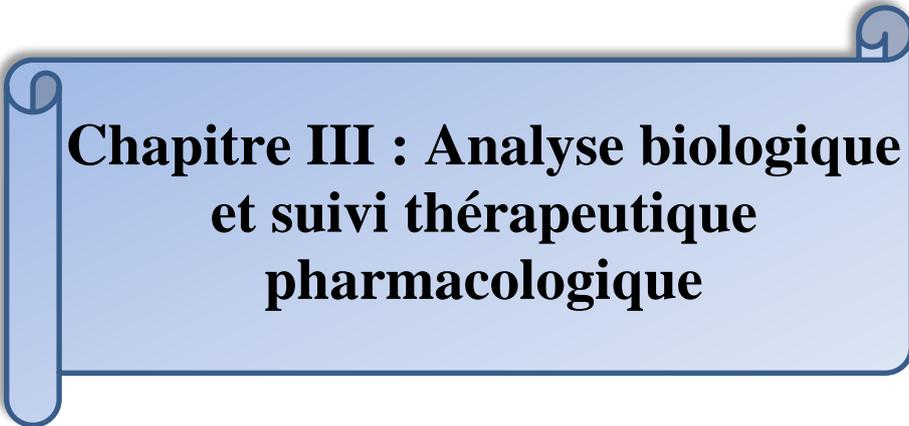


Figure 7 : Profil d'exactitude [68]



**Chapitre III : Analyse biologique
et suivi thérapeutique
pharmacologique**

Aujourd'hui, la bioanalyse est une partie essentielle dans l'évaluation toxicologique et les études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques ; c'est une discipline importante dans de nombreux domaines de recherche notamment la mise au point de nouveaux médicaments, l'analyse judiciaire, le contrôle antidopage et l'identification des biomarqueurs pour le diagnostic de nombreuses maladies. Elle couvre l'identification et la quantification des analytes dans les échantillons biologiques (sang, plasma, sérum, salive, urine, fèces, peau, cheveux...) et ne se limite pas seulement à mesurer des petites molécules telles que les médicaments et les métabolites mais également à identifier les protéines et les peptides.

La procédure de bioanalyse comprend l'échantillonnage, la préparation des échantillons, l'analyse, l'étalonnage, l'évaluation des données et la production de rapports.

1. Analyse biologique

1.1. Nature du milieu biologique et mode de prélèvement

Le prélèvement biologique est soumis à certaines contraintes, puisque la concentration du médicament dépend fortement du moment du prélèvement par rapport au début du traitement et la dernière administration, mais aussi de la voie d'administration et de la formulation galénique.

Le dosage se fait généralement dans le sérum, parfois dans le plasma ou le sang total. Dans la majorité des cas, le dosage sanguin se fait après atteinte de l'état d'équilibre ($5t_{1/2}$) ; après le début du traitement ou après le dernier changement de posologie [69]. Le choix de l'anticoagulant dépend de la molécule à doser [70]. Il peut se faire également dans les urines, la salive et d'autres liquides biologiques. Le choix est guidé par la technique analytique et les caractéristiques de la substance.

1.2. Effet matrice

Une matrice est définie comme étant l'ensemble des propriétés de l'échantillon et de ses constituants autres que l'analyte.

L'effet de matrice traduit l'influence possible que ces propriétés ou constituants peuvent avoir sur la réponse instrumentale. Comme l'effet de matrice peut varier aux différents stades de l'analyse (par exemple avant ou après minéralisation), pratiquement un type de matrice sera défini comme un groupe de matériaux ou de produits reconnus par l'analyste comme ayant un comportement homogène vis-à-vis de la méthode d'analyse utilisée [52].

Toute méthode bioanalytique peut être sujette à des interférences, il peut s'agir de métabolites, d'impuretés, des produits de dégradation, des composants de la matrice... [71]

Le sang total est l'une des matrices les plus complexes dont les composants peuvent affecter la réponse de signal d'un processus bioanalytique.

- Les protéines sériques se lient souvent non spécifiquement aux analytes ou à une surface, ce qui réduit la sensibilité [72] ;
- Les phospholipides endogènes ont été identifiés comme une source importante d'effets matriciels [73] ;
- Les anticoagulants, qui sont utilisés lors des prélèvements sanguins, ont été trouvés qu'ils ont un effet significatif sur l'extraction et l'analyse [74] ;
- La forte viscosité du sang modifie également la détection et la spécificité ;
- Certains biomarqueurs informatifs, comme les marqueurs de rejet de greffe. La gestion matricielle pour détecter ce type d'analyte est encore plus difficile, car même de faibles niveaux de composants de matrice ou de résidus peuvent fausser l'analyse [75].

1.3. Prétraitement

Les matrices biologiques contiennent une multitude de composés endogènes (protéines dans le plasma, acides gras dans l'urine) souvent en concentration plus forte que les analytes à doser ou leurs métabolites, causant ainsi un problème d'interférences. Pour y remédier, un prétraitement de l'échantillon est nécessaire.

En HPLC, l'élimination des composants endogènes dus à la matrice est particulièrement importante car ces derniers provoquent une détérioration rapide des performances de la colonne analytique (baisse du nombre de plateaux théoriques, perte de sélectivité, élargissement des pics) et du détecteur (saturation, augmentation du bruit de fond). En effet, ces composés peuvent s'adsorber irréversiblement sur la phase stationnaire comme les lipides (perte de sélectivité) ou précipiter dans la colonne comme les protéines (augmentation de la pression en tête de colonne). L'utilisation de pré-colonnes placées juste avant la colonne analytique permet de limiter partiellement ces problèmes [76].

1.3.1. Précipitation des protéines

La précipitation des protéines peut être obtenue par modification [77] :

- **De la force ionique** : utilisation d'une solution saline saturée de sulfate d'ammonium ;

- **Du pH** : ajout en petite quantité d'une solution d'acides forts : acide perchlorique ou trichloracétique essentiellement, ou ajout d'une solution basique toujours en faible volume : sulfate de zinc/hydroxyde de sodium ou sulfate de zinc/hydroxyde de baryum ;
- **De la constante diélectrique** : ajout d'acétonitrile, méthanol, éthanol ou acétone.

1.3.2. Extraction

Le choix de la méthode d'extraction peut être fonction du mode de détection choisi. C'est ainsi que les extraits obtenus devront être particulièrement propres lorsque l'analyse est réalisée par HPLC-UV à basse longueur d'onde (210-220 nm) ou par Chromatographie en phase gazeuse (CPG) et détection par capture d'électron [76].

➤ **Extraction liquide-liquide**

L'extraction liquide-liquide est connue pour générer des extraits relativement propres avec un bon coefficient d'extraction [76]. C'est souvent la méthode de choix pour quantifier de très faibles concentrations d'un composé (de l'ordre du pg/mL).

Cependant cette méthode de purification a longtemps été difficilement automatisable ; elle est de plus, longue à mettre en œuvre. Récemment, certains auteurs ont développé des méthodes d'extraction liquide-liquide sur plaques à 96 puits semi-automatisées ou entièrement automatisées [78, 79].

Il en existe 4 méthodes [76] :

- Extraction liquide-liquide classique ;
- Double extraction liquide-liquide ;
- Extraction par formation des paires d'ions ;
- Extraction par solvant après dérivatisation.

➤ **Extraction solide-liquide**

Le principe de l'extraction solide-liquide est la rétention sélective du ou des analytes sur une phase stationnaire grâce à des interactions intermoléculaires entre l'analyte et les groupements fonctionnels de la phase stationnaire. Ces interactions sont de type ionique, liaisons hydrogène, interactions dipôle-dipôle et liaisons de Van der Waals [76].

➤ Micro-extraction liquide-liquide

C'est une méthode d'extraction liquide-liquide miniaturisée dans laquelle le volume du solvant d'extraction est de l'ordre des microlitres. C'est une nouvelle et puissante technique de pré-concentration basée sur l'utilisation d'un solvant de dispersion miscible à l'eau et d'un solvant d'extraction non miscible à l'eau qui seront par la suite ajoutés à l'échantillon aqueux traité. Après mélange, une solution nuageuse est formée par la dispersion de gouttelettes du solvant d'extraction dans la solution de l'échantillon, par conséquent, une zone de contact très élevée est générée entre la phase aqueuse et le solvant d'extraction. Les analytes sont extraits rapidement dans la phase d'extraction qui est ensuite séparée par centrifugation, et les analytes enrichis dans la phase sédimentée (avec ou sans traitement ultérieur) sont déterminés par des techniques analytiques [80].

1.4. Techniques de dosage en bioanalyse

Les méthodes de dosage des médicaments peuvent être séparées en deux grands groupes [81, 82]:

- **Les méthodes immunochimiques**
 - Enzyme Multiplied Immunoassay Technique EMIT ;
 - Fluorescence Polarization ImmunoAssay FPIA ;
 - Immuno-turbidimétrie.
- **Les méthodes séparatives**
 - Chromatographie en phase gazeuse CPG avec détection à ionisation de flamme ou spectrométrie de masse SM ;
 - Chromatographie Liquide à Haute Performance HPLC avec détection dans l'ultra-violet UV, en fluorescence ou par électrochimie ;
 - Electrophorèse capillaire.
- **Autres méthodes**
 - Spectrométrie de masse SM ;
 - Résonance magnétique nucléaire RMN ;

Toute technique utilisée pour un dosage de médicament devra être validée.

1.5. Choix de la technique de dosage

En raison du caractère non volatil de la plupart des médicaments, l'analyse par CPG nécessite une dérivation préalable du composé. Par contre, la HPLC est particulièrement bien adaptée à l'analyse des substances non volatiles et à leurs métabolites plus polaires [76].

1.6. Interprétation des résultats

L'interprétation correcte d'un taux d'un médicament implique la connaissance de la méthode utilisée, l'intervalle de référence est souvent en fonction de cette méthode. Il est important de conserver la même méthode analytique pour le suivi d'un patient.

Après validation analytique du dosage, le praticien reçoit le résultat et les marges thérapeutiques correspondantes de la méthode utilisée [83, 84].

2. Suivi thérapeutique pharmacologique

2.1. Définition

Le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) est défini par l'Association internationale de suivi thérapeutique pharmacologique et de toxicologie clinique (IATDMCT) comme :

Une spécialité clinique pluridisciplinaire visant à améliorer la prise en charge du patient en ajustant individuellement la dose de certains médicaments (ceux pour lesquels l'expérience clinique ou les essais cliniques ont démontré que cette pratique apportait un bénéfice au patient) dans la population générale ou dans une population particulière. Il repose à priori sur des informations pharmacogénétiques, démographiques et cliniques et/ou a posteriori sur la mesure des concentrations sanguines du médicament (suivi pharmacocinétique) ou de composés endogènes de substitution ou de paramètres biologiques d'effet (suivi pharmacodynamique) [85].

2.2. Caractéristiques des médicaments nécessitant un suivi

Le suivi et plus particulièrement le contrôle des concentrations ne présente un intérêt thérapeutique que si les critères suivants s'appliquent [86] :

2.2.1. Analytiques

- Disponibilité d'une méthode de dosage appropriée, fiable, précise et reproductible à un coût supportable.

2.2.2. Pharmacocinétiques

- Disponibilité de données pharmacocinétiques du médicament ;

- Grande variabilité pharmacocinétique interindividuelle ;
- Grande variabilité pharmacocinétique intrinsèque : pharmacocinétique non prévisible ;
- Grande variabilité inter et intra-individuelle de la relation dose administrée-concentration sanguine.

2.2.3. Pharmacodynamiques

- Disponibilité de données pharmacodynamiques du médicament ;
- Existence d'une relation claire, réversible et consistante entre les concentrations sanguines en médicament et l'effet thérapeutique/toxicité ;
- Marge thérapeutique étroite.

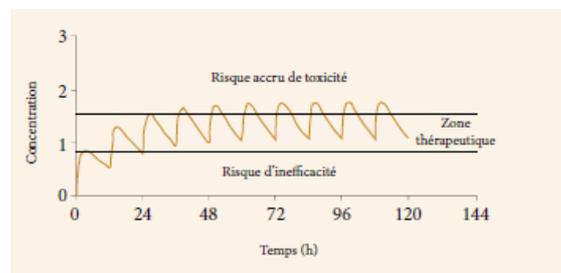


Figure 8 : représentation de la zone thérapeutique [87].

2.2.4. Cliniques

- Absence de signes d'efficacité clinique/toxicité facilement mesurables et/ou interprétables à court terme ;
- Durée de la thérapie suffisante pour que les patients puissent bénéficier d'un suivi thérapeutique pharmacologique.

3. Niveau de preuve du suivi thérapeutique du Fluconazole

Le Fluconazole est l'agent antifongique de choix pour diverses infections fongiques, en particulier les infections à *Candida*. Il présente une pharmacocinétique linéaire aux doses recommandées et démontre une excellente diffusion dans divers tissus et liquides biologiques. Il est actuellement recommandé pour le traitement et la prophylaxie de la candidémie en cas de maladie grave chez les patients neutropéniques et non neutropéniques n'ayant pas récemment été exposés aux azolés [88].

Chez ces derniers, les infections à *Candida* sont associées à des taux de mortalité allant jusqu'à 60% et 40%, respectivement. Un dosage inadéquat peut, en partie, être responsable des échecs de traitement et de l'augmentation de la mortalité [89, 90].

Toutefois, un dosage optimal pourrait être réalisé en tenant compte de la pharmacocinétique et des propriétés pharmacodynamiques du Fluconazole et les altérations physiopathologiques associées aux maladies graves.

En raison de son large index thérapeutique et de la faible variabilité interindividuelle observée, le suivi thérapeutique du Fluconazole ne fait pas l'objet de recommandations mis à part les situations suivantes [1] :

- ✓ En cas d'un échec thérapeutique ;
- ✓ Chez la population pédiatrique [91] ;
- ✓ Chez le patient insuffisant rénal sévère ;
- ✓ Chez le patient en hémodialyse ou hémofiltre [92] ;
- ✓ Chez le patient infecté par une souche de *Candida* ayant une sensibilité diminuée [93];
- ✓ Chez le patient présentant des facteurs entraînant des modifications majeures de la pharmacocinétique (sujets obèses et grands brûlés) ;
- ✓ En cas de problème d'observance.

La fourchette thérapeutique des concentrations plasmatiques n'est pas clairement définie.

Cependant, une CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) comprise entre 16 et 32 mg/L a été suggérée pour des souches de *Candida* traitées in vitro [94]. Par conséquent, il serait recommandé d'atteindre des concentrations résiduelles supérieures à 32 mg/L mais inférieures à 80 mg/L pour éviter l'apparition de convulsions [24].

3.1. Situations recommandant un suivi thérapeutique

3.1.1. La population pédiatrique

Des paramètres pharmacocinétiques distinctifs du Fluconazole ont été décrits chez les nouveau-nés et les enfants avec fièvre, neutropénie et maladies néoplasiques.

Le Fluconazole a une demi-vie plus courte (~18 h) et un plus grand volume de distribution chez les enfants par rapport aux adultes, contrairement aux nouveau-nés qui présentent une plus longue demi-vie que les adultes [95].

En suivant le schéma posologique actuellement recommandé pour le traitement des infections au cours des cancers chez l'enfant par le Fluconazole, les concentrations plasmatiques de ce dernier ne sont pas suffisantes, et une dose de Fluconazole plus élevée est nécessaire pour obtenir une exposition adéquate en médicaments. La surveillance thérapeutique du Fluconazole peut être un outil précieux pour détecter une possible sous exposition chez les enfants gravement malades [96].

3.1.2. Les patients avec insuffisance rénale chronique

La pharmacocinétique du Fluconazole est modifiée chez le patient insuffisant rénal du fait de la forte participation du rein dans l'élimination de ce médicament.

Ainsi, il a été montré que la demi-vie d'élimination du Fluconazole augmente jusqu'à 98 h chez le patient avec une insuffisance rénale sévère et dont la clairance de la créatinine est inférieure à 20mL/min, alors qu'elle n'est que d'environ 30 h chez le sujet ayant une fonction rénale normale. Il est donc nécessaire d'adapter la posologie du Fluconazole chez le patient insuffisant rénal.

En effet, en l'absence de diminution de la dose unitaire administrée ou d'un allongement de l'intervalle d'administration, le médicament risque de s'accumuler et d'induire des effets toxiques.

Ainsi, chez les patients dont la clairance de la créatinine est comprise entre 10 et 60 mL/min, il est recommandé de diminuer de 50 % les posologies d'entretien du Fluconazole, en diminuant la dose unitaire de moitié ou en doublant l'intervalle d'administration, quelle que soit l'indication.

Chez ces patients, l'adaptation de la posologie porte uniquement sur la dose d'entretien et non sur la dose de charge qui doit être identique à celle du patient ayant une fonction rénale normale, comme il est d'usage pour la plupart des médicaments [97].

3.1.3. Les patients en hémodialyse

Pour qu'un médicament soit considéré comme très probablement dialysable, son indice de Gwilt et Perrier doit être supérieur à la valeur limite de 80, cet indice rapporte la valeur de la fraction libre de médicament (en %) à celle du volume de distribution (en L/kg). Le Fluconazole ayant un indice de 111, est dialysable [98].

La clairance corporelle totale du Fluconazole chez les sujets volontaires sains ayant une fonction rénale normale est de $17,9 \pm 7,9$ mL/min [9]. La clairance d'hémodialyse du Fluconazole étant près de 6 fois supérieure à la clairance corporelle totale du patient ayant une fonction rénale normale, elle sera d'autant plus significative comparée à celle des patients insuffisants rénaux terminaux et la séance d'hémodialyse aura des répercussions significatives sur la pharmacocinétique du médicament [97].

3.1.4. Chez les patients infectés par des souches de *Candida* ayant une sensibilité diminuée

Il est bien compris qu'un dosage approprié est essentiel pour l'utilisation du Fluconazole et que ces doses doivent être guidées par la sensibilité locale, les profils de résistance et les cibles pharmacodynamiques.

Il a été démontré par des études *in vivo* et *in vitro* que le ratio AUC_{0-24}/CMI est le meilleur paramètre pour évaluer l'efficacité. Une valeur proche de 25 a été établie pour être associée à des résultats cliniques optimaux en cas de candidose oropharyngée [99]. Pour les cas de candidémies, les preuves confirmatives sont encore absentes.

Des études pharmacocinétique et pharmacodynamiques sont nécessaires pour établir ou confirmer les schémas posologiques actuels chez les patients malades. En outre, l'information pharmacocinétique comparant des concentrations de liquide interstitiel et les concentrations plasmatiques sont insuffisantes et d'autres recherches sont nécessaires pour optimiser les stratégies de dosage du fluconazole [100].

3.1.5. Grands brûlés

Les propriétés pharmacocinétiques du Fluconazole pourrait être significativement altérées chez les grands brûlés.

Lorsque la même dose a été donnée à la fois à une population de patients brûlés et de non brûlés, la concentration plasmatique du Fluconazole était plus faible en cas de brûlures en raison de [101] :

- ✓ La grande modification des paramètres pharmacocinétiques (clairance, volume de distribution) ;
- ✓ La thérapie de remplacement rénal continu.

3.1.6. Sujets obèses

L'obésité est associée à une proportion réduite de masse corporelle maigre et d'eau corporelle totale par rapport aux tissus adipeux, ce qui entraîne des changements dans la distribution des médicaments. Des recommandations de dose appropriée ne peuvent être formulées qu'après une étude pharmacocinétique détaillée étant donné que l'augmentation du poids du patient est associée à un risque de traitement inadéquat au Fluconazole. Il est recommandé d'envisager des doses plus élevées chez les patients à obésité morbide, puisque les doses allant jusqu'à 2400 mg/jour ont été bien tolérées chez des patients ayant un poids moyen de 70 kg [13].



PARTIE PRATIQUE



Matériel et méthodes

Le développement d'une nouvelle méthode analytique pour le dosage du Fluconazole au niveau plasmatique pour le suivi thérapeutique est le sujet de notre projet de fin d'étude. Le présent travail vise à optimiser et valider cette méthode par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) en appliquant le profil d'exactitude. Ce travail expérimental a été réalisé au niveau du laboratoire de chimie analytique du département de pharmacie de Tizi-Ouzou, sur une période qui s'étend de Janvier jusqu'au Juillet 2022 et ce en conformité avec le protocole de validation publié par la commission Française des Sciences Techniques et Pharmaceutique (SFSTP) en 2003 et complété en 2006.

1. Matériel

1.1. Verrerie et autres

La verrerie et les matériaux auxquels on a eu recours dans ce présent travail sont présentés dans le tableau suivant (Tableau VI) :

TABLEAU VI : Verrerie et autres

Verrerie	Autres
<ul style="list-style-type: none"> • Fioles jaugées : 20mL, 25mL, 100mL ; 250mL, 1000mL ; • Bêchers ; • Erlenmeyers ; • Vials à HPLC ; • Pipettes jaugée 5mL, 10mL, 15mL, 20mL ; • Tubes à essais ; • Verre de montre ; • Eprouvette 100mL. 	<ul style="list-style-type: none"> • Filtre membrane ; • Spatules ; • Pipette pasteur non stérilisée ; • Micro pipettes automatiques 50µL, 100µL, 1000µL ; • Pissette ; • Pipteur ; • Gants ; • Embouts.



Figure 9 : Le matériel utilisé

1.2. Matières premières

Les matières premières utilisées pour réaliser ce travail sont représentées dans le tableau ci-dessous (Tableau VII)

TABLEAU VII : Matières premières

Matières premières	Propriétés Physicochimiques	Usages	Fournisseur
Fluconazole	Formule brute : $C_{13}H_{12}F_2N_6O$ N° CAS : 86386-73-4 Mr : 306,271 g/mol	Principe actif	Fourni gracieusement par les laboratoires Biopharm industries
Métronidazole	Formule brute : $C_6H_9N_3O_3$ N° CAS : 443-48-1 Mr : 171,16 g/mol	Etalon interne	Fourni gracieusement par les laboratoires Biopharm industries

1.3. Réactifs

Les réactifs auxquels on a eu recours dans ce présent travail sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau VIII) :

TABLEAU VIII : Les réactifs utilisés.

Réactifs	Propriétés physico-chimiques	Usages	Fournisseur	Précautions d'emploi
Acétonitril grade HPLC	Formule brute : C_2H_3N N° CAS : 75-05-8 Mr : 41.05 g/mol ρ : 0.786 g.cm ⁻³	Phase mobile	HONEYWELL	
HCl 0,1 N	Formule brute : HCl N° CAS : 7647-01-0 Mr : 36.461 g/mol ρ : 1.19 g.cm ⁻³	Diluant	SIGMA ALDRICH	
Acide perchlorique	Formule brute : $HClO_4$ N° CAS : 7601-90-3 Mr : 100.46 g/mol ρ : 1.67 g.cm ⁻³	Précipitation	SIGMA ALDRICH	
Méthanol	Formule brute : CH_4O N° CAS : 67-56-1 Mr : 32.04g/mol ρ : 1.19 g.cm ⁻³	Extraction	SIGMA ALDRICH	
Eau pure	Formule brute : H_2O N° CAS : 7732-18-5 Mr : 18 g/mol ρ : 1 g.cm ⁻³	Dilution	Laboratoire Belloua	Aucune



Figure 10 : Réactifs utilisés

1.4. Equipements et appareillage

Les équipements et appareillage utilisés pour réaliser ce travail sont représentés dans les tableaux (Tableau IX, X)

TABLEAU IX : HPLC Shimadzu LC 20.

Appareils		Spécifications	Usage
HPLC SHIMADZU LC 20	Pompe	Lc20 at	Séparation, dosage et obtention des chromatogrammes
	Injecteur automatique	SIL 20 A	
	contrôleur	CBM-20	
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A	
	Colonne	SHIMADZU Shim-pack GIST C18 (15 et 25 cm)	
	Détecteur	Spectrophotomètre UV visible SPD-20AV	
	Logiciel d'exploitation	LC-solution	



Figure 11 : Appareil HPLC.



Figure 12 : Colonne utilisée

TABLEAU X : Equipements et appareillage.

Appareils	Spécifications	Usage
Balance analytique	OHAUS	Pesée
	KERN	
Vortex	IKA MS3	Agitation
Centrifugeuse	HETTICH EBA 20	Séparation
Spectrophotomètre UV-visible	PERKINELMER Lambda 25 Double faisceaux	Scan (Obtention des spectres et longueurs d'onde d'absorption)
Etuve	MEMMERT	Séchage de la verrerie
Distillateur	NUVE	Distillation de l'eau

**Figure 13** : Balance analytique**Figure 14** : Vortex



Figure 15 : Centrifugeuse

2. Méthodes

2.1. Optimisation de la méthode :

Afin d'optimiser cette méthode de dosage de Fluconazole par HPLC-UV dans le plasma, nous avons fait varier plusieurs paramètres chromatographiques dans le but de sélectionner les conditions optimales et convenables permettant d'obtenir une bonne résolution avec un temps d'analyse raisonnable.

Pour cela, nous avons commencé par effectuer un scan à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible afin d'analyser les spectres d'absorption du Fluconazole et du Métronidazole (EI) préparés dans des solutions séparément, de déterminer leur λ_{\max} et par la suite choisir une longueur d'onde λ où les deux molécules absorbent simultanément, ceci nous permettra de les analyser conjointement à cette même longueur d'onde. Dans ce sens, nous avons constaté que la longueur d'onde d'absorption commune pour ces deux dernières est de 260 nm.

Afin d'optimiser le rendement de l'extraction, nous avons opter pour plusieurs procédés de précipitation de protéines et d'extraction, à savoir :

- NaOH + Dichlorométhane, suivi d'une évaporation ;
- NaOH + Hexane, suivi d'une évaporation ;
- NaOH + ACN ;
- NaOH + méthanol ;
- Acide perchlorique + ACN ;
- Acide perchlorique + méthanol.

On a fait varier les temps d'agitation de 1 à 3 min, et les temps de centrifugation 15 puis 20min.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec

- ✓ Acide perchlorique et le méthanol ;
- ✓ Temps d'agitation : 1min ;
- ✓ Une centrifugation de 3000 tr/min pendant 15 min.

Après avoir choisi la longueur d'onde et le protocole d'extraction, on est passées au choix des colonnes chromatographiques (Colonnes RP 18 de 15 et 25cm de longueur), pour lesquelles nous avons essayé plusieurs types de phases mobiles à plusieurs proportions, à savoir :

- Mélange eau/ACN ;
- Tampon acétate (pH = 5) /ACN;
- Tampon acétate (pH = 5) / méthanol.

Pour l'élution, on a essayé un mode isochratique et un gradient d'élution.

Pour atteindre l'objectif qu'on s'est fixé, et après plusieurs essais, nous avons enfin opter pour l'utilisation d'une colonne RP 18 de 15 cm et une phase mobile constitué par le mélange eau/ACN avec un gradient d'élution détaillé dans les conditions chromatographiques (voir 2.4).

On a essayé plusieurs débits de phase mobile et volumes d'injection, les meilleurs résultats ont été obtenus avec un débit de 1mL/min et un volume d'injection de 40µL.

On a également fait varier les températures et les résultats optimales ont été obtenus à 30°C.

Cette optimisation a apporté une nette satisfaction pour les résultats obtenus, et nous a permis de commencer la validation de notre méthode.

2.2. Méthodologie de la validation analytique

Pour valider la méthode de dosage du Fluconazole dans le plasma par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC), nous nous sommes référés à de nombreux documents officiels décrivant les critères de la validation à tester. Ces derniers ne proposent pas de protocole expérimental et se limitent le plus souvent aux concepts généraux.

Si ces premiers guides ont largement contribué à faire appliquer et progresser les validations analytiques, ils présentent toutefois des faiblesses quant aux conclusions des tests réalisés et quant à l'aide à la prise de décision au regard de limites d'acceptation définies pour l'usage d'une procédure analytique.

Sur ce, le présent travail est basé sur :

Les recommandations de la commission SFSTP publiées en 2003 complétées en 2006 qui propose de revoir les bases mêmes de la validation analytique pour une démarche harmonisée, en distinguant notamment les règles de diagnostic et les règles de décision.

Ces dernières reposent sur l'utilisation du profil d'exactitude, basé sur la notion d'erreur totale (biais + écart type), permettant de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation.

2.2.1. Choix du protocole de validation

2.2.1.1. Domaines d'application et niveaux de concentration

Dans notre travail, et en raison de l'absence de l'effet matrice prouvée par l'étude de spécificité, nous avons opté pour le protocole V2 avec cinq niveaux de concentration qui englobent la plage des concentrations plasmatiques dont l'intervalle thérapeutique est de [32-64 mg/L] lors de la validation selon le profil d'exactitude de la commission SFSTP (2006) ; de 20mg/L jusqu'à 100mg/L (Cmax) en passant par trois niveaux intermédiaires.

2.2.1.2. Limites d'acceptabilité (λ)

Vu qu'on a utilisé une matrice biologique et en suivant les recommandations de SFSTP, la limite d'acceptabilité choisie est $\lambda = \pm 15\%$

2.2.1.3. Probabilité de confiance (β)

Vu qu'on a utilisé une matrice biologique, la probabilité de confiance choisie est $\beta = 85\%$

2.2.1.4. Conditions expérimentales

Choix du diluant

Le Fluconazole se dissout dans l'acétonitrile, le méthanol et l'HCl.

En raison de la toxicité du méthanol et le cout élevé de l'acétonitrile, nous avons choisi d'utiliser l'HCl (0.1N).

2.2.2. Préparation des Solutions

a. Préparations de la phase mobile

La phase mobile est constituée de :

- Phase A : ACN grade HPLC ;
- Phase B : Eau pure.

b. Préparation du diluant HCl 0.1N

Dans une fiole jaugée de 1L, contenant un petit volume d'eau, mettre 8 mL d'HCl R (37%), compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau purifiée.

c. Préparations de solution de l'acide perchlorique 1N

A partir d'une solution mère de l'acide perchlorique 5N, on a effectué des dilutions à 1/5^{ème} pour obtenir une solution 1N.

d. Préparation de l'étalon interne

Dans une fiole de 100 mL, peser 100 mg de l'étalon interne "Métronidazole" pour obtenir une concentration de 1mg/mL, dissoudre dans un volume suffisant du diluant, agiter au vortex pour une dissolution totale puis compléter au trait de jauge avec le diluant.

e. Préparations des solutions mères

Dans des fioles jaugées de 100 mL, peser 50 mg du principe actif "Fluconazole", dissoudre dans un volume suffisant du diluant, puis compléter au trait de jauge, on obtient ainsi une concentration de 500 mg/L, préparer cinq solutions identiques, deux serviront pour l'étalonnage et trois pour la validation.

A partir des solutions préparées auparavant à la concentration de 500mg/l, effectuer des dilutions au 4/5^{ème}, 3/5^{ème}, 2/5^{ème} et 1/5^{ème} dans des fioles de 25mL en prélevant 20mL, 15mL, 10mL, 5mL et en complétant au trait de jauge avec le diluant afin d'obtenir les solutions à des concentrations de 400 ; 300 ; 200 et 100 mg/l respectivement. On obtient en tout 5 solutions mères en comptant celle de 500 mg/L.

2.3. Préparation des standards

2.3.1. Standards de validation

Pour avoir des plasmas chargés avec les concentrations voulues de Fluconazole qui correspondent à l'intervalle de dosage étudié [20-100] mg/L, on ajoute 150µL de chacune des cinq solutions mères préparées au préalable (Paragraphe 2.2.2) à 600µL de plasma, effectuant ainsi une dilution à 1/5^{ème} pour chaque solution, les concentrations obtenues (dans le plasma) seront : 20 ; 40 ; 60 ; 80 ; 100 mg/L, on ajoutant 150µL de Métronidazole (EI), ensuite ces préparations vont subir une précipitation des protéines.

- **Précipitation des protéines :**

Dans ces mêmes tubes, On ajoute 100µL d'acide perchlorique ;

Rajouter 500µL de méthanol, centrifuger à une vitesse de 3000tr/min pendant 15min ;

Rajouter un autre volume de 500µL de méthanol, recentrifuger à une vitesse de 3000tr/min pendant 15min puis récupérer et rassembler les deux surnageants (1 mL).

Agiter au vortex pendant 1min.

2.3.2. Standards d'étalonnage

Dans des tubes à essais, mettre :

- 150µL du Fluconazole de chaque niveau de concentration ;
- 150µL du Métronidazole ;
- 1.7mL du diluant : ce volume est calculé de façon à avoir la même concentration finale que les standards de validation ; en remplaçant les 600µL et 100µL de plasma et d'acide perchlorique par 700µL de diluant et les deux volumes d'extraction (500×2) par 1mL de diluant.

2.4. Conditions Chromatographiques

Les conditions chromatographiques sont résumées dans le tableau XI

TABLEAU XI : Les conditions chromatographiques

Colonne	Longueur	15 cm
	Diamètre	4,6 mm
	Diamètre des particules	5 µm
	Phase stationnaire	Gel de silice octadecylesilyle (C18)
Détection	Spectrophotomètre UV-visible : Longueur d'onde = 260nm	
Volume d'injection	40µL	
Temps d'analyse	9.5 min	
Débit	1mL/min	
Température	30°C	
Phase mobile	Gradient d'élution : 1 à 2min : 90% eau pure, 10% Acétonitrile 2 à 2.5min : 90 à 60% eau pure, 10 à 40% Acétonitrile 2.5 à 4min : 60% eau pure, 40% Acétonitrile 4 à 4.5min : 60 à 90% eau pure, 40 à 10% Acétonitrile 4.5 à 9.5min : 90% eau pure, 10% Acétonitrile	

2.5. Préparation de la feuille de calcul

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

Le profil d'exactitude est calculé subséquemment aux équations rentrant dans l'étude statistique de la validation, ces dernières permettent d'avoir les résultats définitifs à l'introduction des données brutes en termes de prises d'essais et de leurs réponses.



Résultats et discussion

1. Résultats

La technique de dosage utilisée dans notre méthode est la Chromatographie Liquide à Haute Performance « HPLC » couplé à un détecteur Ultra-violet « UV ».

Les résultats obtenus sont des airs de pics de chromatogrammes du Fluconazole et son étalon interne et sont représentés dans l'annexe II.

1.1. Chromatogrammes obtenus du dosage du Fluconazole et de la Métronidazole (étalon interne)

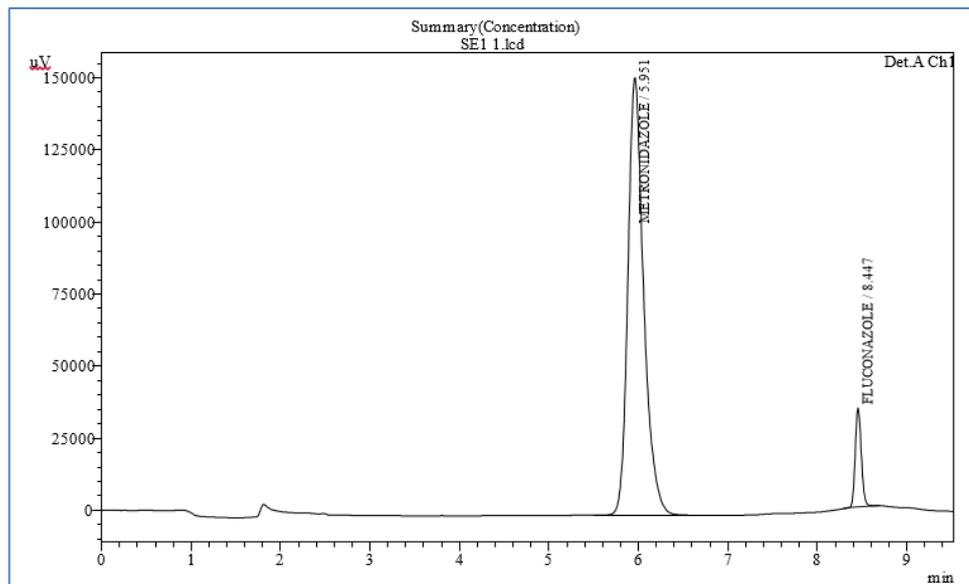


Figure 16 : Chromatogramme du Fluconazole et de Métronidazole (EI) sans matrice.

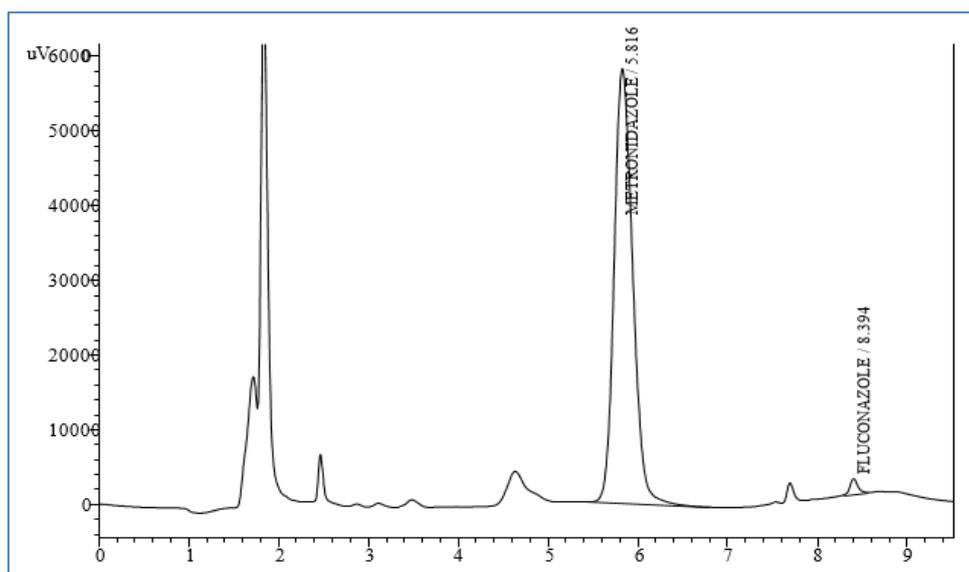


Figure 17 : Chromatogramme du Fluconazole et de Métronidazole (EI) avec matrice.

1.2. Temps de rétention obtenus

Le temps de rétention moyen de la Fluconazole = 8,40 min.

Le temps de rétention moyen de la Métronidazole = 5,80 min.

1.3. Calcul de la résolution

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

Avec :

- t_{r1} et t_{r2} : temps de rétention de la Métronidazole et du Fluconazole respectivement ;
- ω_1 et ω_2 : largeur du pic à la base de la Métronidazole et du Fluconazole respectivement, déterminées, comme l'illustre la figure (18) ci-dessous, par l'intersection des tangentes aux points d'inflexion des pics avec la ligne de base.

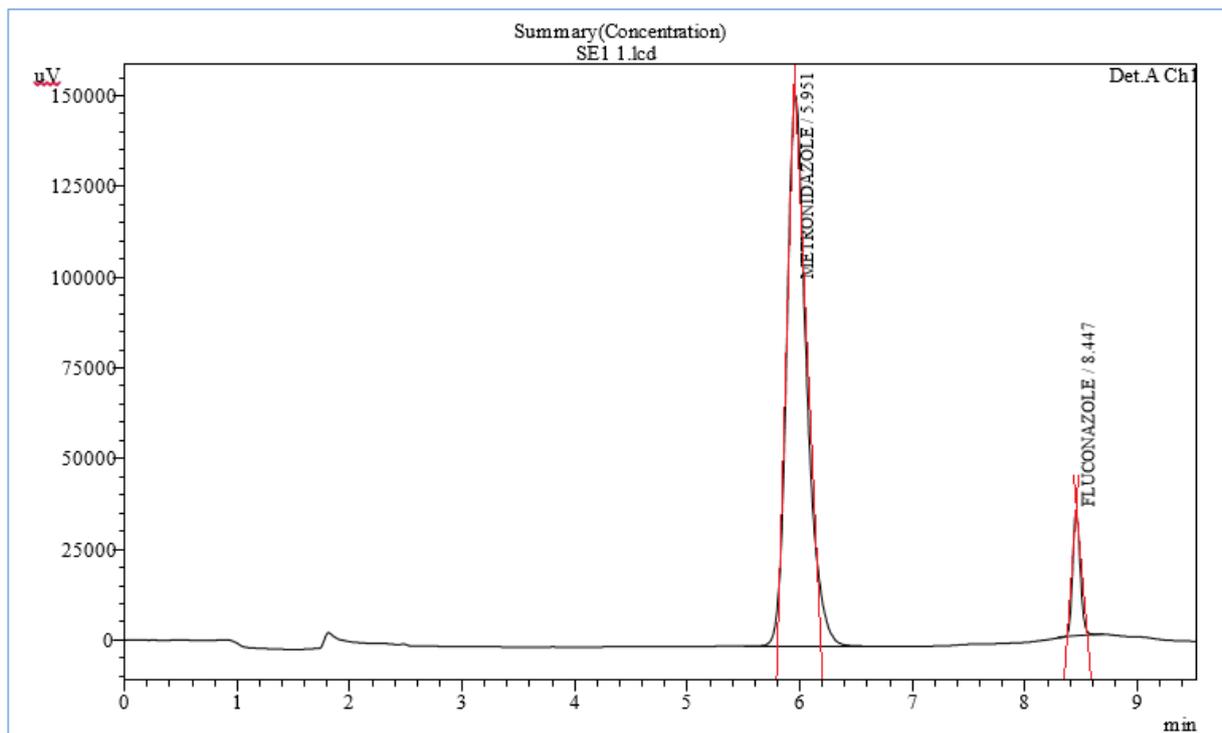


Figure 18 : Détermination des largeurs des pics à la base et des temps de rétention à partir du chromatogramme sans matrice.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant (Tableau XII) :

TABLEAU XII : Temps de rétention et largeur du pic à la base des deux PA.

Principes actifs	Fluconazole	Métronidazole
Temps de rétention	8,40 min	5,80 min
Largeur du pic à la base	0.25 min	0.4 min

Calcul du facteur de résolution

$$R_s = 2 \frac{8,40 - 5,80}{0,25 + 0,4} = 8$$

1.4. Informations concernant les données brutes

Les résultats des concentrations et des réponses sont représentés respectivement par les rapports des concentrations et des aires de pics entre le Fluconazole et la Métronidazole (EI).

Les rapports de concentrations présentées sont issus des concentrations finales injectées (après chargement des plasmas), leurs valeurs sont choisies de façon à simuler les intervalles thérapeutiques des patients traités par le Fluconazole.

1.5. Sélectivité et effet matrice

L'évaluation de la sélectivité et de l'absence de l'effet matrice se fait par deux façons :

- La comparaison des chromatogrammes ;
- Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation.

1.5.1. Comparaison des chromatogrammes

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

Elle est illustrée dans les figures suivantes :

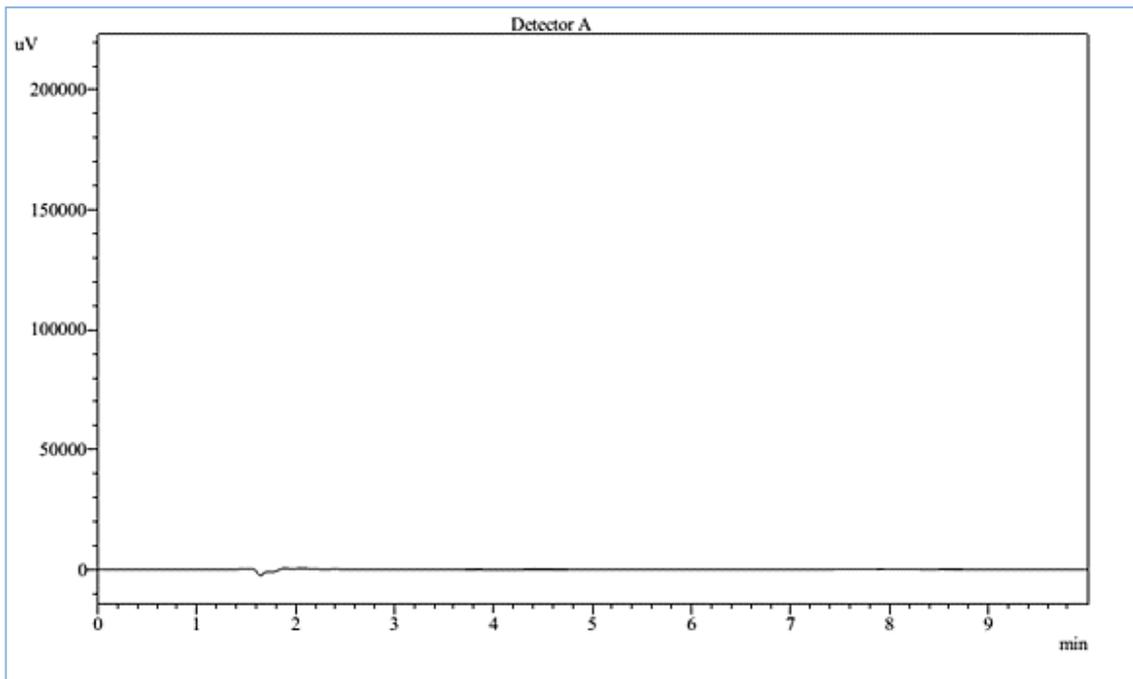


Figure 19 : Chromatogramme du diluant non chargé.

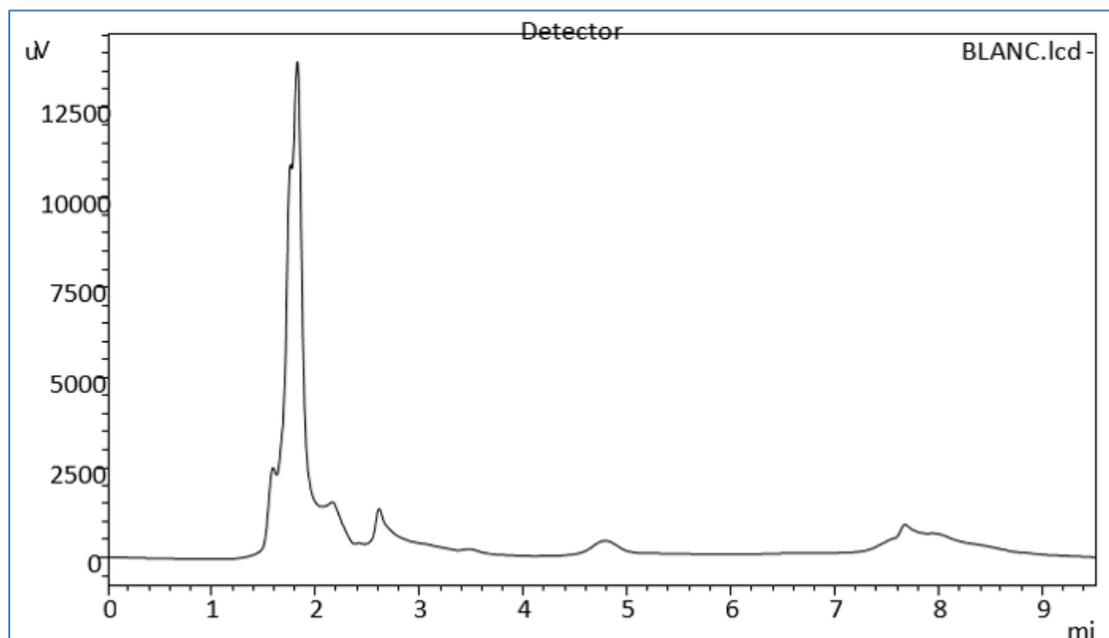


Figure 20 : Chromatogramme de Plasma non chargé.

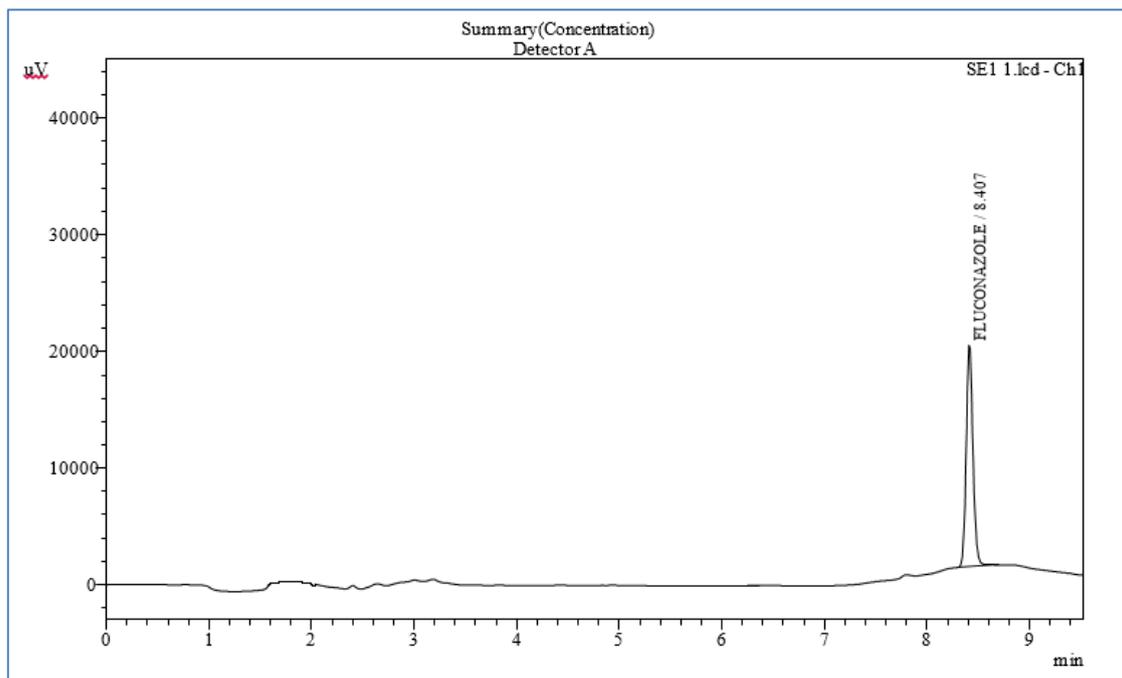


Figure 21 : Chromatogramme du Fluconazole sans matrice (dans le diluant).

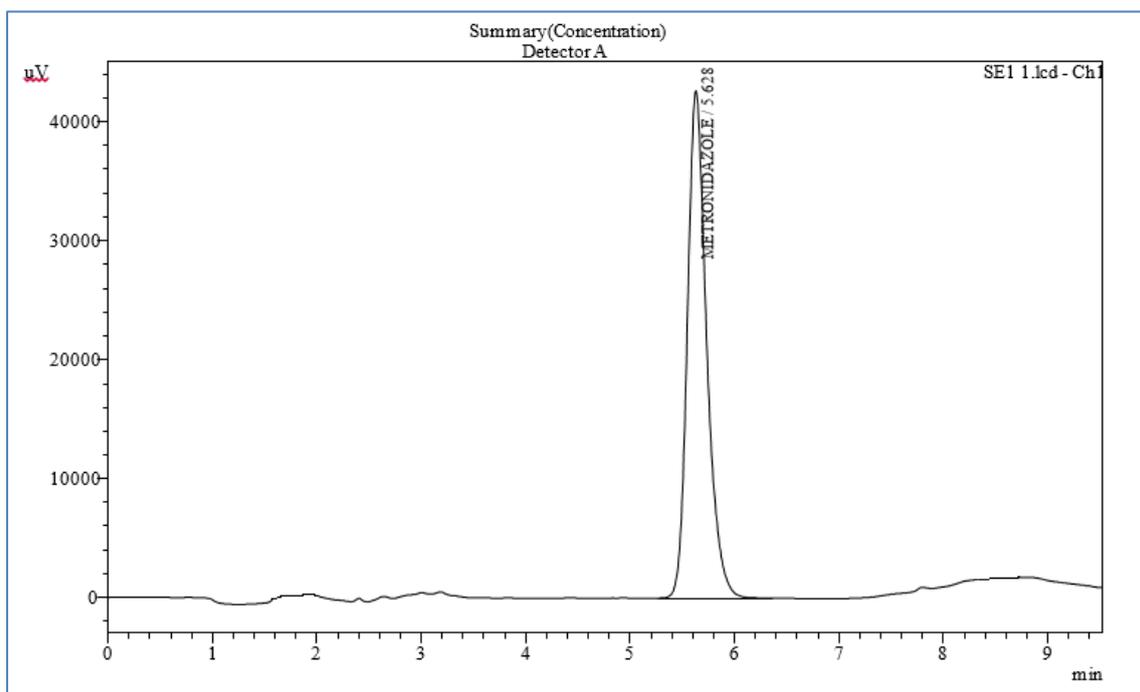


Figure 22 : Chromatogramme du Métronidazole (EI) sans matrice (dans le diluant)

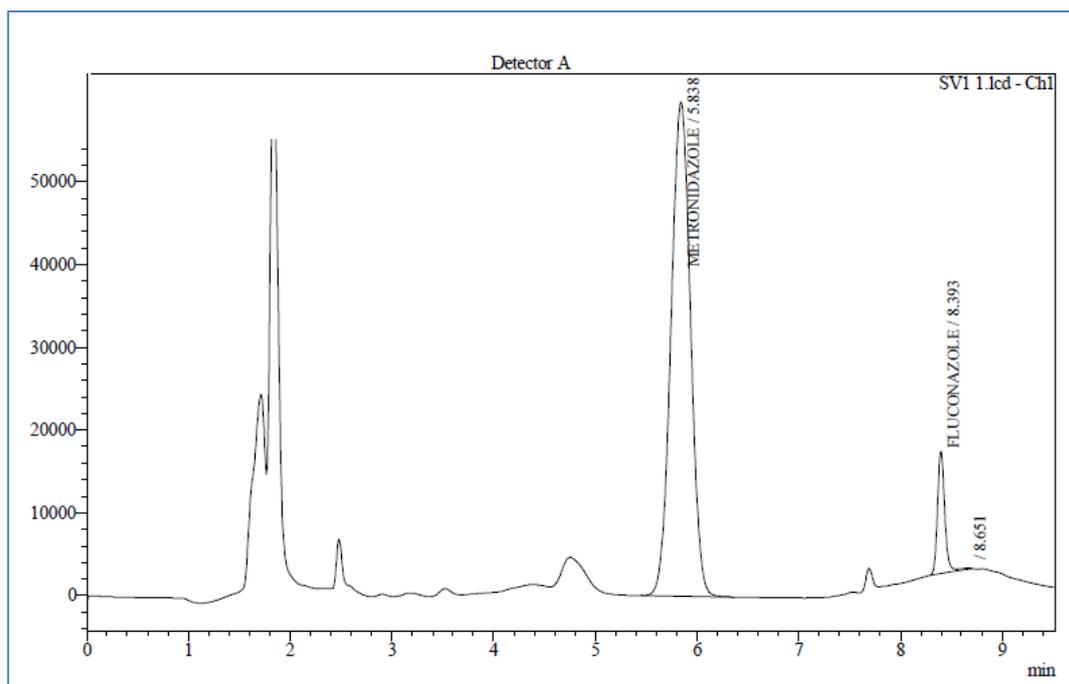


Figure 23 : Chromatogramme du Fluconazole et du Métronidazole (EI) dans le Plasma (avec matrice).

Le tableau suivant (Tableau XIII) représente les résultats de la superposition des quatre chromatogrammes :

TABLEAU XIII : Résultats de la superposition des chromatogrammes.

Solutions	Temps de rétention		Superposition
Diluant non chargé	Absence de pics		Concluante
Plasma non chargé			
Molécules dans le diluant	Fluconazole	8,407 min	
	Métronidazole	5,628 min	
Molécules dans le Plasma	Fluconazole	8,394 min	
	Métronidazole	5,816 min	

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

L'étude statistique de la sélectivité et d'effet matrice est réalisée sur les standards d'étalonnage avec le Fluconazole seul et les standards de validation avec le plasma, les résultats sont résumés dans les tableaux suivants (Tableau XIV et XV)

TABLEAU XIV : Résultats obtenus de l'étude de la sélectivité et de l'effet matrice : standards d'étalonnage (sans matrice) du Fluconazole.

Niveaux	1 ^{ère} répétition de chaque série	Concentrations des standards d'étalonnage (X_x/X_{EI})	Réponses instrumentales (Y_x/Y_{EI})	Réponses calculées (Y^*i)	$(Y_i - Y^*i)^2$	$(X_i - X')^2$
20mg/L	1	0,099	0,016	0,03	0,0002	0,04
	2	0,099	0,017	0,03	0,0002	0,04
	3	0,100	0,100	0,03	0,0048	0,04
40mg/L	1	0,198	0,028	0,04	0,0002	0,01
	2	0,198	0,028	0,04	0,0002	0,01
	3	0,199	0,028	0,04	0,0002	0,01
60mg/L	1	0,297	0,050	0,06	0,0000	0,00
	2	0,297	0,049	0,06	0,0001	0,00
	3	0,299	0,049	0,06	0,0000	0,00
80mg/L	1	0,395	0,066	0,07	0,0000	0,01
	2	0,396	0,068	0,07	0,0000	0,01
	3	0,399	0,069	0,07	0,0000	0,01
100mg/L	1	0,494	0,088	0,08	0,0001	0,04
	2	0,496	0,090	0,08	0,0001	0,04
	3	0,498	0,088	0,08	0,0000	0,04
Pente			0,129			
Ordonnée à l'origine			0,017			
Erreur pente			0,040			
Erreur ordonnée à l'origine			0,013			

TABLEAU XV : Résultats obtenus de l'étude de la sélectivité et de l'effet matrice : standards de validation (avec matrice) du Fluconazole.

Niveaux	1 ^{ère} répétition de chaque série	Concentrations des standards d'étalonnage (X_x/X_{EI})	Réponses instrumentales (Y_x/Y_{EI})	Réponses calculées (Y^*i)	$(Y_i - Y^*i)^2$	$(X_i - X')^2$
20mg/L	1	0,099	0,018	0,01	0,0000	0,04
	2	0,099	0,019	0,01	0,0000	0,04
	3	0,100	0,015	0,01	0,0000	0,04
40mg/L	1	0,198	0,028	0,03	0,0000	0,01
	2	0,199	0,028	0,03	0,0000	0,01
	3	0,200	0,027	0,03	0,0000	0,01
60mg/L	1	0,297	0,050	0,05	0,0000	0,00
	2	0,298	0,049	0,05	0,0000	0,00
	3	0,300	0,050	0,05	0,0000	0,00
80mg/L	1	0,396	0,067	0,07	0,0000	0,01
	2	0,398	0,066	0,07	0,0000	0,01
	3	0,400	0,068	0,07	0,0000	0,01

100mg/L	1	0,495	0,085	0,08	0,0000	0,04
	2	0,497	0,090	0,08	0,0000	0,04
	3	0,500	0,082	0,09	0,0000	0,04
Pente			0,177			
Ordonnée à l'origine			-0,004			
Erreur pente			0,006			
Erreur ordonnée à l'origine			0,002			

La comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine du Fluconazole seul et du Fluconazole dans le plasma est représentée dans le tableau ci-dessous (Tableau XVI) :

TABLEAU XVI : Comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine du Fluconazole seul et du Fluconazole dans le plasma.

Comparaison des deux pentes des deux droites de régression	t calculé	1,19	Différence non significative
	t°(α ; 26)	2,06	
	Condition	t calculé < t°(α ; 26)	
Comparaison des ordonnées à l'origine des deux droites de régression	t calculé	1,47	Différence non significative
	t°(α ; 26)	2,06	
	Condition	t calculé < t°(α ; 26)	

1.6. Fonction de réponse

Dans le but de choisir le modèle d'étalonnage le plus adéquat qui est capable de produire une proportion suffisante des futures mesures qui se situeront à l'intérieur des limites d'acceptabilité, nous avons étudié quatre modèles reliant les aires des pics aux concentrations introduites :

- 1er modèle : Droite : $y = bx + a$;
- 2ème modèle : Droite passant par 0 : $y = bx$;
- 3ème modèle : Changement de variables par la fonction Logarithmique : $\ln y = f(\ln x)$;
- 4ème modèle : Changement de variables par la racine carrée : $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$.

Les tableaux suivants (Tableau XVII, XVIII, XIX, XX) regroupent les résultats des calculs statistiques pour tous les modèles suivis par leurs courbes d'étalonnage correspondantes à chaque série :

- **1er modèle : Droite : $Y = bx + a$**

TABLEAU XVII : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Fluconazole avec la fonction :
 $y = bx + a$ (sans matrice)

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)									
		1		2		3					
		(X_x/X_{EI})	(Y_x/Y_{EI})	(X_x/X_{EI})	(Y_x/Y_{EI})	(X_x/X_{EI})	(Y_x/Y_{EI})				
20mg/L	1	0,099	0,0164	0,099	0,017	0,100	0,016				
	2	0,099	0,0170	0,099	0,016	0,100	0,017				
40mg/L	1	0,198	0,0281	0,198	0,028	0,199	0,028				
	2	0,198	0,0277	0,198	0,028	0,199	0,028				
60mg/L	1	0,297	0,0498	0,297	0,049	0,299	0,049				
	2	0,297	0,0485	0,298	0,049	0,299	0,049				
80mg/L	1	0,395	0,0661	0,396	0,068	0,399	0,069				
	2	0,395	0,0648	0,397	0,068	0,399	0,066				
100mg/L	1	0,494	0,0883	0,496	0,090	0,498	0,088				
	2	0,494	0,0833	0,496	0,088	0,498	0,083				
Pente		0,1777		Pente		0,1847		Pente		0,1787	
Ordonnée à l'origine		-0,0037		Ordonnée à l'origine		-0,0049		Ordonnée à l'origine		-0,0040	

Les courbes d'étalonnage du Fluconazole obtenues avec la fonction $y = bx + a$ pour les séries 1, 2 et 3 sont représentés dans les figures 24, 25 et 26 respectivement :

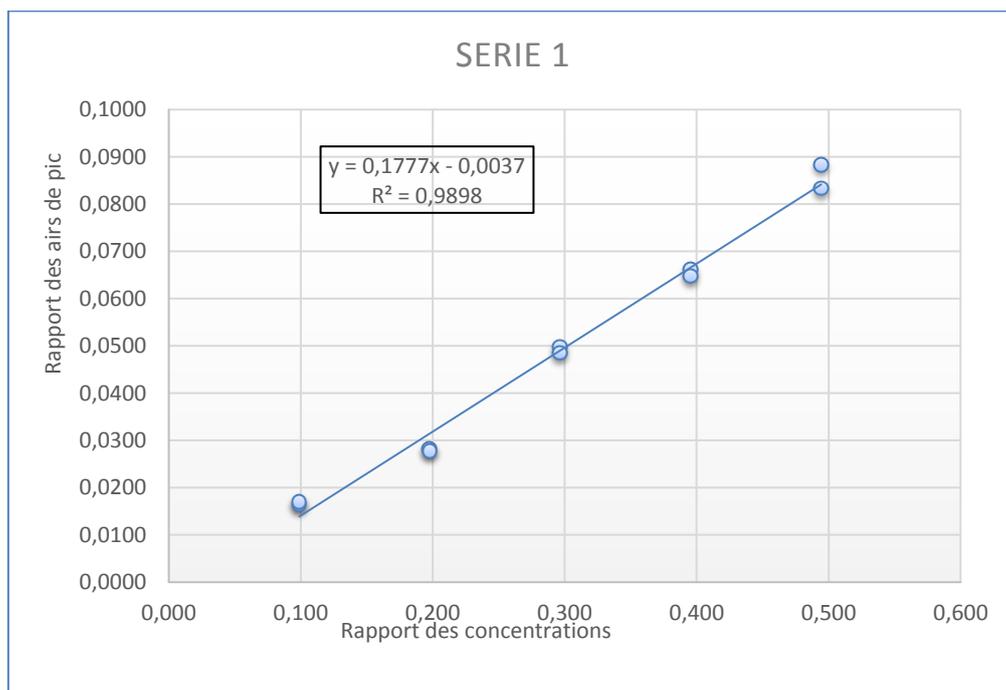


Figure 24 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $y = bx + a$ (série 1)

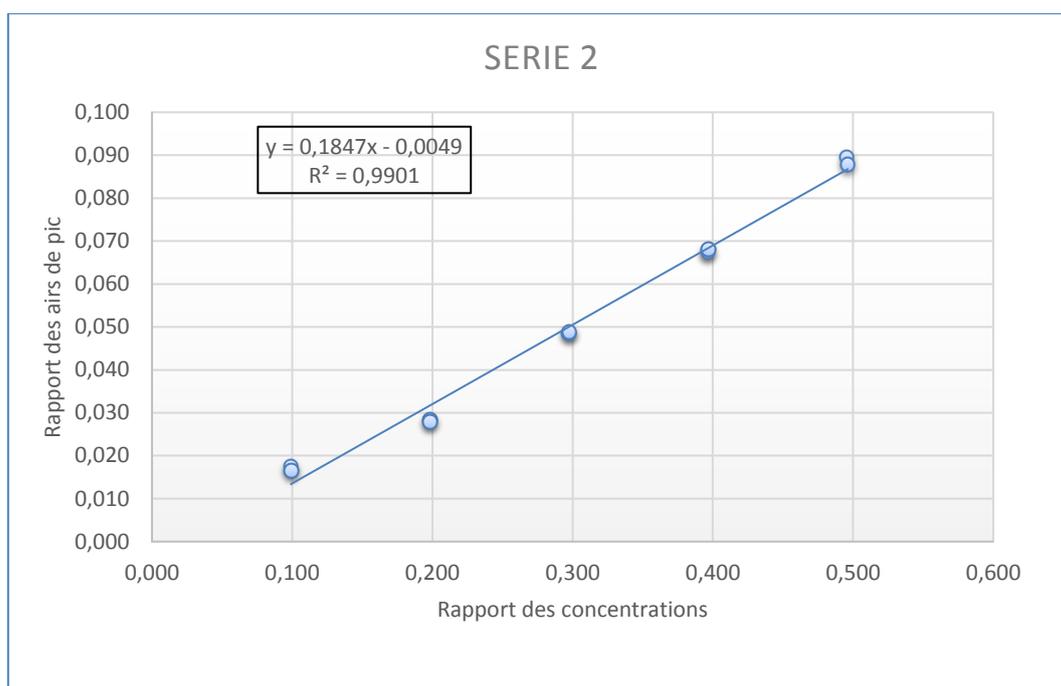


Figure 25 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $y = bx + a$ (série 2)

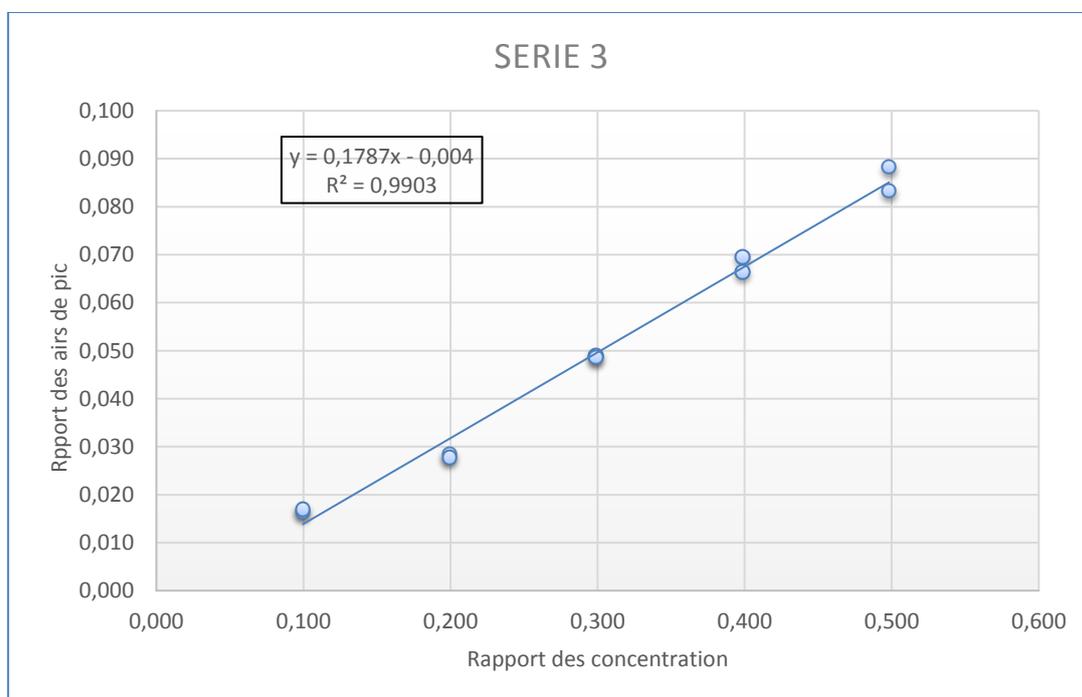


Figure 26 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $y = bx + a$ (série 3)

- 2ème modèle : Droite passant par 0 : $y = bx$

TABLEAU XVIII : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Fluconazole avec la fonction : $y = bx$ (sans matrice)

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		(X _x /X _{EI})	(Y _x /Y _{EI})	(X _x /X _{EI})	(Y _x /Y _{EI})	(X _x /X _{EI})	(Y _x /Y _{EI})
20mg/L	1	0,099	0,0164	0,099	0,017	0,100	0,016
	2	0,099	0,0170	0,099	0,016	0,100	0,017
40mg/L	1	0,198	0,0281	0,198	0,028	0,199	0,028
	2	0,198	0,0277	0,198	0,028	0,199	0,028
60mg/L	1	0,297	0,0498	0,297	0,049	0,299	0,049
	2	0,297	0,0485	0,298	0,049	0,299	0,049
80mg/L	1	0,395	0,0661	0,396	0,068	0,399	0,069
	2	0,395	0,0648	0,397	0,068	0,399	0,066
100mg/L	1	0,494	0,0883	0,496	0,090	0,498	0,088
	2	0,494	0,0833	0,496	0,088	0,498	0,083
Pente		0,1675		Pente		0,1712	
Ordonnée à l'origine		0,0000		Ordonnée à l'origine		0,0000	

Les courbes d'étalonnage du Fluconazole obtenues avec la fonction $y = bx$ pour les séries 1, 2 et 3 sont représentés dans les figures 27, 28 et 29 respectivement :

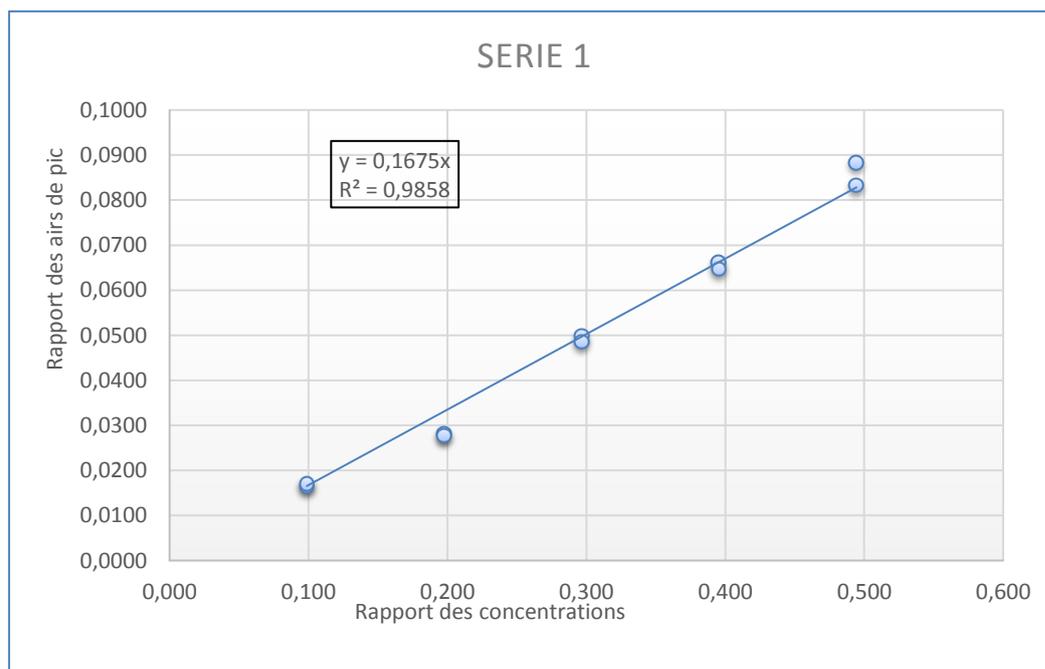


Figure 27 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $y = bx$ (Série 1).

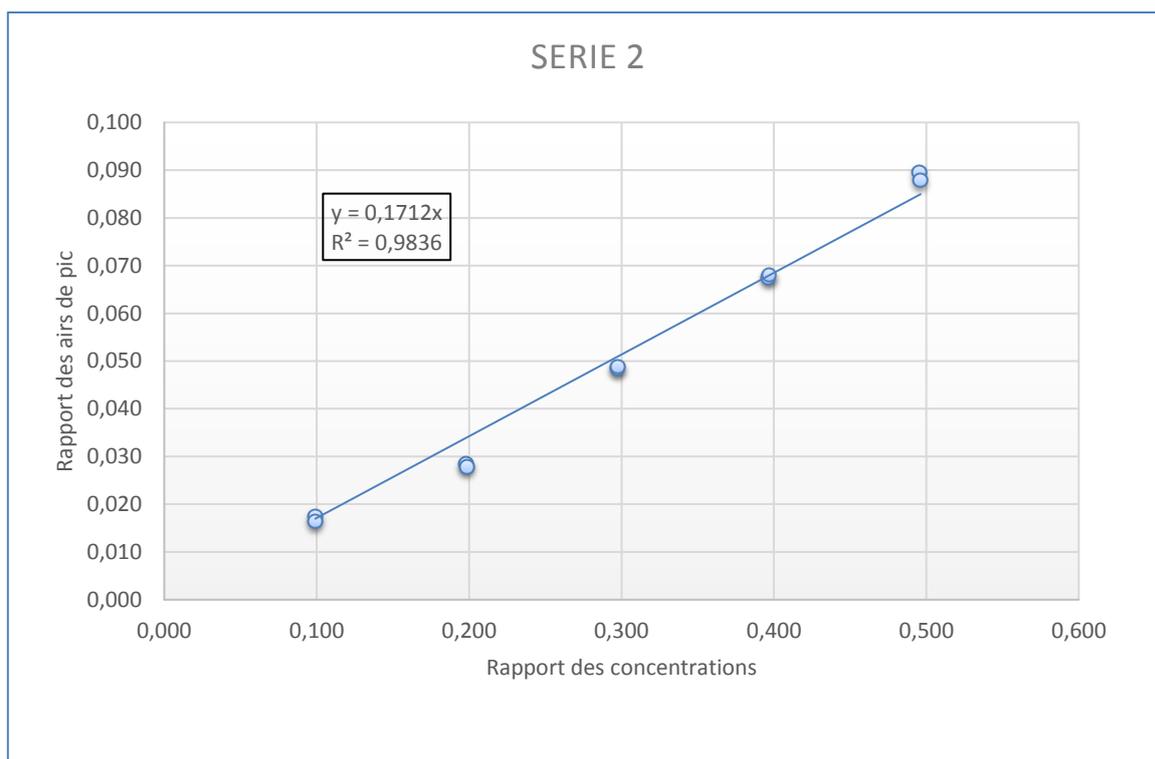


Figure 28 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $y = bx$ (Série 2)

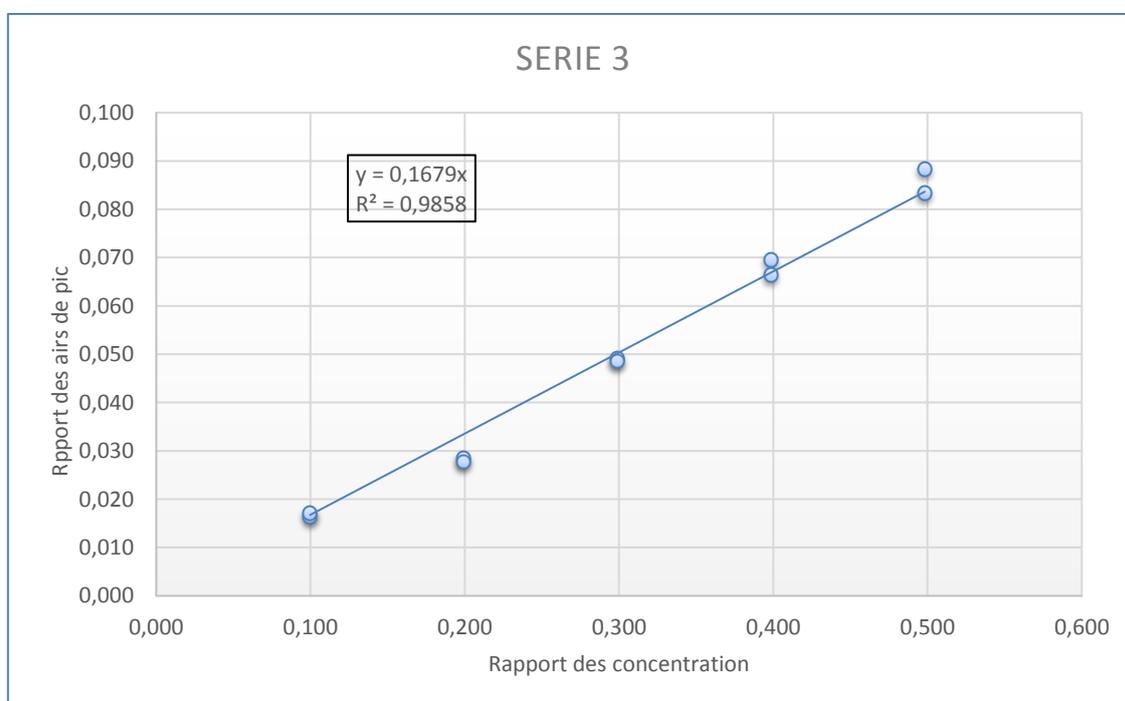


Figure 29 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $y = bx$ (Série 3)

- 3^{ème} modèle : Changement de variables par la fonction Logarithmique : $\ln y = f(\ln x)$

TABLEAU XIX : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Fluconazole avec la fonction : $\ln y = f(\ln x)$ (sans matrice).

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		$\ln(X_x/X_{EI})$	$\ln(Y_x/Y_{EI})$	$\ln(X_x/X_{EI})$	$\ln(Y_x/Y_{EI})$	$\ln(X_x/X_{EI})$	$\ln(Y_x/Y_{EI})$
20mg/L	1	-2,31	-4,10797	-2,31	-4,04628	-2,31	-4,11364
	2	-2,31	-4,07424	-2,31	-4,10772	-2,31	-4,07424
40mg/L	1	-1,62	-3,57053	-1,62	-3,56229	-1,61	-3,55964
	2	-1,62	-3,58520	-1,62	-3,58211	-1,61	-3,58520
60mg/L	1	-1,22	-2,99929	-1,21	-3,02528	-1,21	-3,01583
	2	-1,22	-3,02524	-1,21	-3,01959	-1,21	-3,02524
80mg/L	1	-0,93	-2,71647	-0,93	-2,69544	-0,92	-2,66653
	2	-0,93	-2,73707	-0,92	-2,68829	-0,92	-2,71193
100mg/L	1	-0,70	-2,42692	-0,70	-2,41231	-0,70	-2,42692
	2	-0,70	-2,48543	-0,70	-2,43170	-0,70	-2,48543
Pente		1,0322		Pente		1,0450	
Ordonnée à l'origine		-1,7726		Ordonnée à l'origine		-1,7609	

Les courbes d'étalonnage du Fluconazole obtenues avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ pour les séries 1, 2 et 3 sont représentés dans les figures 30, 31 et 32 respectivement :

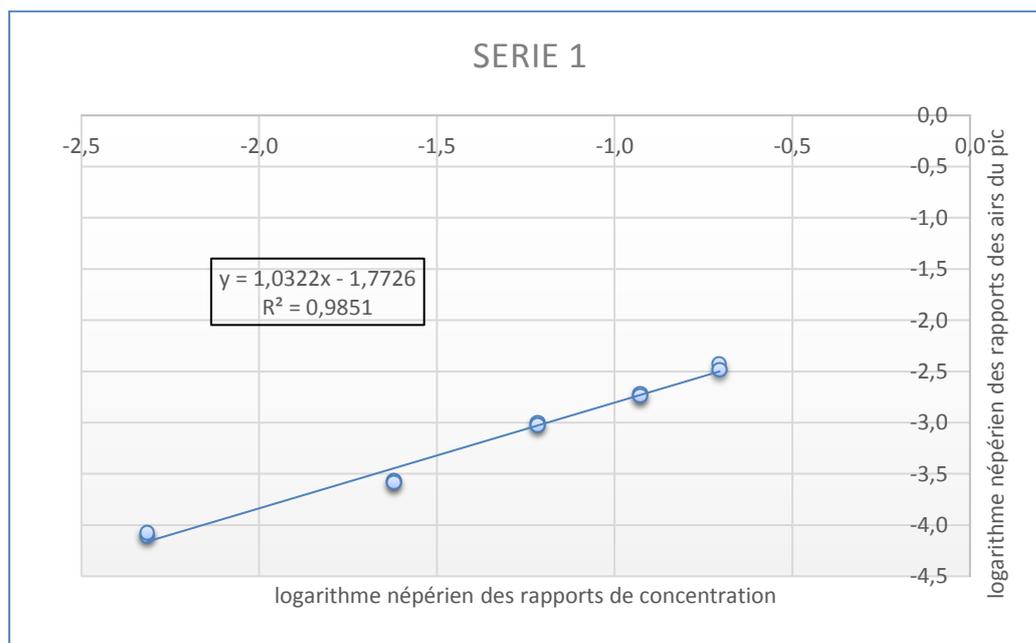


Figure 30 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 1).

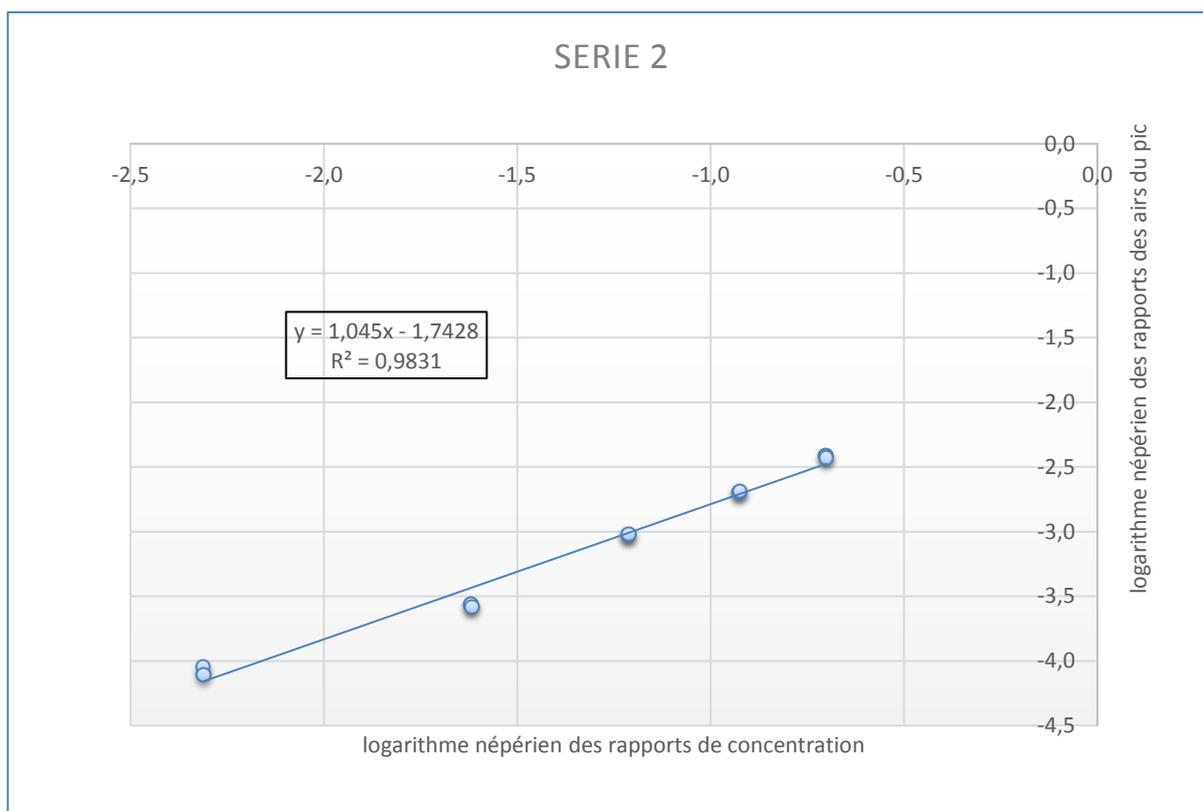


Figure 31 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$
(Série 2)

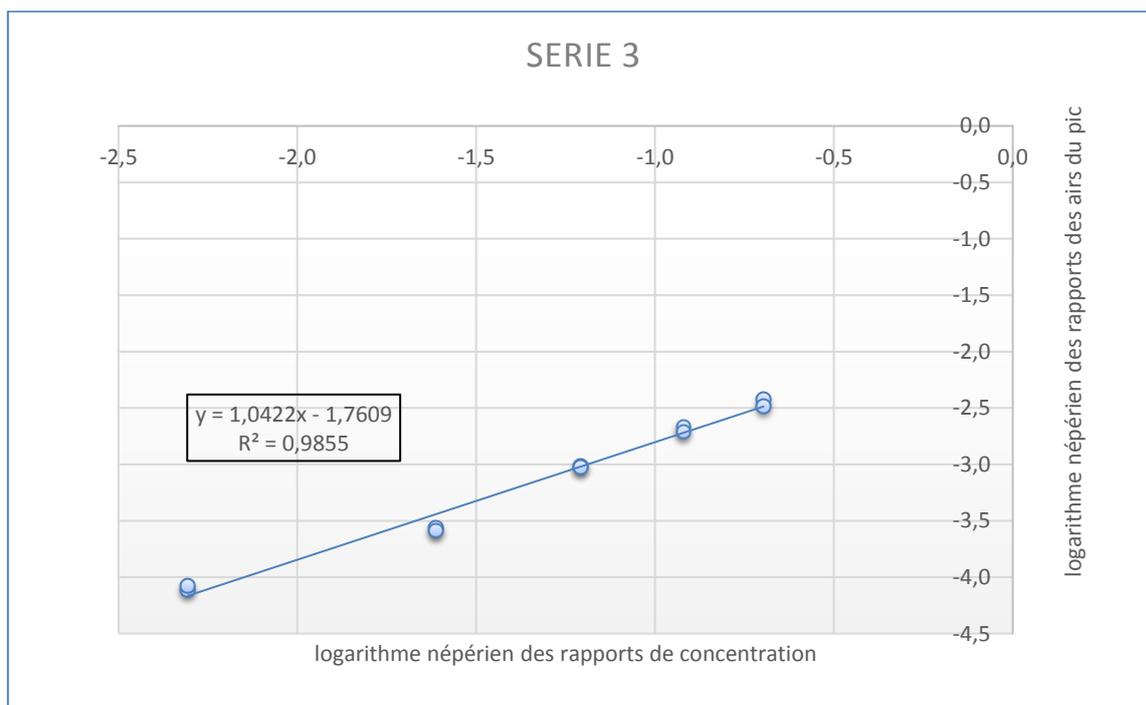


Figure 32 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$
(Série 3).

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

TABLEAU XX : Résultats du Fluconazole obtenus avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (sans matrice)

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		$\sqrt{(X_x/X_{EI})}$	$\sqrt{(Y_x/Y_{EI})}$	$\sqrt{(X_x/X_{EI})}$	$\sqrt{(Y_x/Y_{EI})}$	$\sqrt{(X_x/X_{EI})}$	$\sqrt{(Y_x/Y_{EI})}$
20mg/L	1	0,314	0,13	0,315	0,13	0,316	0,13
	2	0,314	0,13	0,315	0,13	0,316	0,13
40mg/L	1	0,445	0,17	0,445	0,17	0,446	0,17
	2	0,445	0,17	0,446	0,17	0,446	0,17
60mg/L	1	0,545	0,22	0,545	0,22	0,547	0,22
	2	0,545	0,22	0,546	0,22	0,547	0,22
80mg/L	1	0,629	0,26	0,630	0,26	0,631	0,26
	2	0,629	0,25	0,630	0,26	0,631	0,26
100mg/L	1	0,703	0,30	0,704	0,30	0,706	0,30
	2	0,703	0,29	0,704	0,30	0,706	0,29
<i>Pente</i>		0,4287	<i>Pente</i>	0,4395	<i>Pente</i>		0,4321
<i>Ordonnée à l'origine</i>		-0,0126	<i>Ordonnée à l'origine</i>	-0,0167	<i>Ordonnée à l'origine</i>		-0,0144

Les courbes d'étalonnage du Fluconazole obtenues avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ pour les séries 1 , 2 et 3 sont représentés dans les figures 33 , 32 et 34 respectivement :

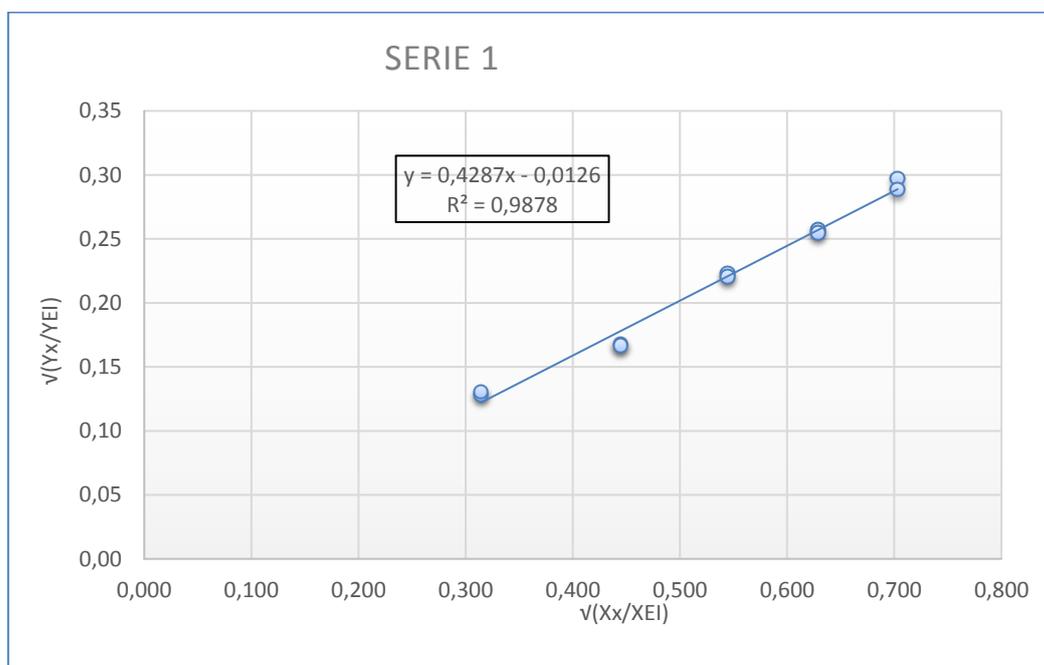


Figure 33 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 1).

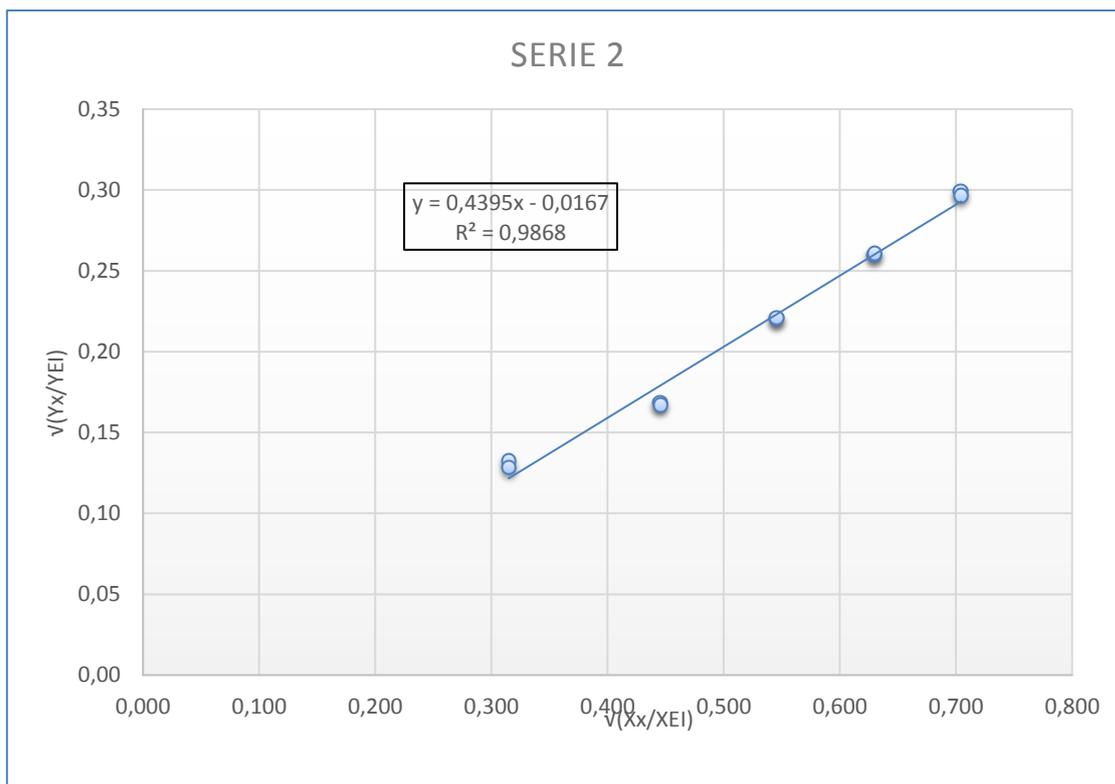


Figure 34 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 2).

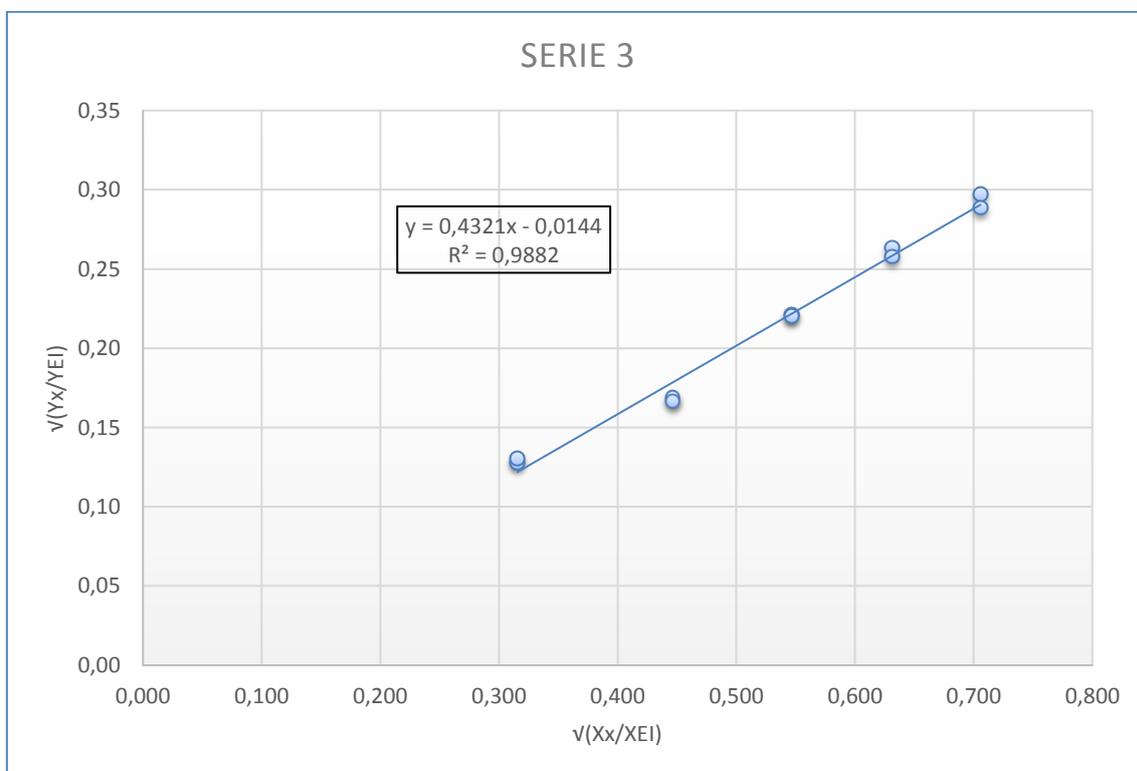


Figure 35 : Courbe d'étalonnage du Fluconazole obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 3).

1.7. Profils d'exactitude obtenus

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

TABLEAU XXI : Profils d'exactitude obtenus pour le Fluconazole.

Fonction de réponse	Profils d'exactitude	Intervalle de dosage (mg/L)	Paramètres de validation
$y = bx + a$		[25 – 100]	$\lambda = \pm 15\%$ $\beta = 85\%$
$y = bx$		[65 – 100]	$\lambda = \pm 15\%$ $\beta = 85\%$

$\ln y = f(\ln x)$		Non valide	$\lambda = \pm 15\%$ $\beta = 85\%$
$\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$		[60 – 100]	$\lambda = \pm 15\%$ $\beta = 85\%$

1.8. Choix de la fonction de réponse

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

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

On a comparé les profils d'exactitudes obtenus pour le Fluconazole des quatre modèles de fonctions de réponses.

La fonction de réponse qui répond le mieux à ses critères est : $y = \mathbf{bx} + \mathbf{a}$ et elle sera choisie comme modèle d'étalonnage pour notre méthode.

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

1.9. Alignement des observations

L'alignement des réponses sur la moyenne des concentrations introduites est exigé et cela pour chaque niveau de concentration lorsque les quantités introduites ne sont pas identiques.

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

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant (Tableau XXII) :

TABLEAU XXII : tableau d'alignement des réponses observées des trois séries de validations du Fluconazole

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)								
		1			2			3		
		Concentration introduite (X _x /X _{EI})	Réponses instrumentales (Y _x /Y _{EI})	Réponses alignées (Y _x /Y _{EI})	Concentration introduite (X _x /X _{EI})	Réponses instrumentales (Y _x /Y _{EI})	Réponses alignées (Y _x /Y _{EI})	Concentration introduite (X _x /X _{EI})	Réponses instrumentales (Y _x /Y _{EI})	Réponses alignées (Y _x /Y _{EI})
20mg/L	1	0,099	0,018	0,018	0,099	0,019	0,019	0,100	0,015	0,015
	2	0,099	0,016	0,016	0,100	0,020	0,020	0,100	0,015	0,015
	3	0,100	0,016	0,016	0,100	0,014	0,014	0,100	0,016	0,016
40mg/L	1	0,198	0,028	0,028	0,199	0,028	0,028	0,200	0,027	0,027
	2	0,198	0,028	0,028	0,199	0,027	0,028	0,201	0,027	0,027
	3	0,199	0,027	0,027	0,200	0,027	0,027	0,199	0,029	0,029
60mg/L	1	0,297	0,050	0,050	0,298	0,049	0,050	0,300	0,050	0,050
	2	0,297	0,050	0,050	0,299	0,049	0,049	0,301	0,050	0,049
	3	0,299	0,038	0,038	0,300	0,049	0,049	0,299	0,049	0,049
80mg/L	1	0,396	0,067	0,067	0,398	0,066	0,066	0,400	0,068	0,068
	2	0,396	0,068	0,068	0,398	0,068	0,068	0,401	0,058	0,058
	3	0,398	0,068	0,068	0,400	0,067	0,066	0,399	0,066	0,067
100mg/L	1	0,495	0,085	0,086	0,497	0,090	0,090	0,500	0,082	0,082
	2	0,494	0,074	0,075	0,498	0,085	0,085	0,502	0,082	0,082
	3	0,498	0,073	0,073	0,500	0,085	0,085	0,498	0,084	0,084

1.10. Prédiction inverses

Les concentrations prédites à partir des réponses alignées sont représentées pour chaque prise d'essai dans le tableau ci-dessous (Tableau XXIII) :

TABLEAU XXIII : Concentrations calculées par prédiction inverse pour le Fluconazole.

Niveaux	Répétition	Série 1		Série 2		Série 3	
		Réponses alignées (Y _x /Y _{EI})	Prédictions inverses (X _x /X _{EI})	Réponses alignées (Y _x /Y _{EI})	Prédictions inverses (X _x /X _{EI})	Réponses alignées (Y _x /Y _{EI})	Prédictions inverses (X _x /X _{EI})
20mg/L	1	0,02	0,02	0,120	0,02	0,02	0,128
	2	0,02	0,02	0,112	0,02	0,02	0,135
	3	0,02	0,02	0,108	0,01	0,01	0,103
40mg/L	1	0,03	0,03	0,178	0,03	0,03	0,176
	2	0,03	0,03	0,177	0,03	0,03	0,176
	3	0,03	0,03	0,174	0,03	0,03	0,173
60mg/L	1	0,05	0,05	0,300	0,05	0,05	0,295
	2	0,05	0,05	0,301	0,05	0,05	0,293
	3	0,04	0,04	0,236	0,05	0,05	0,290
80mg/L	1	0,07	0,07	0,397	0,07	0,07	0,385
	2	0,07	0,07	0,406	0,07	0,07	0,393
	3	0,07	0,07	0,404	0,07	0,07	0,385
100mg/L	1	0,09	0,09	0,502	0,09	0,09	0,513
	2	0,07	0,07	0,440	0,09	0,09	0,489
	3	0,07	0,07	0,430	0,08	0,09	0,486

1.11. Justesse

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

TABLEAU XXIV : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration pour le Fluconazole.

Niveau de concentration	20mg/L	40mg/L	60mg/L	80mg/L	100mg/L
Moyenne des Concentrations introduites (mg/L)	20,09	40,18	60,27	80,36	100,45
Moyenne des Concentrations calculées (mg/L)	23,11	35,53	58,53	78,77	96,73
Biais absolu	3,022	-4,651	-1,742	-1,592	-3,725
Biais relatif (%)	15,04	-11,58	-2,89	-1,98	-3,71
Taux de recouvrement (%)	115,04	88,42	97,11	98,02	96,29

1.12. Fidélité

La fidélité est évaluée pour chaque niveau de concentration, elle est calculée par les écarts types et les coefficients de variation qui estiment la répétabilité et la fidélité intermédiaire.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU XXV : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration pour le Fluconazole.

Niveaux de Concentrations (mg/L)	20,00	40,00	60,00	80,00	100,00
Moyenne des Concentrations introduites (mg/L)	20,09	40,18	60,27	80,36	100,45
Concentration moyenne retrouvé (mg/L)	23,11	35,53	58,53	78,77	96,73
SCE résiduelle	0,00063	0,00008	0,00280	0,00183	0,00361
SCE totale	0,00093	0,00009	0,00345	0,00249	0,00600
SCE inter séries	0,00029	0,00001	0,00064	0,00066	0,00239
Ecart type de répétabilité	0,01027	0,00371	0,02162	0,01746	0,02453
Ecart type inter séries	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Ecart type de fidélité intermédiaire	0,01027	0,00371	0,02162	0,01746	0,02453
CV de répétabilité	8,967	2,106	7,449	4,471	5,116
CV de fidélité intermédiaire	8,967	2,106	7,449	4,471	5,116

1.13. Exactitude

A partir des concentrations prédites, on peut calculer l'exactitude relative par rapport à la concentration introduite.

Le tableau suivant (XXVI) résume les résultats obtenu

TABLEAU XXVI : Résultats du calcul de l'exactitude relative pour le Fluconazole.

Niveaux %	Répétitions	Séries (Jour)								
		1			2			3		
		Concentration introduite (X_x/X_{EI})	Concentration prédite (X_x/X_{EI})	Exactitude relative (%)	Concentration introduite (X_x/X_{EI})	Concentration prédite (X_x/X_{EI})	Exactitude relative (%)	Concentration introduite (X_x/X_{EI})	Concentration prédite (X_x/X_{EI})	Exactitude relative (%)
20mg/L	1	0,099	0,120	-17,58	0,10	0,128	-22,26	0,10	0,106	-5,31
	2	0,099	0,112	-11,77	0,10	0,135	-26,22	0,10	0,108	-7,38
	3	0,100	0,108	-8,11	0,10	0,103	-3,28	0,10	0,111	-9,88
40mg/L	1	0,198	0,178	11,39	0,20	0,176	12,73	0,20	0,174	14,73
	2	0,198	0,177	12,02	0,20	0,176	13,34	0,20	0,173	15,73
	3	0,199	0,174	14,30	0,20	0,173	15,65	0,20	0,184	8,28
60mg/L	1	0,297	0,300	-1,01	0,30	0,295	1,15	0,30	0,302	-0,47
	2	0,297	0,301	-1,28	0,30	0,293	1,76	0,30	0,299	0,78
	3	0,299	0,236	26,67	0,30	0,290	3,37	0,30	0,296	0,85
80mg/L	1	0,396	0,397	-0,18	0,40	0,385	3,36	0,40	0,403	-0,65
	2	0,396	0,406	-2,52	0,40	0,393	1,34	0,40	0,348	15,34
	3	0,398	0,404	-1,43	0,40	0,385	3,76	0,40	0,394	1,10
100mg/L	1	0,495	0,502	-1,45	0,50	0,513	-3,07	0,50	0,478	4,60
	2	0,494	0,440	12,36	0,50	0,489	1,68	0,50	0,482	4,08
	3	0,498	0,430	15,69	0,50	0,486	2,74	0,50	0,494	0,84

1.14. Erreur totale et profil d'erreur totale

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

TABLEAU XXVII : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration du Fluconazole.

Niveau (mg/L)	20,00	40,00	60,00	80,00	100,00
Moyenne des concentrations théoriques (mg/L)	23,11	35,53	58,53	78,77	96,73
Biais relatif (%)	15,044	-11,576	-2,891	-1,981	-3,709
Biais relatif en valeur absolue	15,044	11,576	2,891	1,981	3,709
Coefficient de variation de fidélité intermédiaire (%)	8,967	2,106	7,449	4,471	5,116
Erreur totale (%)	24,011	13,682	10,340	6,452	8,824

Le profil d'erreur totale du Fluconazole est représenté par la courbe ci-dessous (Figure 36) :

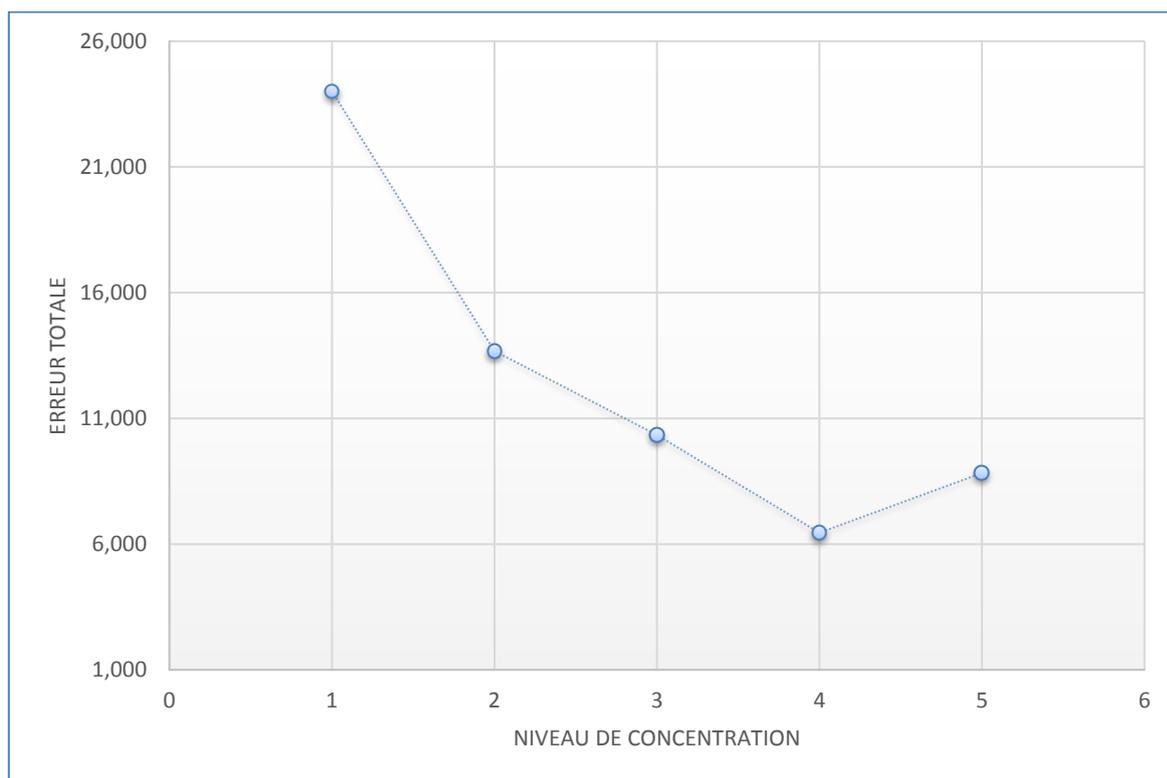


Figure 36 : Profil d'erreur totale du Fluconazole.

1.15. Intervalle de tolérance

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

TABLEAU XXVIII : Limites de tolérance du Fluconazole.

Niveau de concentration (mg/L)	20,00	40,00	60,00	80,00	100,00
Limite intervalle tolérance basse (%)	-0,49	-14,38	-13,78	-8,58	-11,13
Limite intervalle tolérance haute (%)	30,58	-8,77	8,00	4,62	3,71

1.16. Profil d'exactitude

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

Le profil d'exactitude obtenu en utilisant la fonction choisie est représenté dans la figure ci-dessous (Figure37) :

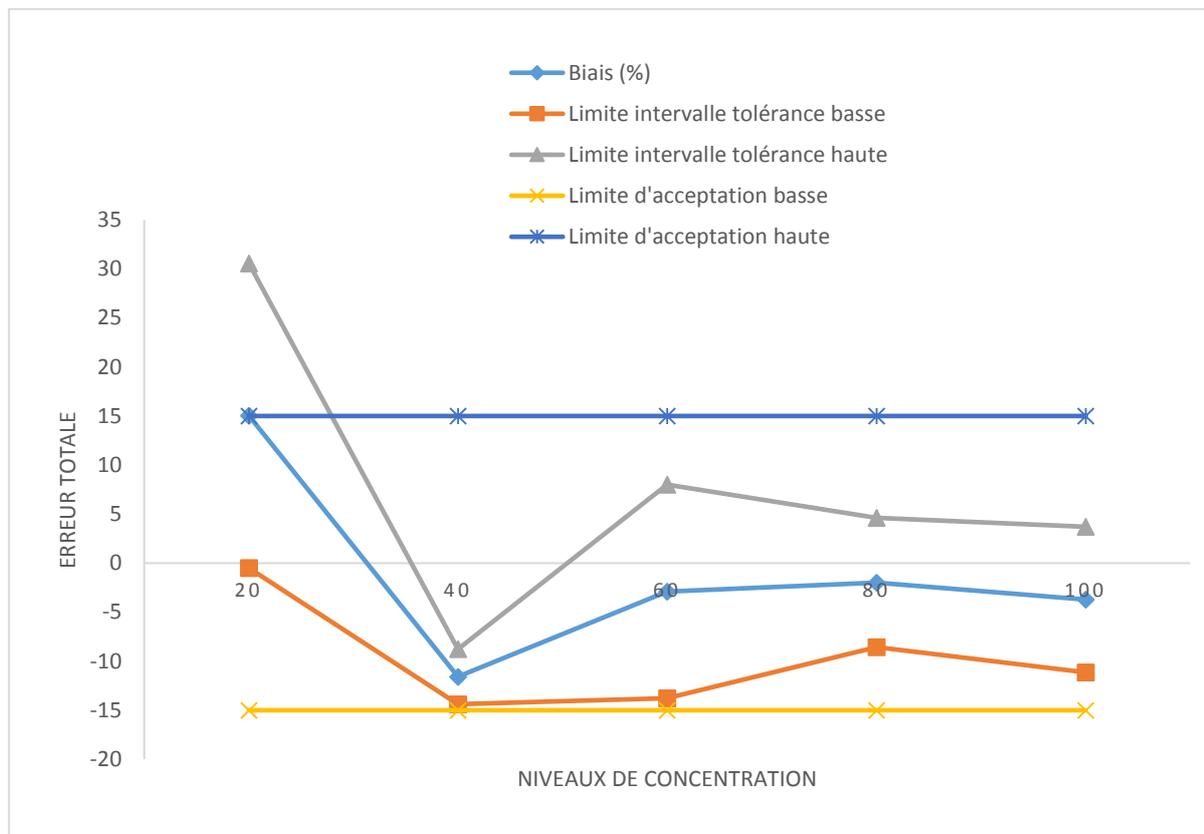


Figure 37 : Profil d'exactitude du Fluconazole ($\beta = 85\%$ et $\lambda = 15\%$).

1.17. Linéarité

La linéarité définie comme étant l'existence de la proportionnalité entre les résultats obtenus et les concentrations prédites.

Son calcul nécessite différents paramètres qui nous permettent de tracer des droites de régression linéaire de la concentration prédite en fonction de la concentration introduite.

Droite de linéarité entre la concentration prédite en fonction de la concentration introduite du Fluconazole est représentée dans la figure 38 :

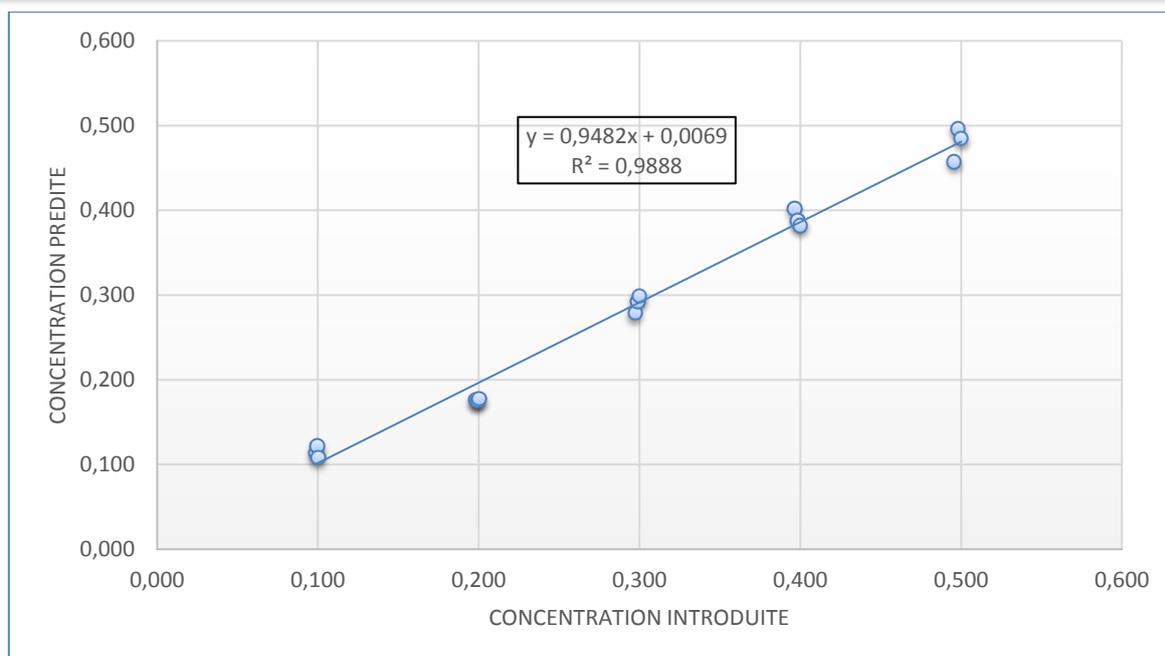


Figure 38 : Droite de linéarité entre la concentration prédite en fonction de la concentration introduite du Fluconazole.

La linéarité de la concentration prédite est évaluée statistiquement en comparant la pente avec 01 et l'ordonnée à l'origine avec 0

Évaluation statistique de la linéarité du Fluconazole est représenté dans le tableau ci-dessous (Tableau XXIX) :

TABLEAU XXIX : Évaluation statistique de la linéarité du Fluconazole.

Pente	0,9482
Ordonnée à l'origine	0,0069
Erreur pente	0,0280
Erreur ordonnée à l'origine	0,0092

La comparaison de la pente avec 01 et de l'ordonnée à l'origine avec 0 est représentée dans le tableau ci-dessous (Tableau XXX) :

TABLEAU XXX : Comparaison de la pente avec 01 et de l'ordonnée à l'origine avec 0

Comparaison de la pente avec 01	<i>t</i> calculé	1,85	Différence non significative
	$t^{\circ}(\alpha ; 13)$	2,16	
	<i>Condition</i>	$t \text{ calculé} < t^{\circ}(\alpha ; 13)$	
Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0	<i>t</i> calculé	0,74	Différence non significative
	$t^{\circ}(\alpha ; 13)$	2,16	
	<i>Condition</i>	$t \text{ calculé} < t^{\circ}(\alpha ; 13)$	

1.18. Limites de quantification

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

A partir du profil d'exactitude du Fluconazole on constate qu'il y a un seul point d'intersection entre la limite haute de tolérance et la limite haute d'acceptabilité, et ceci, entre le niveau de plus basse concentration (20 mg/L) et le niveau supérieur (40 mg/L), donc nous pouvons considérer la limite de quantification supérieure comme étant la plus haute concentration étudiée (100 mg/L), et la limite de quantification inférieure sera calculée comme suit :

TABLEAU XXXI : Calcul des limites de quantification

	Niveau A (10 mg/L)	Niveau B (15 mg/L)
<i>Concentration moyenne théorique</i>	0,10	0,20
<i>Limite intervalle tolérance critique</i>	0,130059549	0,181729792
<i>Limite d'acceptabilité critique</i>	0,11	0,23
<i>Droite</i>	Pente	Origine
<i>Intervalle tolérance (U)</i>	0,518765585	0,078389306
<i>Limite d'acceptabilité CRITIQUE</i>	1,15	0,00000
<i>Limite de quantification BASSE</i>	0,12	
<i>Limite de quantification BASSE (mg/l)</i>	25,05	

✓ Pour le Fluconazole, les limites de quantification sont : **[25,05 ; 100] mg/L.**

2. Discussion

2.1. Résolution

La résolution calculée $R_s = 8$; elle est largement supérieure à 1,5 ce qui traduit une très bonne séparation des pics des deux molécules : Fluconazole et Métronidazole.

Ceci permet donc de faire un dosage du Fluconazole avec l'utilisation du Métronidazole comme étalon interne par Chromatographie Liquide à Haute Performance.

2.2. Sélectivité et effet matrice

Après la confirmation des temps de rétention du Fluconazole et du Métronidazole en injectant leurs standards séparément, on est passées à l'étude de la sélectivité par deux méthodes :

A. Comparaison des chromatogrammes

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

- ✓ L'absence des pics aux temps de rétention des deux molécules (Fluconazole et Métronidazole) dans les chromatogrammes obtenus à partir des solutions du diluant et du plasma non chargé ;
- ✓ Les temps de rétention correspondants au Fluconazole et au métronidazole obtenus sur les chromatogrammes du standard d'étalonnage et du standard de validation d'un même niveau de concentration sont comparables.

B. Comparaison des deux pentes a_1 et a_2 , et des deux ordonnées à l'origine b_1 et b_2

D'après ce qu'illustre le tableau (XXXII) on conclut que :

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

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

TABLEAU XXXII : Signification des résultats des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine entre elles pour le Fluconazole

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

On peut déduire qu'avec un risque de 5%, la méthode n'a ni d'effet matrice, ni d'erreur systématique, elle est donc statistiquement sélective.

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

2.3. Choix de la fonction de réponse

D'après les profils d'exactitude élucidés, on constate que le modèle qui convient le plus à notre méthode est le modèle de régression linéaire avec la fonction $y = bx + a$: un étalonnage sans matrice (PA seul).

Le choix de ce modèle est basé sur :

- Son intervalle de dosage étendu ;
- Sa facilité d'utilisation et de calcul ;
- Son intervalle de tolérance étroit.

Contrairement au modèle logarithmique présentant un intervalle de dosage non valide, et aux modèles racine carré et $y = bx$ (droite passant par l'origine) dont l'intervalle de dosage est non étendu.

2.4. Fidélité

Etant donné que les coefficients de variation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire des niveaux de concentration inclus dans l'intervalle [25,05-100] mg/L sont inférieurs à 15% pour le Fluconazole, le degré de dispersion des concentrations prédites obtenues est assez étroit pour tous les niveaux, la méthode est donc fidèle.

Le CV maximal de fidélité intermédiaire a atteint 8,967% pour le Fluconazole (niveau 20 mg/L) expliqué par l'augmentation de la dispersion des résultats en allant vers les concentrations les plus faibles.

Cependant ces estimations de la fidélité et de la justesse ne sont pas une fin en soi, elles ne permettent pas de prendre une décision quant à la validité de la méthode.

Elles servent par contre à la construction du profil d'exactitude utilisé pour l'interprétation des résultats, elles sont donc une étape intermédiaire obligatoire pour pouvoir évaluer si la procédure analytique va vraisemblablement pouvoir ou non quantifier avec une exactitude suffisante chacune des quantités inconnues.

2.5. Erreur totale

Selon les profils d'erreur totale élucidés dans la figure (36) on peut conclure que **4 niveaux** de concentration de Fluconazole sont inclus dans l'intervalle de validité, vu qu'ils présentent des erreurs totales relatives acceptables ne dépassant pas les limites d'acceptabilité prédéfinies (15%) avec une erreur maximale de 24,011% pour le Fluconazole, observée pour le plus faible niveau de concentration (20 mg/L) expliquant la non validité de la méthode à ce niveau.

2.6. Profil d'exactitude

En se référant aux résultats obtenus dans la figure (37) pour le Fluconazole, on considère que la méthode utilisée dans ce présent travail est valide sur l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation, son domaine de validité est donc compris dans

l'intervalle de concentrations [25.05 ; 100] mg/L. En tenant compte de la limite d'acceptabilité $\lambda = \pm 15\%$ et de la probabilité de confiance $\beta = 85\%$.

Cela signifie que l'analyste peut garantir que la méthode est capable de produire une proportion de 85% des résultats acceptables et seulement 15% des futures mesures d'échantillons inconnus peuvent être en dehors de ces limites.

2.7. Limites de quantification et intervalle de dosage

La méthode est considérée valide dans l'intervalle [25.05 ; 100] mg/L pour lequel le profil d'exactitude est inclus dans les limites d'acceptation choisies [-15% ; +15%], incluant ainsi l'intervalle thérapeutique du Fluconazole [32-64] mg/L.

2.8. Justesse

L'accord entre la valeur de la concentration moyenne prédite, obtenue à partir des trois séries de validation, et la valeur de la moyenne des concentrations introduites considérée comme étant la valeur de référence est assez étroit pour les niveaux de concentration inclus dans l'intervalle de quantification [25,05 ; 100] mg/L, en tenant compte que les biais relatifs (en valeur absolue) de ces derniers sont largement inférieurs à 15% confirmant la justesse de notre méthode.

Les biais relatifs obtenus pour chaque concentration sont :

- -11,58 % pour 40 mg/L ;
- -2,89 % pour 60 mg/L ;
- -1,98 % pour 80 mg/L ;
- -3,71 % pour 100 mg/L.

Pour le niveau de concentration 20 mg/L le biais relatif est de 15.04 % dépassant 15% et ceci est expliqué par le fait que la quantité de substance à ce niveau est faible, ce qui augmente l'erreur de mesure.

Cette concentration ne fait pas partie de l'intervalle thérapeutique du Fluconazole qui est de [32-64] mg/L.

2.9. Linéarité de la concentration prédite

La linéarité a été évaluée à partir de cinq niveaux de concentration [20 ; 40 ; 60 ; 80 ; 100]mg/L avec trois répétitions indépendantes pour chaque niveau de concentration.

La droite de régression linéaire obtenue pour le Fluconazole est sous forme $y = 0,9482x + 0,0069$ où :

- 0,9482 représente la pente de la droite ;

- 0,0069 représente l'ordonnée à l'origine.

Avec un coefficient de détermination R^2 de 0,9888 signifiant ainsi que la variabilité totale de la concentration prédite est expliquée à 98,88% par la variabilité de la concentration introduite de l'échantillon.

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

L'étude statistique de la linéarité pour le Fluconazole, illustrée par le tableau (XXIX), a confirmé que la pente est statistiquement non différente de 1 et que l'ordonnée à l'origine est comparable statistiquement avec 0 ce qui prouve la validité de la régression et de la linéarité.

3. Comparaison avec une autre étude

L'article intitulé « Fluconazole Plasma Concentration Measurement By Liquid Chromatography For Drug Monitoring Of Burn Patients » rédigé par Silvia Regina Cavani Jorge Santos, Edvaldo Vieira Campos, Cristina Sanches, David Souza Gomez, Marcus Castro Ferreira et publié en 2010 dont l'objectif est de décrire une étude visant à développer une méthode analytique simple pour le suivi thérapeutique du Fluconazole par HPLC chez les grands brûlés.

Cette procédure analytique a été validée pour les paramètres analytiques suivants : spécificité, linéarité, limites de quantification, limite de détection, exactitude, fidélité, taux de recouvrement, stabilité et robustesse.

Ces paramètres ont été validés selon les exigences de la FDA.

Il a été rapporté que cette procédure a été utilisée avec succès pour le suivi thérapeutique des grands brûlés

Les conditions de cette étude sont résumées dans le tableau XXXIII

TABLEAU XXXIII : Les conditions de l'étude

Etalon interne	Carbamazépine
Diluant	Fluconazole : eau pure Carbamazépine : Méthanol
Extraction	Solvants : NaOH, Dichlorométhane Centrifugation : 3000 tr/min pendant 30 min Séchage : au bain d'azote puis bain d'eau sous flux azoté
Analyse chromatographique	Appareillage : HPLC Shimadzu, détection UV-Visible, colonne C18 Phase mobile : Eau pure/Acétonitrile (60/40) (v/v), pH 5.0 Débit : 0.5 mL/min Temps d'analyse : 15 min λ : 210 nm

- **Tableau comparatif**

TABLEAU XXXIV : Tableau comparatif entre deux études

Paramètres	Etude	Notre étude
Intervalle de dosage	0.4 - 100 µg/mL	25,05 - 100 µg/mL
Taux de recouvrement	$r^2 = 0.998$	$r^2 = 0.9888$
Fidélité	90.0 µg/mL (CV = 1,44%) 50.0 µg/mL (CV = 4,60%) 1.2 µg/mL (CV = 3,21%)	40.0 µg/mL (CV=2,106%) 60.0 µg/mL (CV=7,449%) 80.0 µg/mL (CV= 4,471%) 100.0 µg/mL (CV=5,116%)
Fidélité intermédiaire	90.0 µg/mL (CV = 0,99%) 50.0 µg/mL (CV = 1,51%) 1.2 µg/mL (CV = 0,74%)	40.0µg /mL (CV=2,106%) 60.0µg/mL (CV=7,449%) 80.0µg /mL (CV= 4,471%) 100.0µg /mL (CV=5,116%)
Justesse	90.0 µg/mL (98,1 – 100,1%) 50.0 µg/mL (92.,6 – 95,8%) 1.2 µg/mL (101,3 – 107,5%)	40.0µg /mL (88,42%) 60.0µg/mL (97,11%) 80.0µg /mL (98,02%) 100.0µg /mL (96,29%)

- **Commentaires**

Les résultats obtenus par notre méthode sont assez comparables à celle publiée dans cet article.

Toutefois, la démarche statistique suivie est différente, au lieu de traiter chaque paramètre seul, nous avons utilisé le profil d'exactitude, ceci étant très bénéfique vu qu'il facilite la prise des décisions.

Le Profil d'exactitude, qui intègre de façon statistiquement correcte dans un seul graphique l'ensemble des éléments essentiels de la validation, à savoir le biais, la fidélité, le risque et les limites de quantification, son emploi nous a permis non seulement de simplifier l'approche de la validation de notre méthode mais aussi de contrôler le risque associé à son utilisation en calculant tous les paramètres de validation et divers critères complémentaires comme la limite de quantification.

Conclusion

Conclusion

Le suivi thérapeutique pharmacologique vise à assurer une efficacité thérapeutique et une sécurité garantie pour le patient, il repose sur la mesure de la concentration sanguine d'un médicament après son administration dans le but d'adapter individuellement la posologie. Cette approche repose sur le principe que, pour certains médicaments, les effets sont directement reliés à leur concentration et que la concentration obtenue chez un sujet donné n'est pas prévisible en raison d'une variabilité pharmacocinétique individuelle, dans ce contexte, on a toujours recours à des méthodes de dosage analytiques qui doivent être validées.

La validation des méthodes analytiques est un élément crucial, elle a pour but de démontrer l'aptitude et la fiabilité de la méthode vis-à-vis des référentiels opposables, garantissant ainsi que chaque mesure qui sera réalisée ultérieurement en routine sera suffisamment proche de la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable, en fonction de la finalité de la procédure.

Le but de notre étude a été de développer, d'optimiser puis de valider une nouvelle méthode analytique par chromatographie liquide à haute performance assurant ceci, en utilisant le profil d'exactitude qui est une démarche récente proposée par la commission de la SFSTP publiée en 2003 dans la revue STP Pharma Pratique. Cette méthode sera par la suite utilisée pour l'adaptation posologique chez les patients nécessitant un suivi thérapeutique.

En premier lieu, nous avons évalué la sélectivité de la méthode analytique. En second lieu nous avons évalué la fidélité et la justesse de cette dernière à partir des standards d'étalonnage et des standards de validation. Nous avons utilisé ces derniers pour estimer les paramètres statistiques des différents modèles d'étalonnage afin de construire le profil d'exactitude afin de choisir la fonction de réponse la plus adéquate pour notre méthode.

Notre expérience a satisfait tous les critères du profil d'exactitude et compte tenu du haut niveau de fiabilité des résultats obtenus, elle a clairement démontré la validité de la méthode utilisée. Cette dernière a été évaluée dans des intervalles de tolérance incluant des limites d'acceptabilité ($\pm 15\%$), une probabilité de confiance $\beta=85\%$. Il s'ensuit que la méthode de dosage est valide dans l'intervalle [25,05-100] mg/L qui inclus l'intervalle thérapeutique du Fluconazole [32-64] mg/L permettant ainsi le suivi thérapeutique et les dosages sanguins des patients traités.

Enfin, l'étude du profil d'exactitude des méthodes de dosage est une approche pertinente qui s'impose de manière progressive vu son utilité à évaluer la performance des méthodes de dosage.

Conclusion

En raison de la durée limitée de l'étude, certains critères de validation n'ont pas été évalués, de ce fait, pour compléter cette étude nous recommandons de :

- Etudier la robustesse et la stabilité des échantillons ;
- Etablir un système de contrôle qualité pour l'utilisation en routine ;
- Définir les conditions pré-analytiques : l'anticoagulant à utiliser, les conditions d'acheminement et le moment du prélèvement.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

1. Blanchet, B., et al., *Suivi thérapeutique des médicaments antifongiques*. 2004. **2004**(365): p. 39-47.
2. Arling, E., *Beyond GMPs: The latest approaches to good manufacturing practices*. 2004.
3. UAKASS, Y., *Les approches de validation de procédés de fabrication et leurs applications sur les formes sèches orales*. 2016.
4. Santos, S.R.C.J., et al., *Fluconazole plasma concentration measurement by liquid chromatography for drug monitoring of burn patients*. 2010. **65**: p. 237-243.
5. Hollier, L.M., S.M.J.I.D.i.O. Cox, and Gynecology, *Fluconazole (Diflucan®)*. 1996. **3**(6): p. 222-225.
6. Européenne, P.J.V.é., Strasbourg, Germany, *Pharmacopée Européenne*. 2005.
7. Corrêa, J.C.R. and H.R.N.J.C.r.i.a.c. Salgado, *Review of fluconazole properties and analytical methods for its determination*. 2011. **41**(2): p. 124-132.
8. Blokhina, S., et al., *Experimental investigation of fluconazole: Equilibrium solubility and sublimation*. 2020. **151**: p. 106243.
9. Debruyne, D. and J.-P.J.C.p. Ryckelynck, *Clinical pharmacokinetics of fluconazole*. 1993. **24**(1): p. 10-27.
10. Cousin, L., et al., *Dosing guidelines for fluconazole in patients with renal failure*. 2003. **18**(11): p. 2227-2231.
11. Sheehan, D.J., C.A. Hitchcock, and C.M.J.C.m.r. Sibley, *Current and emerging azole antifungal agents*. 1999. **12**(1): p. 40-79.
12. Pfaller, M., D. Diekema, and D.J.C.m.r. Sheehan, *Interpretive breakpoints for fluconazole and Candida revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing*. 2006. **19**(2): p. 435-447.
13. Sinnollareddy, M., et al., *Pharmacokinetic evaluation of fluconazole in critically ill patients*. 2011. **7**(11): p. 1431-1440.
14. Patel, K., et al., *Population pharmacokinetics of fluconazole in critically ill patients receiving continuous venovenous hemodiafiltration: using Monte Carlo simulations to predict doses for specified pharmacodynamic targets*. 2011. **55**(12): p. 5868-5873.
15. Jullien, V.J.A.d.P., *Pharmacocinétique et pharmacodynamie des antifongiques en pédiatrie*. 2011. **18**: p. S42-S47.
16. Dekkers, B., et al., *Invasive candidiasis in the elderly: considerations for drug therapy*. 2018. **35**(9): p. 781-789.
17. Damase-Michel, C., et al., *Médicaments et allaitement maternel*. 2004. **1**(5): p. 417-432.
18. Abe, F., K. Usui, and T.J.B. Hiraki, *Fluconazole modulates membrane rigidity, heterogeneity, and water penetration into the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae**. 2009. **48**(36): p. 8494-8504.
19. Hitchcock, C.A., et al., *Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P-450-dependent 14 α -sterol demethylase purified from *Candida albicans**. 1990. **266**(2): p. 475-480.
20. Lockhart, S.R.J.F.G. and Biology, *Candida auris and multidrug resistance: Defining the new normal*. 2019. **131**: p. 103243.
21. Pinel, B., T. Cassou-Mounat, and R.J.C.R.J.d.l.S.F.d.R.O. Bensadoun, *Oropharyngeal candidiasis and radiotherapy*. 2012. **16**(3): p. 222-229.

BIBLIOGRAPHIE

22. Montero-Gei, F.J.A.o.m.r., *Fluconazole: pharmacokinetics and indications*. 1993. **24**(4): p. 377-385.
23. Govindarajan, A., et al., *Fluconazole*, in *StatPearls [Internet]*. 2021, StatPearls Publishing.
24. Matsumoto, K., et al., *Fluconazole-induced convulsions at serum trough concentrations of approximately 80 µg/mL*. 2000. **22**(5): p. 635-636.
25. Grant, S.M. and S.P.J.D. Clissold, *Fluconazole*. 1990. **39**(6): p. 877-916.
26. Food and D. Administration, *DIFLUCAN®(Fluconazole Tablets)(Fluconazole for Oral Suspension)[displayed 2 March 2015]*.
27. Vensel, T.D.H.J.P.c.u.f.o.g., *Fluconazole: a valuable fungistatic*. 2002. **9**(5): p. 181-183.
28. Bienvenua, A.-L. and S. Picota, *Dochead fiche Sous-dochead dermatologie*. 2015.
29. Hypoglycemics, O., *Fluconazole for Oral Suspension USP*.
30. da Silva, C.R., et al., *Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on Candida tropicalis resistant to fluconazole*. 2013. **57**(4): p. 1691-1700.
31. Lazar, J.D. and K.D.J.R.o.I.D. Wilner, *Drug interactions with fluconazole*. 1990. **12**(Supplement_3): p. S327-S333.
32. Niwa, T., et al., *Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP) 2C9, CYP2C19, and CYP3A4 activities in human liver microsomes*. 2005. **28**(9): p. 1805-1808.
33. Gubbins, P.O. and S.J.M. Heldenbrand, *Clinically relevant drug interactions of current antifungal agents*. 2010. **53**(2): p. 95-113.
34. Panackal, A., et al., *Signification clinique de la résistance croisée aux antifongiques azolés chez Candida glabrata*. 2007. **17**: p. S16-S21.
35. Bennett, J.E., et al., *Mechanism of increased fluconazole resistance in Candida glabrata during prophylaxis*. 2004. **48**(5): p. 1773-1777.
36. Sanguinetti, M., et al., *Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of Candida glabrata collected during a hospital survey of antifungal resistance*. 2005. **49**(2): p. 668-679.
37. Zhang, Z., et al., *The safety of oral fluconazole during the first trimester of pregnancy: a systematic review and meta-analysis*. 2019. **126**(13): p. 1546-1552.
38. Zervos, M. and F.J.I.j.o.a.a. Meunier, *Fluconazole (Diflucan®): a review*. 1993. **3**(3): p. 147-170.
39. Gremmo-Féger, G., M. Dobrzynski, and M.J.J.d.g.o.e.b.d.l.r. Collet, *Allaitement maternel et médicaments*. 2003. **32**(5): p. 466-475.
40. Amichai, B. and M.H.J.I.j.o.d. Grunwald, *Adverse drug reactions of the new oral antifungal agents—terbinafine, fluconazole, and itraconazole*. 1998. **37**(6): p. 410-415.
41. Subba Raghavendra Rao, M., *Design, Development and Optimization of Controlled Release Tablet of Fluconazole*. 2012, KMCH College of Pharmacy, Coimbatore, Tamil Nadu, India.
42. Guideline, I.H.T. *ICH topic Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology*. in *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*. 2005.
43. ISO, N.J.S.-D.A., *CEI 17025, Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais*. 2005.
44. Rockville, M. *The United State Pharmacopoeia, 26th Revision ed.* in *US Pharmacopoeial Convention Inc*. 2003.

BIBLIOGRAPHIE

45. Leclerc, J., *Stratégie de validation de procédés de nettoyage dans l'industrie pharmaceutique: évolution de l'annexe 15 des BPF, introduction de la notion de PDE et gestion de la transition sur un site de production de médicaments liquides non stériles*. 2019, Université de Lorraine.
46. Hubert, P. *Valider une méthode analytique, ... Pourquoi et comment?* in *Chaire Francqui 2017-2018*. 2017.
47. Chandran, S. and R.J.D.P.-A.I.J.o.P.S. Singh, *Comparison of various international guidelines for analytical method validation*. 2007. **62**(1): p. 4-14.
48. Feinberg, M., et al., *New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data*. 2004. **380**(3): p. 502-514.
49. Hubert, P., et al., *Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal—part I*. 2004. **36**(3): p. 579-586.
50. eines quantitativen Analyseverfahrens, K.z.A., *Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude*. 2010.
51. Alvarez, D., et al., *Validation de la méthode de quantification de l'azote par analyseur élémentaire méthode Dumas et détermination des conditions d'utilisation d'après son incertitude de mesure et son seuil de discrimination*. 2021(105).
52. Hocquette, J.-F.J.C.d.T.d.I.I., *Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude*. 2010: p. 9-10.
53. Walfish, S.J.B.I., *Analytical methods: a statistical perspective on the ICH Q2A and Q2B guidelines for validation of analytical methods*. 2006. **19**(12): p. 1-6.
54. Shah, V.P., et al., *Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress*. 2000. **17**(12): p. 1551-1557.
55. Nicolas, O., C. Farenc, and F. Bressolle. *Stratégie de validation de méthodes de dosage en bioanalyse en vue d'études pharmacocinétiques et toxicologiques*. in *Annales de toxicologie analytique*. 2004. EDP Sciences.
56. Bressolle, F., et al., *Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods Applications to pharmacokinetics*. 1996. **686**(1): p. 3-10.
57. Pinguet, I.J.S.p., *Validation analytique: application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie*. 2015: p. P14.
58. Feinberg, M.J.D.T.D.L.I., l'expertise technique et scientifique de référence, *Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude*. 2010.
59. Chapuzet, E., et al., *Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques: stratégie de validation-Rapport d'une commission SFSTP*. 1997. **7**(3): p. 169-194.
60. Hubert, P., et al., *Validation des procédures analytiques quantitatives: Harmonisation des démarches Partie II-Statistiques*. 2006. **16**(1): p. 30-60.
61. Hubert, P., et al., *Validation des procédures analytiques quantitatives: Partie II-Statistiques*. 2006. **16**(1).
62. Bouklouze, A. and Y.J.L.t.d.L. Cherrah, *Validation des procédures analytiques selon la nouvelle approche basée sur l'erreur total (profil d'exactitude)*. 2009. **4**(14).
63. BOUKLOUZE, A. and K.J.L.t.d.l. DIGUA, *démarche statistique de la validation analytique dans le domaine pharmaceutique (Methodologie et exemple pratique)*. 2006. **1**(1).

BIBLIOGRAPHIE

64. Hubert, P., et al., *Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal—part II*. 2007. **45**(1): p. 70-81.
65. Tellal, S. and T. Toulait, *Optimisation par plan d'expérience, mise au point et validation analytique d'une méthode de dosage simultanée des deux conservateurs antimicrobiens méthyle et propyle parabène après extraction liquide-liquide, selon le protocole SFSTP 2006*. 2018, UMMTO.
66. Feinberg, M.J.V.d.m.d.a.q.p.l.p.d.e., *Mise en oeuvre du profil d'exactitude*. 2010: p. 27-44.
67. Bouvier, J.-C.J.R.f.d.o., *Validation de méthode d'analyse: vers un nouveau concept*. 2004(205).
68. Bouklouze, A. and Y.J.L.t.d.L. Cherrah, *VALIDATION DES PROCEDURES ANALYTIQUES SELON LA NOUVELLE APPROCHE BASEE SUR L'ERREUR TOTAL (PROFIL D'EXACTITUDE)*. 2009. **4**(14).
69. Couderc, S. and N.J.A.P. Picard, *Le suivi thérapeutique pharmacologique*. 2017. **56**(570): p. 47-50.
70. Roux, A.J.I.-a. and B. Spécialisée, *Dosage des médicaments: du prélèvement au résultat*. 1999. **14**(1): p. 32-36.
71. Rozet, E., et al., *Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods*. 2011. **55**(4): p. 848-858.
72. Johansson, M.A. and K.-E.J.A. Hellenäs, *Matrix effects in immunobiosensor determination of clenbuterol in urine and serum*. 2004. **129**(5): p. 438-442.
73. Chambers, E., et al., *Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses*. 2007. **852**(1-2): p. 22-34.
74. Chin, C., et al., *A study of matrix effects on an LC/MS/MS assay for olanzapine and desmethyl olanzapine*. 2004. **35**(5): p. 1149-1167.
75. Chiu, M.L., et al., *Matrix effects—a challenge toward automation of molecular analysis*. 2010. **15**(3): p. 233-242.
76. Nicolas, O., et al. *Traitements de l'échantillon biologique avant l'analyse chromatographique. Applications à la pharmacocinétique et à la toxicologie*. in *Annales de Toxicologie Analytique*. 2004. EDP Sciences.
77. Blanchard, J.J.J.o.C.B.B.S. and Applications, *Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high-performance liquid chromatographic analysis*. 1981. **226**(2): p. 455-460.
78. Jemal, M., et al., *Comparison of plasma sample purification by manual liquid–liquid extraction, automated 96-well liquid–liquid extraction and automated 96-well solid-phase extraction for analysis by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry*. 1999. **732**(2): p. 501-508.
79. Steinborner, S. and J.J.A.c. Henion, *Liquid– Liquid extraction in the 96-well plate format with SRM LC/MS quantitative determination of methotrexate and its major metabolite in human plasma*. 1999. **71**(13): p. 2340-2345.
80. Saraji, M., M.K.J.A. Boroujeni, and b. chemistry, *Recent developments in dispersive liquid–liquid microextraction*. 2014. **406**(8): p. 2027-2066.
81. CAPOLAGHI, B., et al. *Analytical strategy in emergency toxicology*. in *Annales de Toxicologie Analytique*. 2000.

BIBLIOGRAPHIE

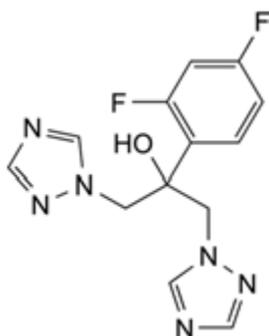
82. Goullé, J. and R.J.I.-R. Talec, *Quelles technologies pour l'analyse toxicologique en 2003?* 2004. **25**(1): p. 48-53.
83. Gross, A.S.J.B.j.o.c.p., *Best practice in therapeutic drug monitoring*. 2001. **52**(S1): p. 5-9.
84. van Lent-Evers, N.A., et al., *Impact of goal-oriented and model-based clinical pharmacokinetic dosing of aminoglycosides on clinical outcome: a cost-effectiveness analysis*. 1999. **21**(1): p. 63-73.
85. Labarde, S.J.A.p., *Enjeux du suivi thérapeutique pharmacologique*. 2015. **54**(549): p. 39-41.
86. Widmer, N., et al., *Principles of therapeutic drug monitoring*. 2008. **4**(165): p. 1644-1648.
87. Bouër, R., S. Saivin, and G.J.R.F.d.L. Houin, *Adaptation de la posologie des antiépileptiques*. 1998. **1998**(304): p. 63-68.
88. Pappas, P.G., et al., *Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America*. 2009. **48**(5): p. 503.
89. Labelle, A.J., et al., *Treatment-related risk factors for hospital mortality in Candida bloodstream infections*. 2008. **36**(11): p. 2967-2972.
90. Zilberberg, M.D., et al., *Inappropriate empiric antifungal therapy for candidemia in the ICU and hospital resource utilization: a retrospective cohort study*. 2010. **10**(1): p. 1-7.
91. Schwarze, R., A. Penk, and L.J.M. Pittrow, *Administration of fluconazole in children below 1 year of age*. 1999. **42**(1-2): p. 3-16.
92. Pittrow, L. and A.J.M. Penk, *Dosage adjustment of fluconazole during continuous renal replacement therapy (CAVH, CVVH, CAVHD, CVVHD)*. 1999. **42**(1-2): p. 17-19.
93. Cameron, M., et al., *Correlation of in vitro fluconazole resistance of Candida isolates in relation to therapy and symptoms of individuals seropositive for human immunodeficiency virus type 1*. 1993. **37**(11): p. 2449-2453.
94. Rex, J.H., et al., *Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and Candida infections*. 1997. **24**(2): p. 235-247.
95. Summers, K., et al., *Therapeutic drug monitoring of systemic antifungal therapy*. 1997. **40**(6): p. 753-764.
96. van der Elst, K.C., et al., *Insufficient fluconazole exposure in pediatric cancer patients and the need for therapeutic drug monitoring in critically ill children*. 2014. **59**(11): p. 1527-1533.
97. Launay-Vacher, V. and G. Deray, *Maniement du fluconazole chez le patient insuffisant rénal*. Réanimation, 2003. **12**(3): p. 253-257.
98. Gwilt, P.R., D.J.C.P. Perrier, and Therapeutics, *Plasma protein binding and distribution characteristics of drugs as indices of their hemodialyzability*. 1978. **24**(2): p. 154-161.
99. Jullien, V. and O.J.T. Lortholary, *Les relations pharmacocinétique-pharmacodynamique des antifongiques. Conséquences pour le suivi thérapeutique*. 2006. **61**(3): p. 209-217.
100. Kaguelidou, F., *Optimiser l'évaluation des médicaments en néonatalogie: l'exemple des médicaments anti-infectieux*. 2012, Université René Descartes-Paris V.
101. Han, S., et al., *Population pharmacokinetic analysis of fluconazole to predict therapeutic outcome in burn patients with Candida infection*. 2013. **57**(2): p. 1006-1011.
102. JEAN-LOUIS, C.J.U.M., *Cours chromatographie liquide*. 2001. **4**.
103. Ben, S., *Study of the separation of fluoroquinolones using HPLC: Application to the study of their degradation by gamma radiation*.

BIBLIOGRAPHIE

104. Wastiel, C. and M.J.E.S. Kosinski, *s Contrôle de qualité des produits radiopharmaceutiques par chromatographie liquide HPLC*. **1000**: p. 18.
105. Prema, R., *HPLC: High-Performance Liquid Chromatography*. 2003, Macmillian reference USA, p165-167.
106. Fekete, S., et al., *Rapid high performance liquid chromatography method development with high prediction accuracy, using 5 cm long narrow bore columns packed with sub-2 μm particles and Design Space computer modeling*. 2009. **1216**(45): p. 7816-7823.
107. Majors, R.E. and M.J.L.G.N.A. Przybyciel, *Columns for reversed-phase LC separations in highly aqueous mobile phases*. 2002. **20**(7): p. 584-593.
108. Wang, I.-H., R. Moorman, and J.J.J.o.C.A. Burleson, *Isocratic reversed-phase liquid chromatographic method for the simultaneous determination of (S)-methoprene, MGK264, piperonyl butoxide, sumithrin and permethrin in pesticide formulation*. 2003. **983**(1-2): p. 145-152.
109. Belanger, J.M., J.J. Paré, and M. Sigouin, *High performance liquid chromatography (HPLC): principles and applications*, in *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*. 1997, Elsevier. p. 37-59.
110. Grzych, G. and C. Duployez, *Exercices: méthodologie*. 2017: De Boeck Supérieur.
111. Rouessac, F., A. Rouessac, and D. Cruch??, *Analyse chimique*. 2004: Dunod.
112. Tranchant, J., *Chromatographie en phase gazeuse*. 1967: Ed. Techniques Ingénieur.
113. Burgot, G. and J.-L. Burgot, *Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques*. 2011: Lavoisier.
114. Rosset, R., *Chromatographies en phases liquide et supercritique*. 1991.

Annexes

ANNEXE I :
Monographie Du Fluconazole

FLUCONAZOLE**Fluconazolium**C₁₃H₁₂F₂N₆O

Mr 306,3

[86386-73-4]

DÉFINITION

2-(2,4-Difluorophényl)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol.

Teneur : 99,0 pour cent à 101,0 pour cent (substance desséchée).

CARACTÈRES

Aspect : poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique.

Solubilité : peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans le méthanol, soluble dans l'acétone.

Le fluconazole présente le phénomène du polymorphisme (5.9).

IDENTIFICATION

Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24).

Comparaison : fluconazole SCR.

Si les spectres obtenus à l'état solide présentent des différences, dissolvez séparément la substance à examiner et la substance de référence dans un volume minimal de chlorure de méthylène R, évaporez à siccité au bain-marie et enregistrez de nouveaux spectres à partir des résidus.

ESSAI**Aspect de la solution** : La solution est limpide (2.2.1) et incolore (2.2.2, Procédé II).

Dissolvez 1,0 g de fluconazole dans du méthanol R et complétez à 20 mL avec le même solvant.

Substances apparentées : Chromatographie liquide (2.2.29).

Solution à examiner : Dissolvez 0,100 g de fluconazole dans la phase mobile, traitez aux ultrasons si nécessaire et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile.

Solution témoin (a) : Prélevez 5,0 mL de solution à examiner et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile.

Solution témoin (b) : Dissolvez 5 mg de fluconazole pour identification des pics SCR (contenant l'impureté A) dans la phase mobile, traitez aux ultrasons si nécessaire et complétez à 10 mL avec la phase mobile.

Solution témoin (c) : Dissolvez 3,0mg d'impureté B de fluconazole SCR dans la phase mobile, traitez aux ultrasons si nécessaire et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile.

Solution témoin (d) : Dissolvez 2,0mg d'impureté C de fluconazole SCR dans la phase mobile et complétez à 20,0 mL avec la phase mobile. Prélevez 1,0 mL de cette solution, ajoutez 1,0 mL de solution à examiner et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile.

Colonne :

- Dimensions : l = 0,15 m, Ø = 4,6 mm ;
- Phase stationnaire : gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R1 (5 µm) ;
- Température : 40 °C.

Phase mobile : Acétonitrile R, solution de formiate d'ammonium R à 0,63 g/L (14:86 V/V).

Débit : 1,0mL/min.

Détection : spectrophotomètre à 260 nm.

Injection : 20 µL.

Enregistrement : 3,5 fois le temps de rétention du fluconazole.

Identification des impuretés :

Utilisez le chromatogramme fourni avec le fluconazole pour identification des pics SCR et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) pour identifier le pic dû à l'impureté A. Utilisez le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) pour identifier le pic dû à l'impureté B et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (d) pour identifier le pic dû à l'impureté C.

Rétention relative par rapport au fluconazole (temps de rétention = environ 11 min) : impureté B = environ 0,4 ; impureté A = environ 0,5 ; impureté C = environ 0,8.

Conformité du système : Solution témoin (d) :

- Résolution : au minimum 3,0 entre les pics dus à l'impureté C et au fluconazole.

Limites :

- Impureté A : au maximum 0,8 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,4 pour cent) ;
- Impureté B : au maximum la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) (0,3 pour cent) ;
- Impureté C : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (d) (0,1 pour cent) ;
- Impuretés non spécifiées : pour chaque impureté, au maximum 0,2 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,10 pour cent) ;
- Total : au maximum 1,2 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,6 pour cent) ;
- Limite d'exclusion : 0,1 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,05 pour cent).

Métaux lourds (2.4.8) : au maximum 10 ppm.

Dissolvez 2,0 g de fluconazole dans un mélange de 15 volumes d'eau R et 85 volumes de méthanol R puis complétez à 20,0 mL avec le même mélange de solvants. 12 mL de solution satisfont à l'essai B. Préparez la solution témoin avec de la solution à 1 ppm de plomb (Pb) R.

Perte à la dessiccation (2.2.32) : au maximum 0,5 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de fluconazole.

Cendres sulfuriques (2.4.14) : au maximum 0,1 pour cent, déterminé sur 1,0 g de fluconazole.

DOSAGE

Dissolvez 0,125 g de fluconazole dans 60 mL d'acide acétique anhydre R. Titrez par l'acide perchlorique 0,1 M. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (2.2.20).

1 mL d'acide perchlorique 0,1 M correspond à 15,32 mg de C₁₃H₁₂F₂N₆O.

CONSERVATION

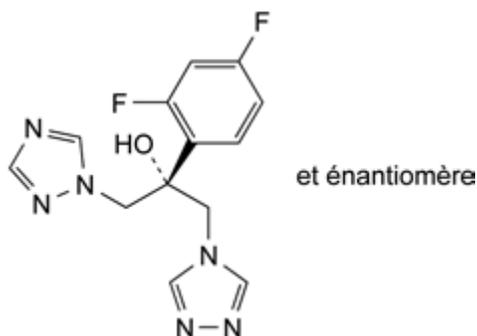
En récipient étanche.

IMPURETÉS

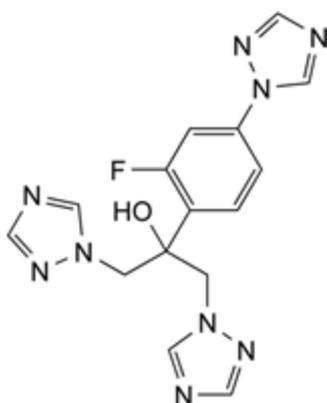
Impuretés spécifiées : A, B, C.

Autres impuretés décelables (si elles sont présentes à une teneur suffisante, les substances suivantes seront détectées par l'un des essais de la monographie.

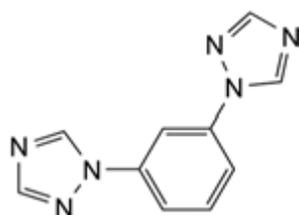
Elles sont limitées par le critère général d'acceptation applicable aux autres impuretés ou impuretés non spécifiées, ou par les dispositions de la monographie générale Substances pour usage pharmaceutique (2034). Il n'est donc pas nécessaire de les identifier pour démontrer la conformité de la substance. Voir également chapitre 5.10. Contrôle des impuretés dans les substances pour usage pharmaceutique) : D, E, F, G, H, I.



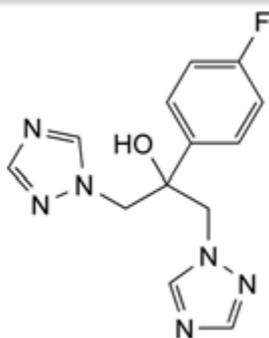
A. (2RS)-2-(2,4-difluorophényl)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-3-(4H-1,2,4-triazol-4-yl)propan-2-ol,



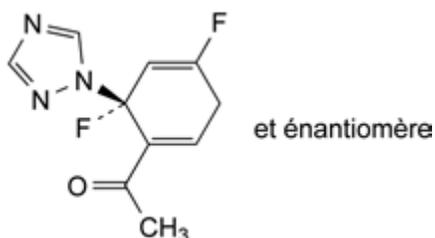
B. 2-[2-fluoro-4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)phényl]-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol,



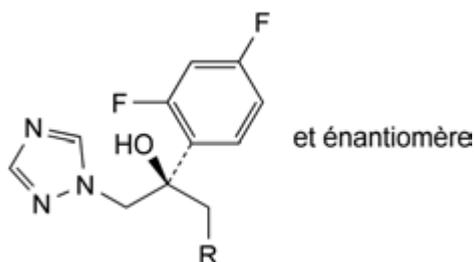
C. 1,1'-(1,3-phénylène)di-1H-1,2,4-triazole,



D. 2-(4-fluorophényl)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol,

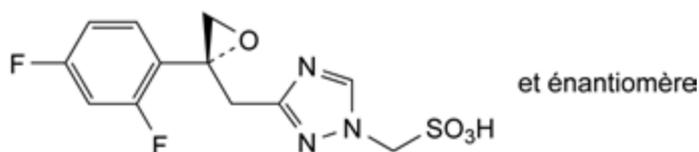


E. 1-[(6RS)-4,6-difluoro-6-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)cyclohexa-1,4-diényl]éthanone,

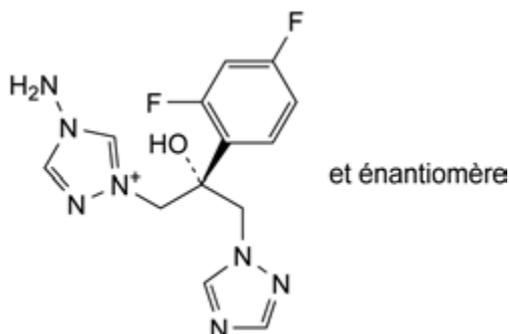


F. R = OH : (2RS)-2-(2,4-difluorophényl)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propane-1,2-diol,

H. R = Br : (2RS)-1-bromo-2-(2,4-difluorophényl)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol,



G. acide [3-[[2-(2,4-difluorophényl)oxiran-2-yl]méthyl]-1H-1,2,4-triazol-1-yl]méthanesulfonique,



I. 4-amino-1-[(2RS)-2-(2,4-difluorophényl)-2-hydroxy-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propyl]-4H-1,2,4-triazolium

ANNEXE II :

Indications et posologies du Fluconazole

- Chez l'adulte

TABLEAU XXXV : Indications et posologies du Fluconazole [26].

Indications		Posologie	Durée du traitement
Cryptococcose	Traitement des méningites à cryptocoque	-Dose de charge : 400 mg le premier jour -Puis, 200 à 400 mg une fois par jour -Si menace du pronostic vital, la dose quotidienne peut être augmentée à 800 mg	6 à 8 semaines
	Prévention des rechutes de méningites à cryptocoque	200 mg une fois par jour	Durée indéterminée
Coccidioidomycose		-200 à 400 mg une fois par jour -Dans certaines infections notamment les atteintes méningées, la dose de 800 mg est envisagée	11 à 24 mois ou plus en fonction du patient
Candidose invasive		-Dose de charge : 800 mg le premier jour -Puis, 400 mg une fois par jour	2 semaines après la première hémoculture négative et la résolution des signes et symptômes
Traitement de la candidose des muqueuses	Candidose oropharyngée	-Dose de charge : 200 à 400 mg le premier jour -Puis, 100 à 200 mg une fois par jour	7 à 21 jours jusqu'à rémission NB : périodes plus longues si immunodépression sévère
	Candidose œsophagienne	-Dose de charge : 200 à 400 mg le premier jour -Puis, 100 à 200 mg une fois par jour	14 à 30 jours jusqu'à rémission NB : périodes plus longues si immunodépression sévère
	Candidurie	200 à 400 mg une fois par jour	7 à 21 jours NB : périodes plus longues si immunodépression sévère

	Candidose atrophique chronique	50 mg une fois par jour	14 jours
	Candidose cutanéomuqueuse chronique	50 à 100 mg une fois par jour	Jusqu'à 28 jours NB : périodes plus longues en fonction de la sévérité de l'infection et de l'immunodépression
Prévention de rechute d'une candidose des muqueuses chez les patients VIH (+) présentant un risque de récurrence	-Candidose oropharyngée -Candidose œsophagienne	-100 à 200 mg une fois par jour -Ou 200 mg trois fois par semaine	Période indéterminée
Prophylaxie des infections à <i>Candida</i> chez les patients atteints de neutropénie prolongée		200 à 400 mg une fois par jour	Le traitement doit débuter plusieurs jours avant le début de la neutropénie induite et se poursuivre 7 jours après la résolution de la neutropénie (PNN > 1000/mm ³)

- **Chez l'enfant**

Une posologie maximale de 400mg par jour ne doit pas être dépassée dans la population pédiatrique.

Une variation de la posologie doit être considérée chez cette population.

ANNEXE III :
Les Effets Indésirables du Fluconazole

TABLEAU XXXVI : Les effets indésirables du Fluconazole [26].

Classes de systèmes d'organes	Fréquent ($\geq 1/100$ à $< 1/10$)	Peu fréquent ($\geq 1/1000$ à $< 1/100$)	Rare ($\geq 1/10000$ à $< 1/1000$)
Affections hématologiques et du système lymphatique		Anémie	-Agranulocytose -Leucopénie -Thrombocytopénie
Affections du système immunitaire			Anaphylaxie
Troubles du métabolisme et de la nutrition		Diminution de l'appétit	-Hypercholestérolémie -Hypertriglycéridémie -Hypokaliémie
Affections psychiatriques		Somnolence / insomnie	
Affections du système nerveux	Céphalées	-Crises d'épilepsie -Paresthésie -Etourdissements -Altération du goût	Tremblements
Affections de l'oreille et du labyrinthe		Vertiges	
Affections cardiaques			-Torsade de pointe -Allongement de l'intervalle QT
Affections gastro-intestinales	-Douleurs abdominales, -Nausées vomissements -Diarrhée	-Bouche sèche -Dyspepsie -Flatulences -Constipation	
Affections hépatobiliaires	-Augmentation de l'ASAT et l'ALAT -Augmentation de la PAL sanguine	-Cholestase -Augmentation de la bilirubine -Ictère	-Hépatite -Lésion hépatocellulaire - Nécrose hépatocellulaire -Insuffisance hépatique

Affections de la peau et du tissu sous-cutané	Eruption cutanée	-Eruption médicamenteuse -Urticair -Prurit -Hypersudation	-Syndrome de Lyell (nécrolyse épidermique toxique) -Syndrome de Stevens-Johnson -Pustulose exanthématique aiguë généralisée -Dermatite exfoliative -Angioedème -œdème de la face -Alopécie
Affections musculo-squelettiques et systémiques		Myalgie	
Troubles généraux et anomalies au site d'administration		-Fatigue -Malaise -Asthénie -Fièvre	

NB : Effet indésirable de fréquence intermédiaire : le syndrome de DRESS (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms), ou le syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse, qui se manifeste par une réaction médicamenteuse avec éosinophilie et symptômes systémiques.

➤ Population pédiatrique

La nature et l'incidence des effets indésirables et des anomalies biologiques observés lors des essais cliniques pédiatriques sont comparables à celles observées chez l'adulte.

ANNEXE IV :
**Chromatographie Liquide à Haute
Performance**

La chromatographie est un ensemble de procédés applicables à des mélanges moléculaires ou ioniques, basés sur des différences de distribution des solutés entre une phase stationnaire et une phase mobile continue : les deux phases étant mises en contact intime et à contre-courant. Il en existe plusieurs types tel que l'HPLC.

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) ou simplement la chromatographie en phase liquide est une technique séparative utilisée en analyse quantitative et qualitative, principalement employée dans le domaine de la chimie analytique comme outil scientifique majeur mais aussi dans des domaines variés tels que la toxicologie et la biochimie.

1. Historique

La première description de la méthode de séparation chromatographique est donnée dans le cadre d'une communication présentée en 1903 et a été appliquée en 1906.

En 1930, la méthode est introduite en pratique dans les laboratoires par Kuhn et Elederer à Heidelberg en Allemagne. En quelques années, la chromatographie en phase liquide sur colonne devient une technique rendant possible de nombreuses découvertes concernant différentes disciplines.

En 1938, Reichstein introduit la chromatographie liquide pour séparer des substances incolores [102].

Les techniques modernes de HPLC sont devenues disponibles en 1969; Cependant, ils n'étaient pas largement acceptés dans l'industrie pharmaceutique jusqu'à plusieurs années plus tard. Une fois que les systèmes HPLC capables d'une analyse quantitative sont devenus disponibles dans le commerce, leur utilité dans l'analyse pharmaceutique a été pleinement appréciée.

Dans les années 1990, la HPLC avait entamé une croissance explosive qui l'a rendue la méthode analytique la plus populaire. Sa popularité actuelle résulte de sa séparation pratique d'une large gamme de types d'échantillons, d'une puissance de résolution exceptionnelle, de la vitesse et des niveaux de détection nano molaires.

Actuellement, elle trouve son utilité dans la recherche et le développement pharmaceutique pour :

- ✓ Purifier les produits synthétiques ou naturels ;
- ✓ Caractériser les métabolites ;
- ✓ Doser les principes actifs, les impuretés et les produits de dégradation ;
- ✓ Les essais de dissolution et dans les études pharmacodynamiques et pharmacocinétiques.

Les améliorations apportées à la HPLC au cours des dernières années comprennent:

- ✓ La réduction de la taille des particules ;
- ✓ De nouveaux matériaux d'emballage et de colonne ;
- ✓ Séparation à haute vitesse ;
- ✓ Micro-HPLC ;
- ✓ Automatisation et optimisation assistée par ordinateur ;
- ✓ Amélioration des méthodes de détection, y compris les systèmes de détection dits « coupés ».

2. Principe

L'HPLC consiste à faire migrer les constituants à séparer sur une phase stationnaire immobile, à l'aide d'une phase mobile liquide de nature différente. Chaque molécule sera plus ou moins rapidement entraînée selon son affinité pour, respectivement, la phase stationnaire et la phase mobile, permettant la séparation des différents constituants présents.

La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique, le mélange à analyser est mis en solution puis injecté et transporté à travers ce dernier.

Dans une colonne chromatographique les composés en solution se répartissent entre les deux phases selon leur affinité, chaque soluté est soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont représentés par des pics qui seront par la suite enregistrés, l'ensemble est appelé : chromatogrammes [102].



Figure 39 : HPLC SHIMADZU LC 20.

3. Appareillage

Une installation de HPLC comporte divers modules spécialisés, qui se présentent dans des boîtiers distincts ou intégrés dans un même châssis pour des raisons de moindre encombrement. Ces modules sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre interne pour assurer la circulation de la phase mobile. Elles peuvent être en acier inoxydable ou en PEEK® (ou polyether-etherketone), un polymère souple et coloré qui résiste aux solvants usuels.

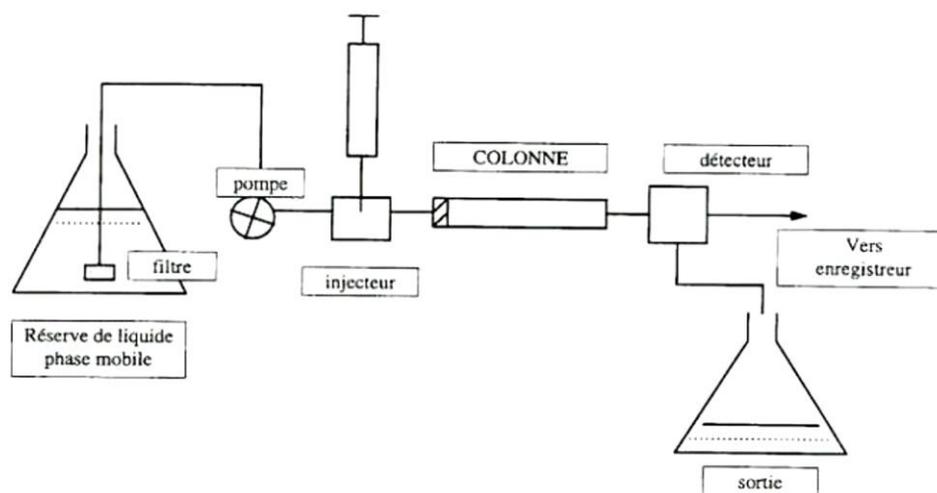


Figure 40 : Représentation schématique de l'appareillage de l'HPLC.

3.1. Réservoir de la phase mobile

Les appareils HPLC sont équipés d'un ou plusieurs réservoirs qui vont contenir la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluant (solvant de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe qui réalise le mélange demandé [103].

Les réservoirs sont soit en acier inoxydable résistant à la corrosion, soit en verre. Il peut y'avoir des perturbations lors de la détection, séparation, ou gêne du bon fonctionnement des pompes et des détecteurs ceci suite à la présence de gaz ambiants comme l'oxygène qui peuvent être dissouts dans les solvants et former des bulls dans la colonne, et des poussières en suspension.

Afin d'éliminer ces perturbations, il est souhaitable de dégazer et filtrer les solvants. Le dégazage peut s'effectuer par pompage sous vide, ultrasons, par chauffage et agitation, ou réaction catalytique qui transforme l'oxygène en formaldéhyde ou acide formique en présence du méthanol, ou encore par barbotage d'hélium qui permet de retenir environ 85% d'oxygène en 10 minutes, les solvants sont exempts d'hélium après barbotage du fait de sa faible solubilité dans les solvants ordinaires d'où son intérêt. Pour éviter la re-dissolution des gaz, un barbotage constant d'hélium peut être effectué.

3.2. Pompe

Toutes les installations HPLC comportent au moins une pompe pour fournir la phase mobile à un débit constant à une certaine pression pour atteindre la colonne. Les pompes requises doivent répondre à des exigences rigoureuses :

- ✓ Atteindre des pressions élevées : -200bars (20000KPa) ou plus ;
- ✓ Être exempt d'impulsions ;
- ✓ Imposer des débits reproductibles de 0,1 à 10ml/minutes ;
- ✓ Résister à la corrosion et aux solvants ;
- ✓ Permettre de délivrer un éluant de composition fixe en mode isocratique ou de composition variable pour travailler en gradient d'éluant.

Elle permet de travailler soit :

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

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μL à plusieurs mL/min. La pression à imposer dépend des facteurs suivants [103]:

- ✓ Débit de la phase mobile ;
- ✓ Viscosité du modificateur organique ;
- ✓ Taille des grains de la phase stationnaire ;
- ✓ Géométrie de la colonne.

3.3. Injecteur

L'injection de l'échantillon se fait soit manuellement ou automatiquement ; l'injecteur utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe, elle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne [103].

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire en un temps bref, afin de perturber le moins possible le régime de circulation de la phase mobile qui doit être stable de la colonne au détecteur. On utilise pour se faire, une vanne haute pression à plusieurs voix, manuelle ou motorisée dans le cas des injecteurs automatiques, placée juste avant la colonne. Il s'agit d'une pièce d'une précision qui doit résister à des pressions pouvant dépasser 30000 kPa. Elle fonctionne en deux temps.

- ✓ Dans la position chargement, ou seule la communication entre pompe et colonne est assurée, l'échantillon est introduit à pression atmosphérique à l'aide d'une seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle ;
- ✓ Dans la position injection, l'échantillon est inséré dans le flux de phase mobile à rotation de 60° d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle. Une bonne reproductibilité de volume n'est atteinte que si la boucle a été totalement remplie par l'échantillon. Le volume prélevé avec la seringue est donc toujours largement supérieur à celui de la boucle.

Des tubes en acier inoxydable, en Téflon, en PEEK ou en silice fondue permettent de relier la ou les pompes à l'injecteur.

3.4. Colonne

La colonne est l'élément majeur de la chaîne HPLC, elle se présente comme un tube, souvent en acier inoxydable ou en verre, de longueur de 5 à 25 cm et de diamètre différent selon les modèles.



Figure 41 : Colonne chromatographique

Le choix, la construction et le remplissage de la colonne sont d'une grande importance car la qualité d'une séparation est toujours en fonction de celle de la colonne.

La colonne analytique est souvent précédée d'une pré-colonne (colonne de garde) courte (0,4 à 1 cm), remplie de même phase stationnaire, qui sert à retenir certaines impuretés et donc augmenter la vie de la colonne principale.

Le choix d'une colonne HPLC est lié aux paramètres suivants :

- ✓ Type de la phase stationnaire ;
- ✓ Longueur ;
- ✓ Diamètre des particules (dp) ;
- ✓ Débit de la phase mobile supportable.

La chromatographie liquide utilise des colonnes en acier de petite dimension (10 – 50 cm de longueur sur quelques mm de diamètre). Ces colonnes sont remplies sous haute pression (600 bars) avec une phase stationnaire constituée d'un absorbant greffé sur des petites particules de silice (5 - 10 μm).

L'équipement de base consiste en un réservoir de phase mobile qui est pompée et envoyée sous pression dans la colonne chromatographique. L'échantillon à analyser est injecté en amont de la colonne au moyen d'un injecteur on-line. Le volume d'échantillon est de l'ordre de 1 à 20 μL . La sortie de la colonne est directement branchée au(x) détecteur(s).

Les colonnes de type C18 sont les plus utilisées pour l'analyse des produits pharmaceutiques par HPLC [104].

- **La phase normale** : elle est constituée de gel de silice ; très polaire, il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête [105]. L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.
- **La phase inverse** : elle est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8, 18 ou 25 atomes de carbones (C8, C18, C25). Cette phase est apolaire, nécessite donc un éluant polaire (acétonitrile, méthanol, eau...), dans ce cas, les composés polaires seront élués en premier.

Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps et la qualité de la séparation est donc maintenue constante [106].

La technique d'HPLC en phase inverse est souvent le choix initial. Elle est de plus en plus considérée comme la meilleure technique de séparation pour atteindre une haute résolution, un temps court et une meilleure reproductibilité des temps de rétention en manipulant les conditions de HPLC [107, 108].

3.5. Détecteur

Le détecteur est relié à la sortie de la colonne, il permet de suivre en continu la séparation des solutés et de mesurer leurs concentrations. Les détecteurs peuvent être l'élément le plus sophistiqué et coûteux du système.

Un certain nombre de détecteurs sont couramment utilisés, y compris :

- ✓ Les détecteurs d'UV : qui sont les plus utilisés ;
- ✓ Les détecteurs de fluorescence ;
- ✓ Les détecteurs d'électrochimie ;
- ✓ Les détecteurs de conductivité et d'indice de réfraction.

Les détecteurs HPLC peuvent absorber dans trois régions d'absorption optique différentes :

- Ultraviolet (UV) : 190-400 nm ;
- Visible (Vis) : 400-700 nm ;
- Infrarouge (IR) : 2-25 Tm.

Pour permettre une analyse quantitative précise, un système de détection doit satisfaire plusieurs critères :

- ✓ Donner une réponse stable, rapide et reproductible ;
- ✓ Garantir une bonne sensibilité de détection ;
- ✓ Ne pas altérer la qualité de la séparation.

Le choix du détecteur est crucial pour le succès de la méthode, il dépend de plusieurs facteurs qui sont, les caractéristiques physiques des composés à séparer, les conditions opératoires et les caractéristiques de chaque détecteur.

Les caractéristiques des détecteurs :

• La sélectivité

Les détecteurs peuvent être classés en:

- ✓ Détecteurs sélectifs : qui donnent des réponses différentes en fonction de la structure moléculaire de l'échantillon sous analyse, comme les détecteurs d'absorbance UV et les détecteurs de fluorescence.
- ✓ Détecteurs universels : qui donnent une réponse similaire pour la plupart des composés, comme le détecteur de l'indice de réfraction.

Par conséquent, les détecteurs sélectifs sont les plus utilisés afin minimiser l'interférence des composants indésirables.

• La sensibilité

Définie par le rapport de la réponse du détecteur et la concentration de l'échantillon.

Le détecteur UV présente une grande sensibilité de l'ordre de 10^{-10} g/mL.

- **Le caractère conservateur**

Les détecteurs optiques couramment utilisés sont non destructifs, permettant ainsi la récupération du composé analysé et son utilisation dans les étapes de caractérisation subséquentes.

- **Insensibilité aux changements de la composition du solvant**

Le détecteur doit être insensible à tous les changements de la composition de la phase mobile dans les cas où l'analyse se fait avec un gradient d'élution, ce qui est le cas pour les détecteur UV-Visible et le détecteur de fluorescence [109].

3.6. Enregistreur

L'enregistreur reçoit un signal électrique proportionnel à la concentration de l'analyte qui traverse le détecteur. Ce signal est traité, amplifié puis utilisé pour tracer le chromatogramme.

Pour qu'un pic soit exploitable, on considère généralement que le rapport signal / bruit doit être égale au moins à trois.

Le bruit se traduit par des oscillations plus ou moins marquées autour de la ligne de base, ce bruit de fond aléatoire provient de diverses causes :

- ✓ La variation de température
- ✓ La pression
- ✓ L'instabilité électronique

Par ailleurs, on doit avoir une ligne de base aussi proche que possible de l'horizontale.

4. Grandeurs fondamentales de la chromatographie

4.1. Informations apportés par le chromatogramme

Un chromatogramme est un digramme montrant l'évolution du signal du détecteur (proportionnel à la concentration en soluté) en fonction du temps d'élution (plus rarement du volume d'élution), il doit être parfaitement reproductible, pour cela, il faut préciser pour chaque analyse [110]:

- ✓ Le type de colonne : marque, nature, diamètre, longueur, support...
- ✓ La nature de l'éluant : solvant, si c'est un mélange préciser sa composition, son débit, le mode de détection λ en nm ;
- ✓ La quantité injectée, le débit de l'injection sur le chromatogramme et la sensibilité du détecteur.

Une bonne analyse se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits. Les informations que comporte un chromatogramme sont représentées dans la figure suivante :

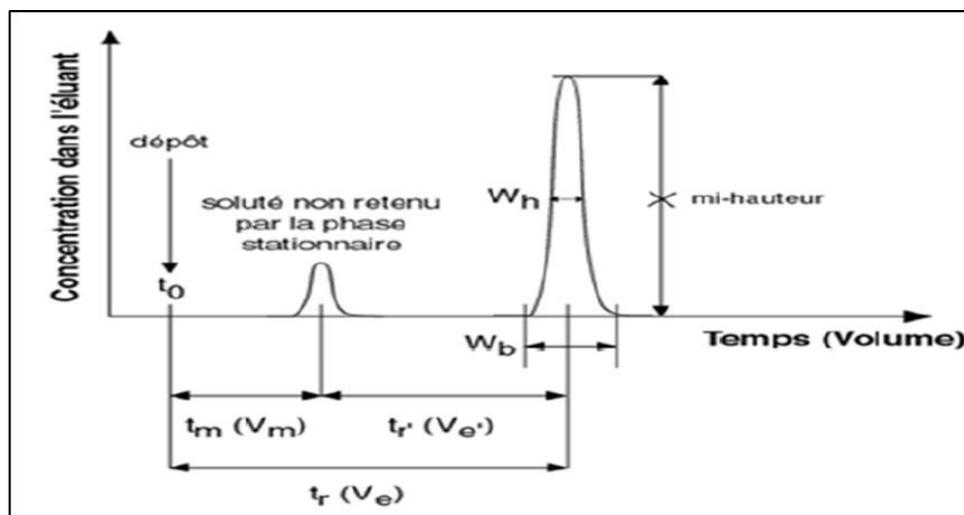


Figure 42 : Renseignements apportés par un chromatogramme.

- $T=0$: Le temps du début d'injection ;
- t_m : Le temps mort : est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile) ;
- t_r : temps mis par un soluté pour traverser la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée ;
- t_r' : Le temps de rétention réduit : est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit : $t_r' = t_r - t_m$;
- h : hauteur du pic ;
- ω_b : La largeur du pic à la base, mesurée à 13,5 pour cent de la hauteur du pic ;
- ω_h ou δ ou $\omega_{1/2}$: La largeur du pic à mi hauteur exprimée en unité de temps.

4.2. Grandeurs de rétention

4.2.1. Le temps de rétention (t_R)

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

Le temps de rétention t_r d'un soluté est fonction de son affinité avec l'éluant d'une part et avec la phase stationnaire d'autre part.

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

$$K = C_s / C_m$$

Le coefficient de partage dépend de trois types d'affinités : la première celle entre le soluté et la phase mobile, la deuxième entre le soluté et la phase stationnaire, la troisième entre les deux phases. La surface ou la hauteur du pic chromatographique est proportionnelle à la masse ou à la concentration du produit injecté [111].

4.2.2. Le temps mort (t_m)

C'est le temps écoulé pour qu'un constituant non retenu traverse la colonne. Il est calculé comme suit [111]:

$$t_m = t_0 = L / V$$

Avec:

L : la longueur de la colonne.

V : la vitesse de la phase mobile.

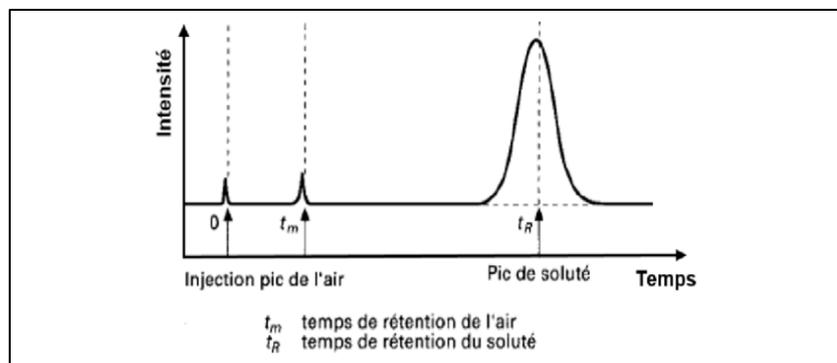


Figure 43 : Présentation schématique du temps de rétention et du temps mort [112]

4.2.3. Le volume de rétention

Le volume de rétention V_r d'un composé correspond au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au maximum du pic sur le chromatogramme.

Ce volume est caractéristique d'un seul composé dans des conditions opératoires données. Si le débit D est stationnaire [111].

$$V_r = t_r \cdot D$$

4.2.4. Le volume mort

Le volume mort V_m de la colonne correspond au volume interstitiel accessible, en d'autres termes le volume de la phase mobile. L'injecteur et le détecteur ont des volumes morts qui entrent en ligne de compte dans le volume de rétention total. On l'exprime en fonction de t_m et du débit D [111].

$$V_m = t_m \cdot D$$

4.2.5. Le facteur de rétention

Le facteur de rétention k est un paramètre expérimental important qui permet de comparer les vitesses de progressions des solutés dans les colonnes. Pour le soluté A, le facteur de rétention k_A est définie par :

$$k_A = \frac{K_A V_s}{V_m}$$

Ce dernier représente l'affinité d'un composé vis-à-vis de la phase stationnaire. Il est indépendant du débit de la phase mobile et des dimensions de la colonne, s'il y a une fuite de phase mobile avant la colonne, pour deux analyses identiques, dans les mêmes conditions opératoires, on obtient deux valeurs de temps de rétention identiques et deux valeurs de k' différentes. S'il y a des problèmes au niveau de la phase mobile ou phase stationnaire. On a deux valeurs de t_r et deux valeurs de k' différentes [111].

L'équation peut être reformulée en :

$$k_a = \frac{(t_r - t_m)}{t_m} = \frac{t_r'}{t_m} = \frac{t_s}{t_m}$$

Si un facteur de rétention est beaucoup plus petit que 1, le soluté sort de la colonne après un temps très proche du temps mort. Si le facteur de rétention est supérieur à environ 20 ou 30, les durées d'élution deviennent exagérément longues. Les séparations s'effectuent de manière optimale lorsque les facteurs de rétention des solutés d'un mélange sont de l'ordre de 1 à 5 [111].

4.3. Notions d'efficacité ou performance d'une colonne

L'efficacité d'une colonne analytique peut s'exprimer par le nombre N de plateaux théoriques. Plus le nombre des plateaux théoriques N est élevé, plus la colonne est efficace.

On définit également HEPT, la hauteur équivalente à un plateau théorique, et L , la longueur de la colonne. Plus la hauteur du plateau HEPT est faible, plus la colonne est efficace.

L'efficacité N traduit la finesse des pics [109]

$$HEPT = H = N/L$$

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

- De sa géométrie : plus une colonne sera longue et plus elle sera efficace ;
- De son garnissage : plus les particules de silice seront fines et plus la colonne sera efficace ;
- Du débit de l'éluant (ou vitesse linéaire) : Il existe une vitesse optimale d'utilisation d'une colonne pour que son efficacité soit plus grande.

Le nombre de plateaux théoriques sera calculé selon ces équations :

$$N = 16 (t_R/\omega)^2$$

$$N = 5.54 (t_R/\delta)^2$$

Pour conclure, l'efficacité de la colonne dépend du débit donc de la phase mobile, et de la qualité (remplissage) de la phase stationnaire [111].

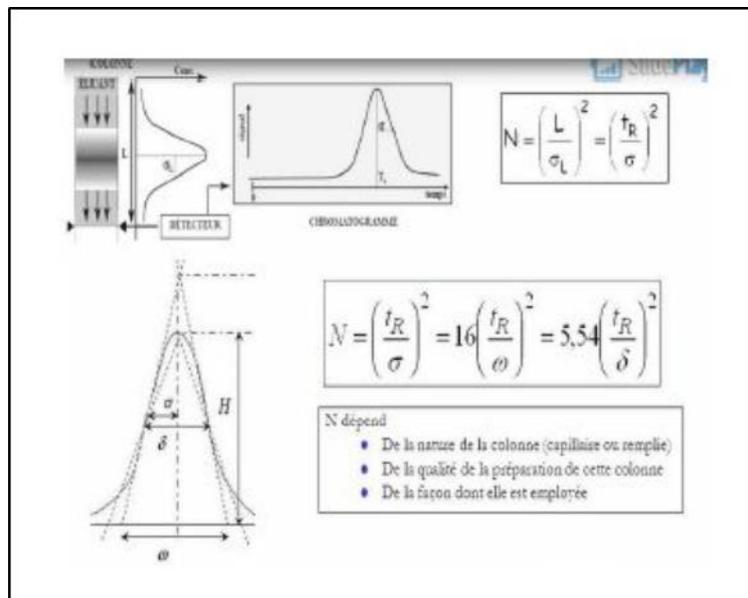


Figure 44 : schéma montrant la performance d'une colonne HPLC

4.4. Qualité de la séparation

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits.

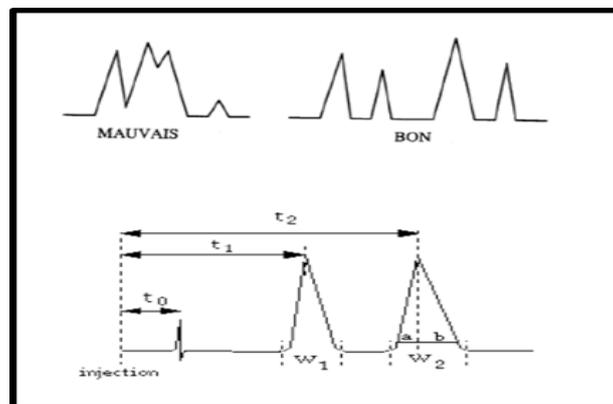


Figure 45 : chromatogramme montrant la qualité de la séparation chromatographique [112]

4.5. La sélectivité

On définit la sélectivité α d'une séparation par le rapport de facteur de distribution (k_1 et k_2) de deux solutés. Plus k est grand, plus le composé est adsorbé fortement dans la phase stationnaire et plus la rétention est grande et inversement. La valeur de k dépend de la structure du composé qui détermine son affinité pour chacune des deux phases [113].

$$\alpha = K_2/K_1 = (t_{r2} - t_m)/(t_{r1} - t_m)$$

α est égale à 1 lorsqu'il n'y a pas une séparation entre les deux signaux consécutifs.

4.6. Résolution R_s

La résolution est une mesure de la qualité d'une séparation de point de vue chevauchement de deux signaux consécutifs. Elle est exprimée à partir des temps de rétention. La résolution est calculée à partir de la relation suivante [114]:

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

Avec :

- ✓ Si $R_s < 1$: une mauvaise résolution ;
- ✓ Si $1 < R_s < 1,5$: une résolution acceptable ;
- ✓ Si $R_s \geq 1,6$: une bonne résolution ;
- ✓ Si $1,4 < R_s < 1,6$: une résolution optimale.

Deux caractéristiques déterminent le degré de recouvrement des pics :

- La distance séparant les sommets de deux pics mesurée par les temps de rétention t_{r1} et t_{r2} ;
- La largeur des pics à la base $\omega_{1/2(1)}$ et $\omega_{1/2(2)}$.

5. Analyse quantitative

Pour calculer la concentration massique d'un composé responsable d'un pic sur le chromatogramme il faut réunir deux conditions [111]:

- ✓ Disposer d'un échantillon authentique du composé que l'on veut doser, à usage de référence, pour déterminer la sensibilité du détecteur à son égard ;
- ✓ Disposer d'un moyen logiciel ou autre pour connaître soit les hauteurs soit les aires des différents pics d'éluion d'intérêt. Toutes les méthodes de quantification en chromatographie sont donc des méthodes comparatives et non pas absolues.

Pour un réglage donné de l'appareil, on admet qu'il existe pour chaque pic du chromatogramme une relation linéaire entre son aire (ou sa hauteur) et la quantité du composé responsable de ce pic dans l'échantillon injecté. Cette relation est valable pour une plage de concentrations qui dépend du détecteur employé. On traduit cette hypothèse par :

$$m_i = K_i \cdot A_i$$

Avec : m_i : masse du composé i injectée dans la colonne ;

K_i : coefficient de réponse absolu du composé i (à ne pas confondre avec le coefficient de partition), dépend du réglage du chromatographe. Ce n'est pas un paramètre intrinsèque du composé ;

A_i : aire du pic d'éluion du composé i .

5.1. Détermination de l'aire des pics

Peut se faire manuellement (ces méthodes ne sont plus utilisées) ou en utilisant des fonctions spécialement prévues des logiciels de chromatographie [111].

5.2. Étalonnage externe

Cette méthode permet de calculer la teneur (en termes de concentration ou de pourcentage massique) d'un ou plusieurs constituants apparaissant séparés sur le chromatogramme.

Le procédé repose sur la comparaison de deux chromatogrammes obtenus successivement sans changer les conditions de réglage de l'appareil.

Le premier est un chromatogramme de référence acquis à partir d'une solution de référence ou étalon externe ($C_{\text{réf}}$) dans un solvant, du composé qui fait l'objet du dosage. On injecte un volume V de cette solution et on repère sur le chromatogramme l'aire $A_{\text{réf}}$ du pic correspondant.

Le second résulte de l'injection d'un volume identique V de l'échantillon en solution, contenant le composé à doser ($C_{\text{éch}}$). Soit $A_{\text{éch}}$ l'aire du pic correspondant.

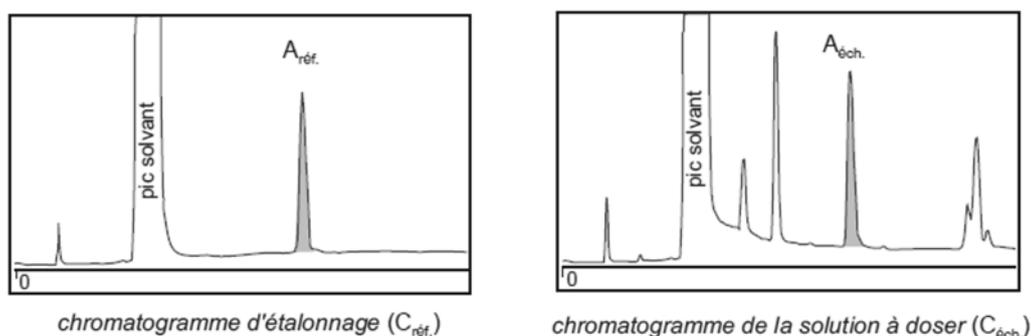


Figure 46 : Méthode de dosage par étalonnage externe.

Puisque les volumes injectés sont égaux, il y a proportionnalité entre les aires, qui dépendent des masses injectées, et les concentrations correspondantes ($m_i = C_i \cdot V$).

La relation ($m_i = K_i \cdot A_i$) appliquée aux deux chromatogrammes conduit à la relation suivante caractéristique de cette méthode :

$$m_{\text{ét}} = C_{\text{ét}} \cdot V = K \cdot A_{\text{ét}}$$

$$m_{\text{éch}} = C_{\text{éch}} \cdot V = K \cdot A_{\text{éch}}$$

$$\text{soit : } C_{\text{éch}} = C_{\text{ét}} \cdot (A_{\text{éch}}/A_{\text{ét}})$$

La précision du dosage est évidemment améliorée en calculant la moyenne des aires obtenues à partir de plusieurs injections identiques, mais, quitte à faire plusieurs mesures. Il est alors préférable de procéder à un étalonnage multipoints afin d'obtenir une courbe d'étalonnage $A=f(C)$, et ceci par injection de volumes égaux d'une série de solutions étalons [111].

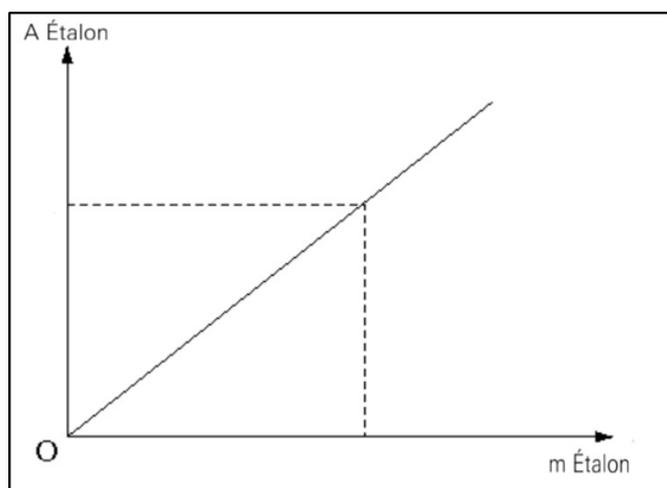


Figure 47 : courbe d'étalonnage obtenue pour un étalon externe.

Cette méthode est plus précise que celle qui consiste à ne faire qu'une mesure avec l'étalon, c'est la seule qui soit adaptée aux échantillons de gaz et elle a également pour avantage qu'on n'ajoute aucun composé à la solution échantillon.

5.3. Etalonnage interne

Cette méthode repose sur l'utilisation du coefficient de réponse relatif de chaque composé à doser vis-à-vis d'un marqueur introduit comme référence. Cela permet de s'affranchir de l'imprécision concernant les volumes injectés, un handicap de la précédente méthode. La méthode nécessite deux chromatogrammes, l'un pour calculer les coefficients de réponse relatifs et l'autre pour l'analyse de l'échantillon.

Les aires des pics des produits à quantifier sont donc comparées avec celle d'un composé de référence, appelé étalon interne, introduit à une concentration connue dans l'échantillon [111].

5.3.1. Calcul des coefficients de réponse relatifs

Dans un échantillon contenant deux composés à doser 1 et 2, et un composé E qui est un composé supplémentaire à usage d'étalon interne. Ces derniers ont comme concentrations C_1 , C_2 et C_E respectivement. Appelons A_1 , A_2 et A_E les aires des pics d'éluion repérés sur le chromatogramme obtenu à partir d'une prise d'essai de cette solution [111].

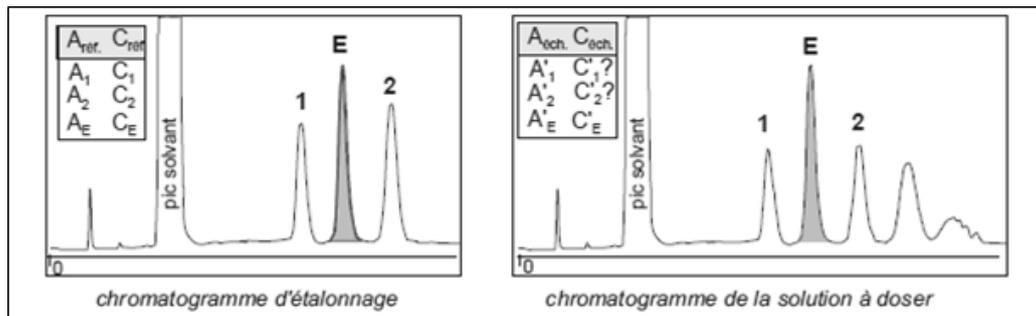


Figure 48 : chromatogramme lors d'une analyse par étalonnage interne

Si m_1 , m_2 et m_E sont les quantités réellement introduites dans la colonne, on peut écrire les trois relations suivantes :

$$m_1 = K_1 \cdot A_1$$

$$m_2 = K_2 \cdot A_2$$

$$m_E = K_E \cdot A_E$$

$$\text{soit : } \frac{m_1}{m_E} = \frac{K_1 \cdot A_1}{K_E \cdot A_E} \quad \text{et} \quad \frac{m_2}{m_E} = \frac{K_2 \cdot A_2}{K_E \cdot A_E}$$

Ces rapports permettent de calculer les coefficients de réponse relatifs de 1 et de 2 vis-à-vis de E choisi comme étalon, et désignés par $K_{1/E}$ et $K_{2/E}$:

$$K_{1/E} = \frac{K_1}{K_E} = \frac{m_1 \cdot A_E}{m_E \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/E} = \frac{K_2}{K_E} = \frac{m_2 \cdot A_E}{m_E \cdot A_2}$$

Comme les masses m_i réellement injectées sont proportionnelles aux concentrations massiques correspondantes C_i ($m_i = C_i \cdot V$), on en déduit les deux expressions suivantes :

$$K_{1/E} = \frac{K_1}{K_E} = \frac{C_1 \cdot A_E}{C_E \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/E} = \frac{K_2}{K_E} = \frac{C_2 \cdot A_E}{C_E \cdot A_2}$$

5.3.2. Chromatographie de l'échantillon et calcul des concentrations

La seconde étape de l'analyse consiste à chromatographier un volume quelconque d'une solution faite avec l'échantillon à étudier et dans laquelle a été ajoutée une quantité connue du composé E [111].

Soient $A'1$, $A'2$ et $A'E$, les aires du nouveau chromatogramme obtenu dans les mêmes conditions opératoires. Si $m'1$, $m'2$ et $m'E$ désignent les masses de 1, 2 et E réellement introduites dans la colonne, on aura :

$$\frac{m'1}{m'E} = K_{1/E} \cdot \frac{A'1}{A'E} \quad \text{et} \quad \frac{m'2}{m'E} = K_{2/E} \cdot \frac{A'2}{A'E}$$

À partir des coefficients relatifs calculés dans la première expérience ainsi que de la concentration de l'étalon interne dans l'échantillon, $C'E$, connue, on accède à :

$$C'1 = C'E \cdot K_{1/E} \cdot \frac{A'1}{A'E} \quad \text{et} \quad C'2 = C'E \cdot K_{2/E} \cdot \frac{A'2}{A'E}$$

En généralisant à n constituants, on peut calculer la concentration massique du soluté i au moyen de l'expression suivante :

$$C'i = C'E K_{i/E} \frac{A'i}{A'E}$$

Cette méthode est encore plus précise si on fait plusieurs injections de l'étalon ou de l'échantillon à doser, permettant ainsi d'obtenir la courbe d'étalonnage représentée dans la figure 50 :

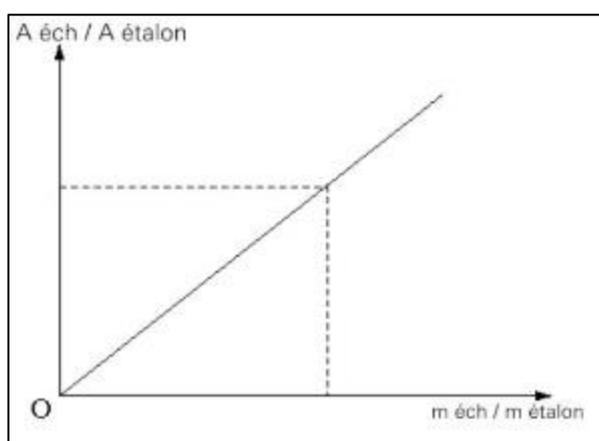
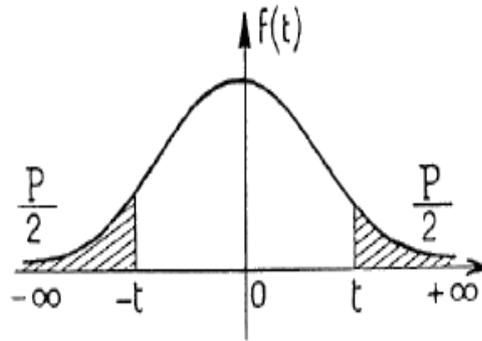


Figure 49 : courbe d'étalonnage obtenue par un étalonnage interne.

Cette méthode générale et reproductible exige néanmoins un bon choix de l'étalon interne dont les caractéristiques peuvent se résumer ainsi [111]:

- ✓ Il doit être pur et ne pas se trouver initialement dans l'échantillon ;
- ✓ Son pic d'éluion doit être bien résolu par rapport à tous ceux qui forment le chromatogramme de l'échantillon ;
- ✓ Son temps de rétention doit être proche de celui (ou de ceux) du (ou des) soluté(s) à doser ;
- ✓ Sa concentration doit être proche ou supérieure à celle des autres solutés pour être dans les conditions d'une réponse linéaire du détecteur ;
- ✓ Il doit être inerte vis-à-vis des composés de l'échantillon.

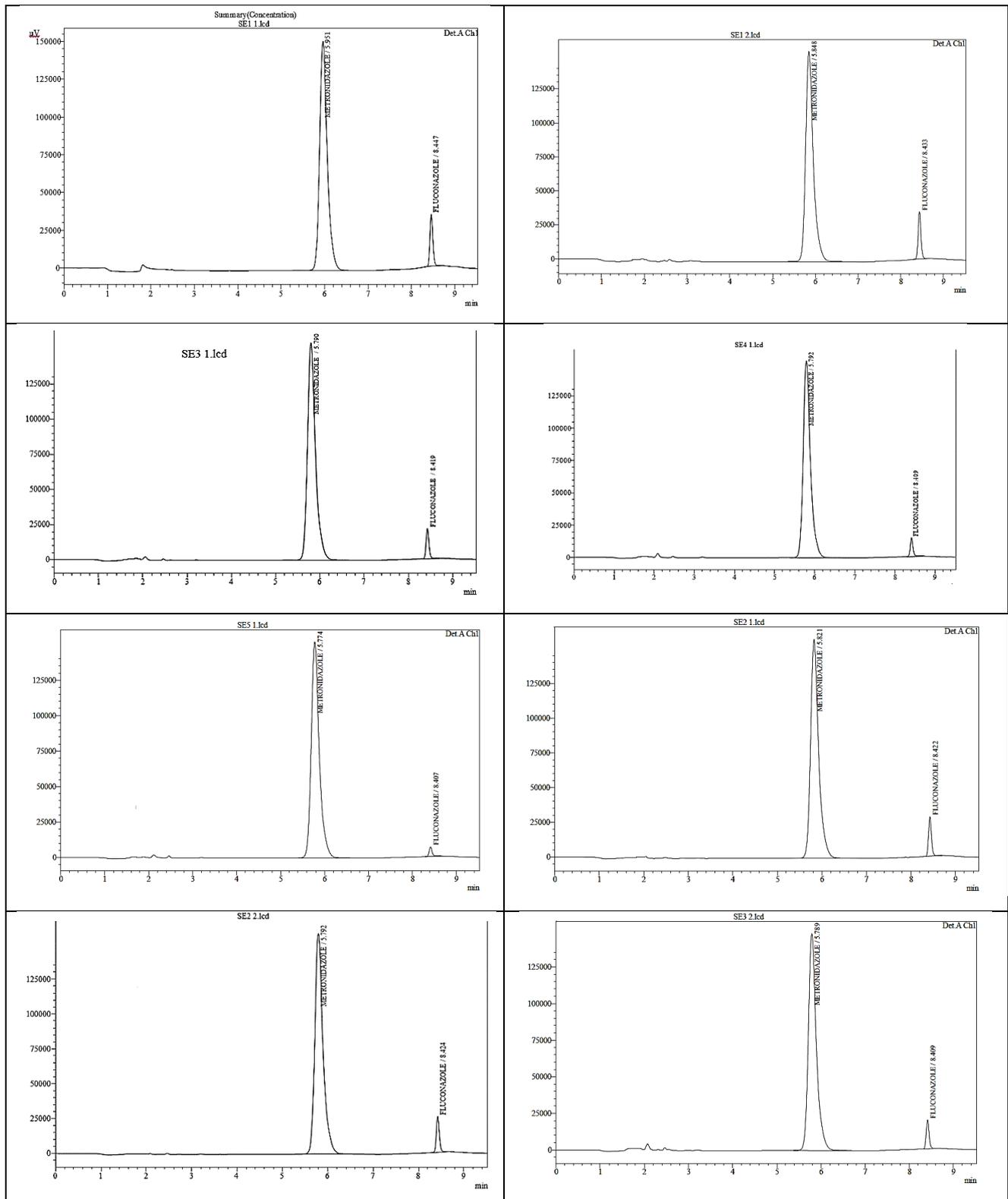
Annexe v :
Table De STUDENT

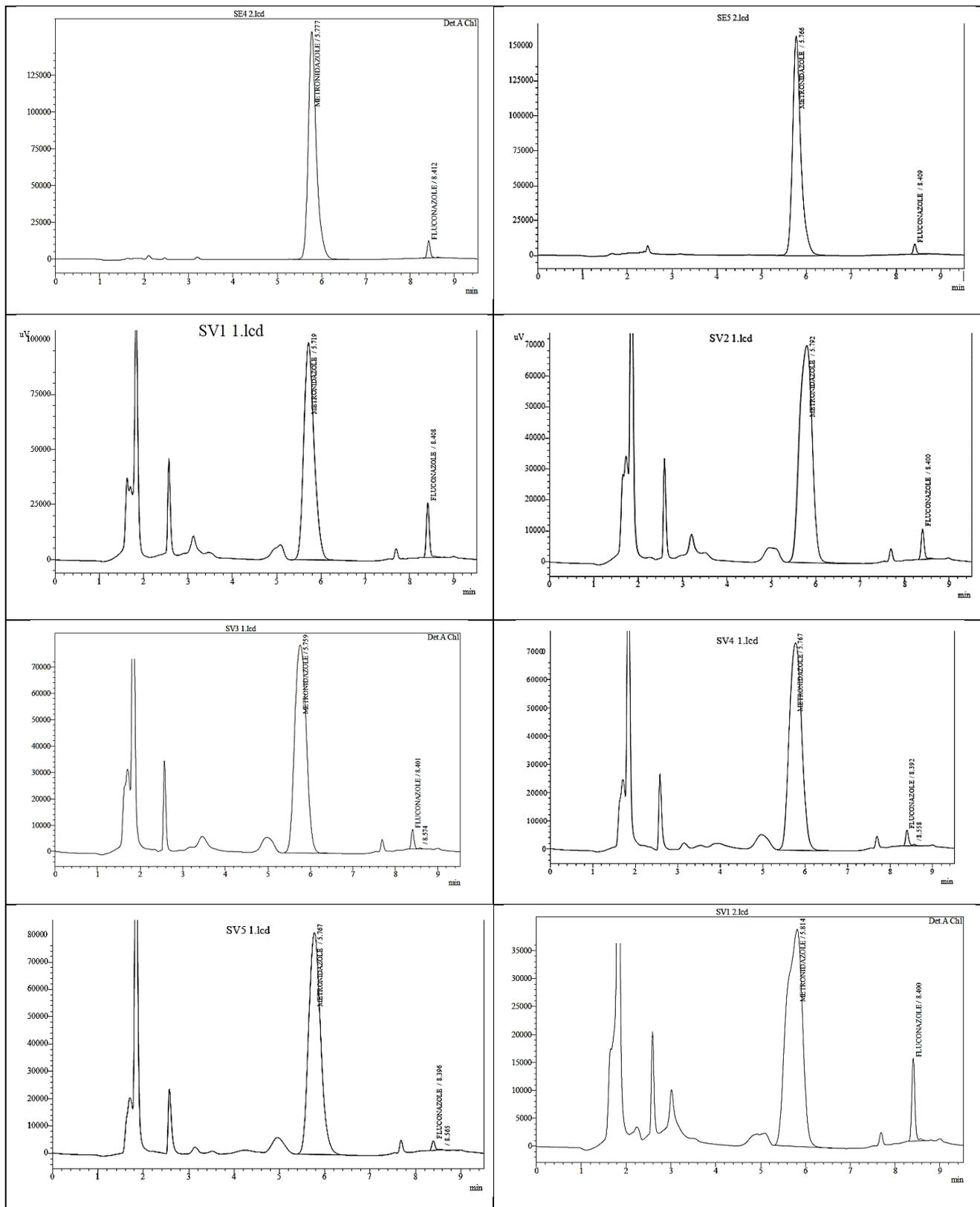


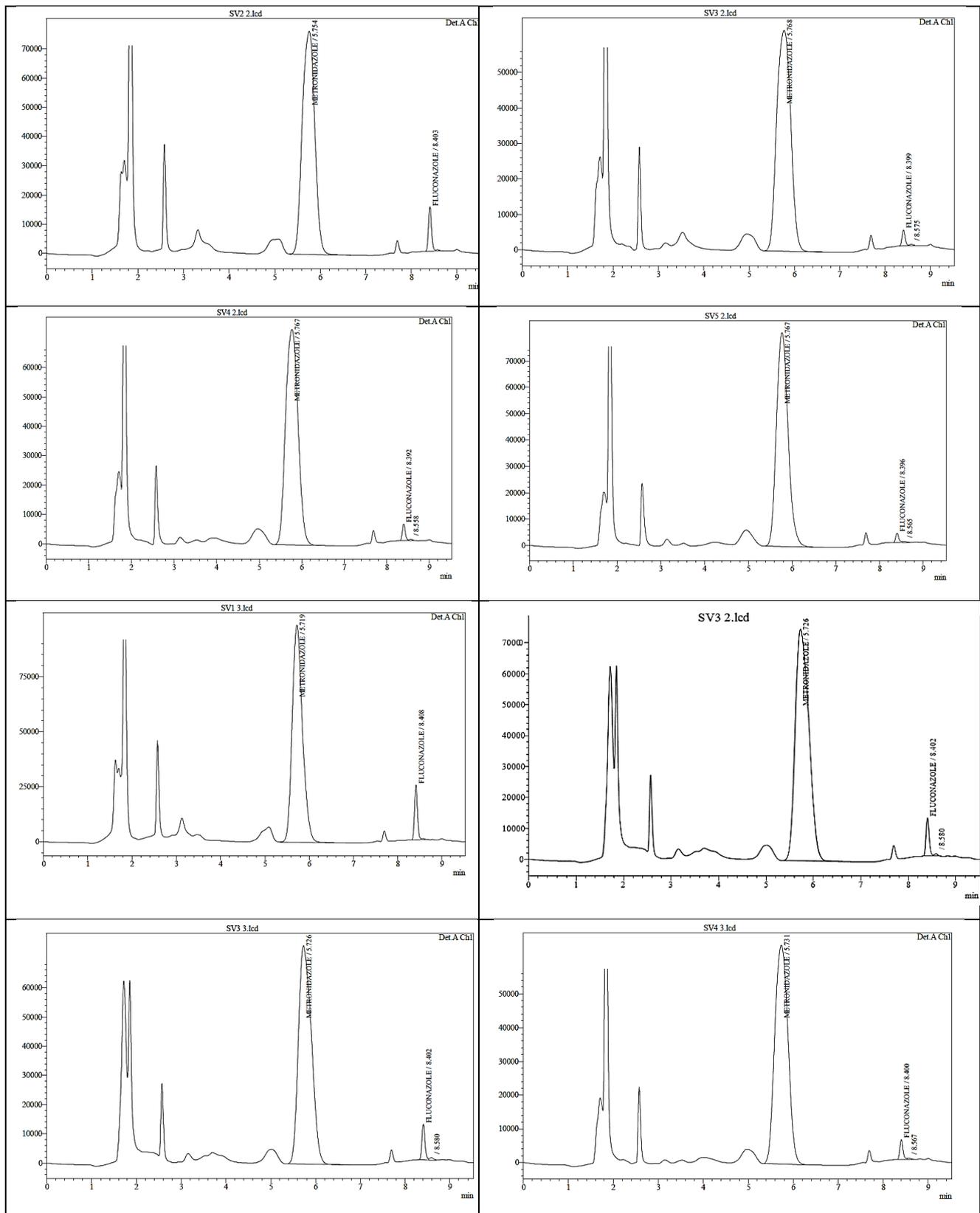
$\frac{P}{v}$	0,90	0,80	0,70	0,60	0,50	0,40	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	0,325	0,510	0,727	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619
2	0,142	0,289	0,445	0,617	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,598
3	0,137	0,277	0,424	0,584	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,929
4	0,134	0,271	0,414	0,569	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,132	0,267	0,408	0,559	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,265	0,404	0,553	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,263	0,402	0,549	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,130	0,262	0,399	0,546	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,261	0,398	0,543	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,260	0,397	0,542	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,260	0,396	0,540	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,259	0,395	0,539	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,259	0,394	0,538	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,258	0,393	0,537	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,258	0,393	0,536	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,258	0,392	0,535	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,257	0,392	0,534	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,127	0,257	0,392	0,534	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,257	0,391	0,533	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,257	0,391	0,533	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,257	0,391	0,532	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,256	0,390	0,532	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,256	0,390	0,532	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767
24	0,127	0,256	0,390	0,531	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,256	0,389	0,531	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690
28	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659
30	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	0,126	0,255	0,388	0,529	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
80	0,126	0,254	0,387	0,527	0,679	0,848	1,046	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460
120	0,126	0,254	0,386	0,526	0,677	0,845	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373
∞	0,126	0,253	0,385	0,524	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291

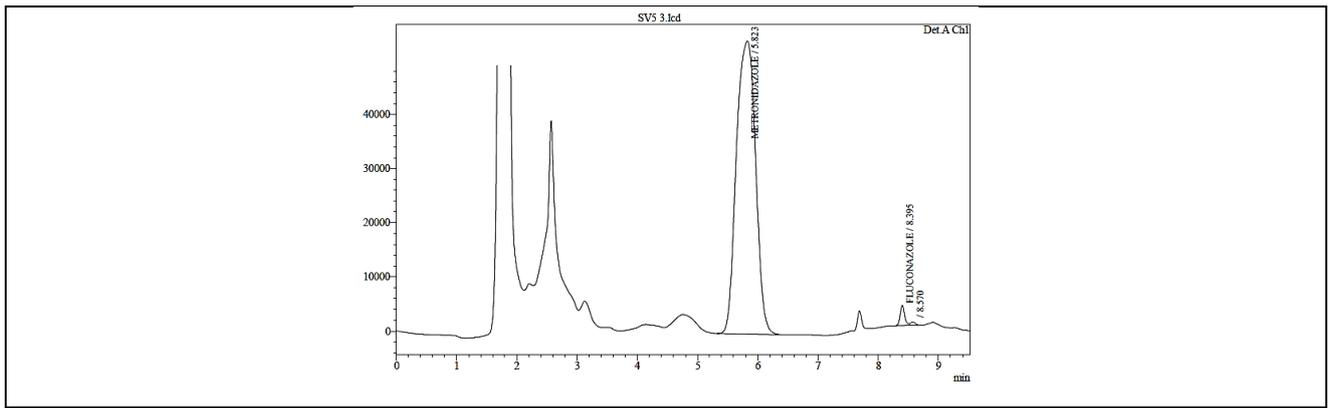
ANNEXE VI :
Les Chromatogrammes

Série 01

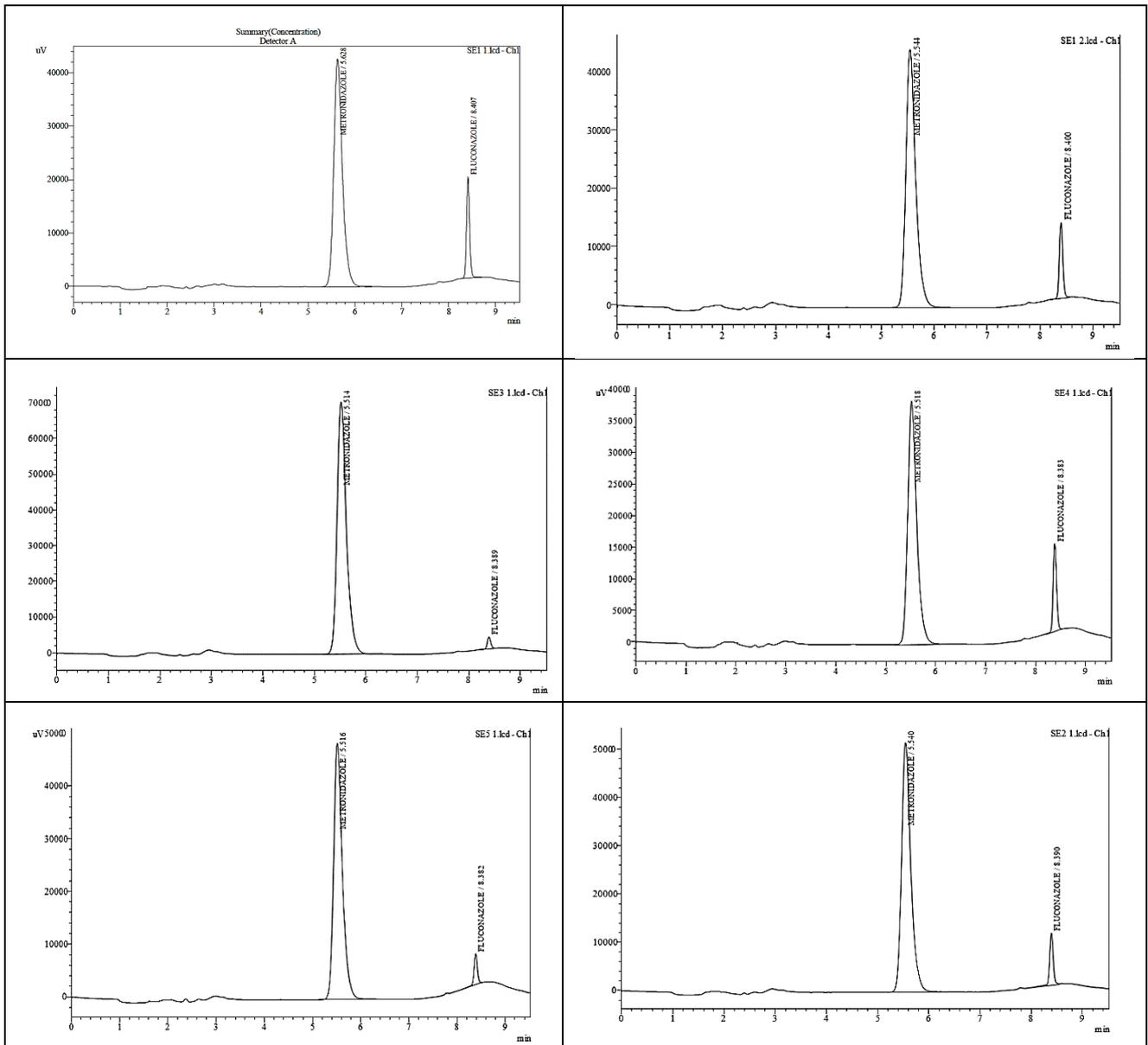


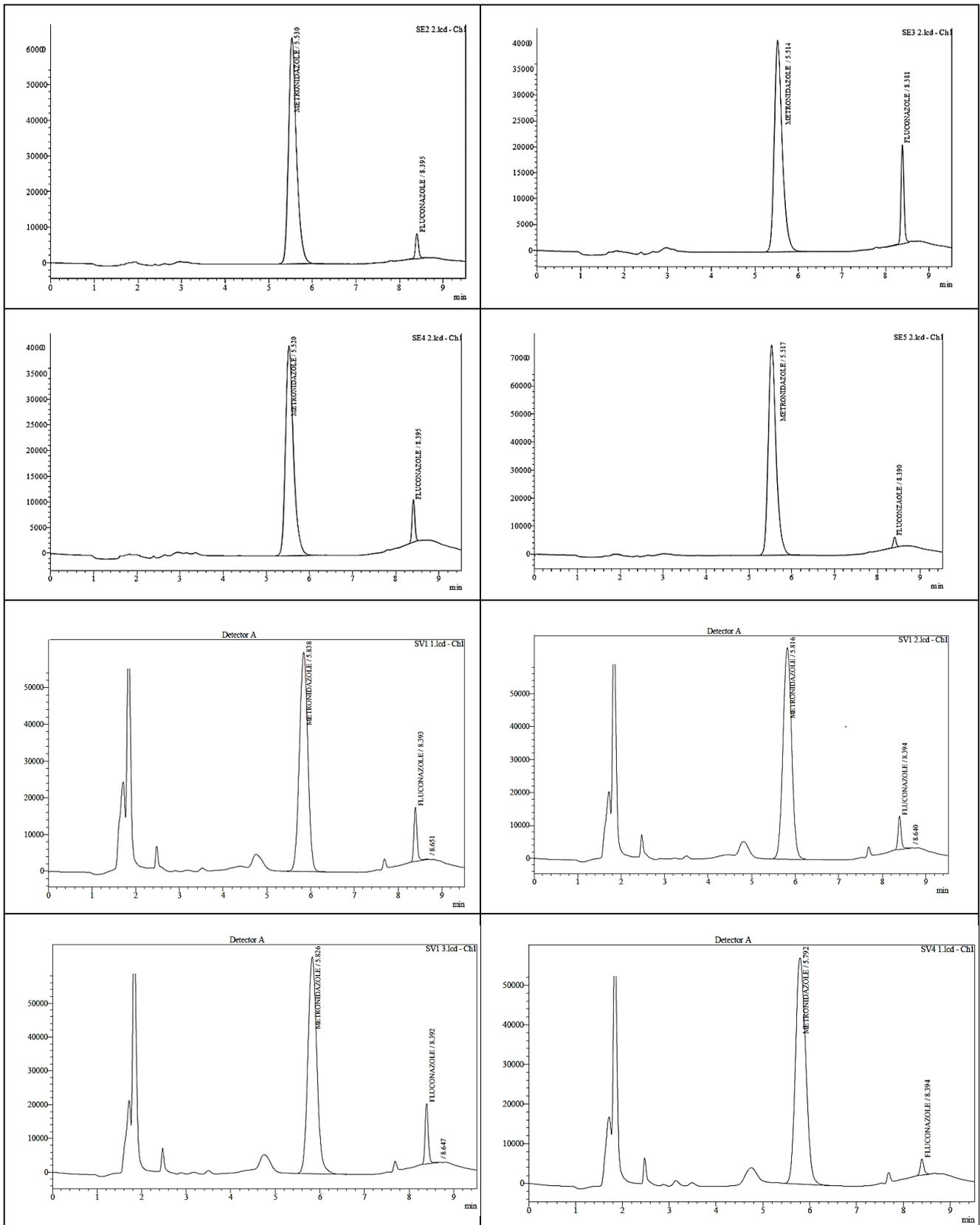


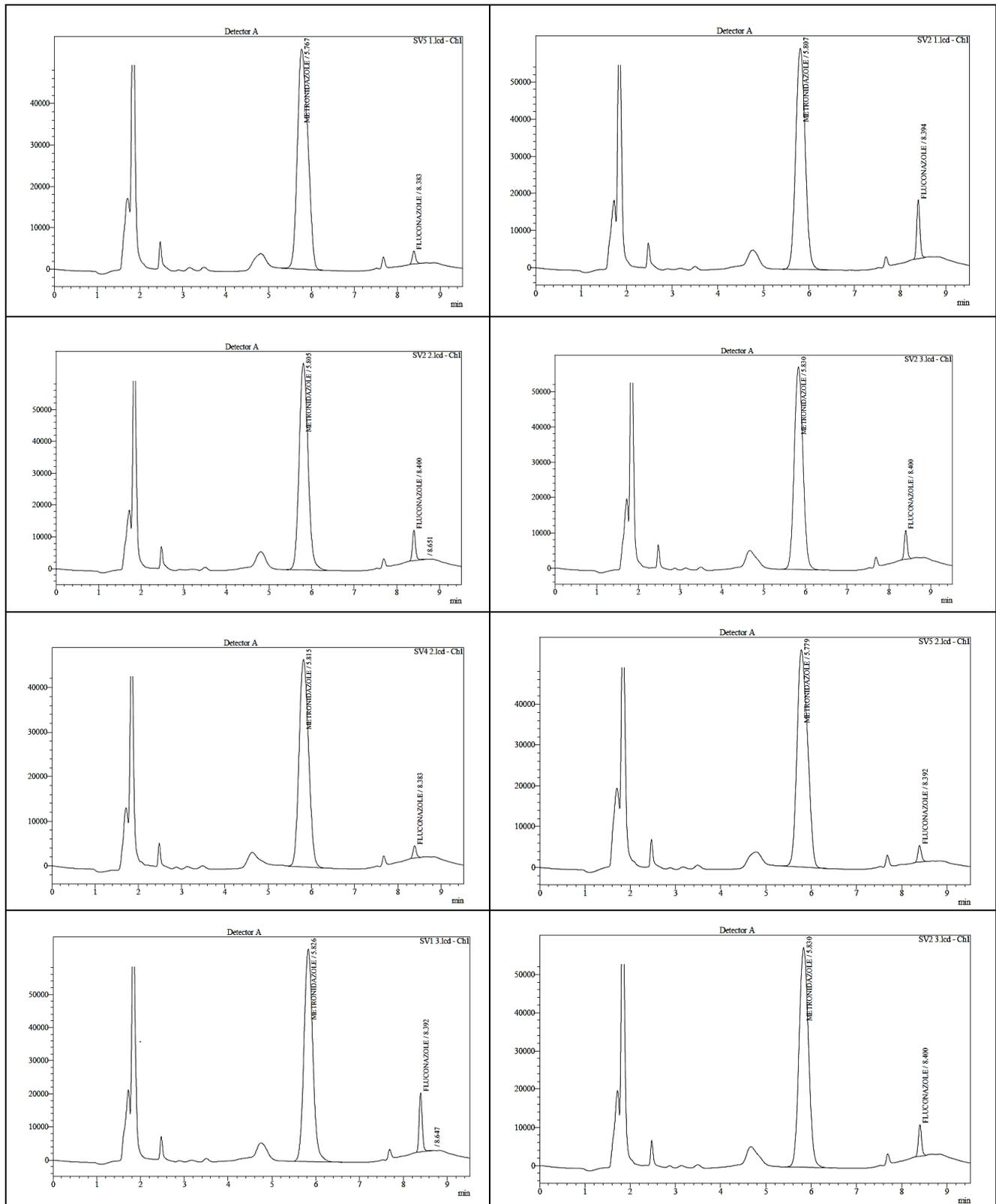


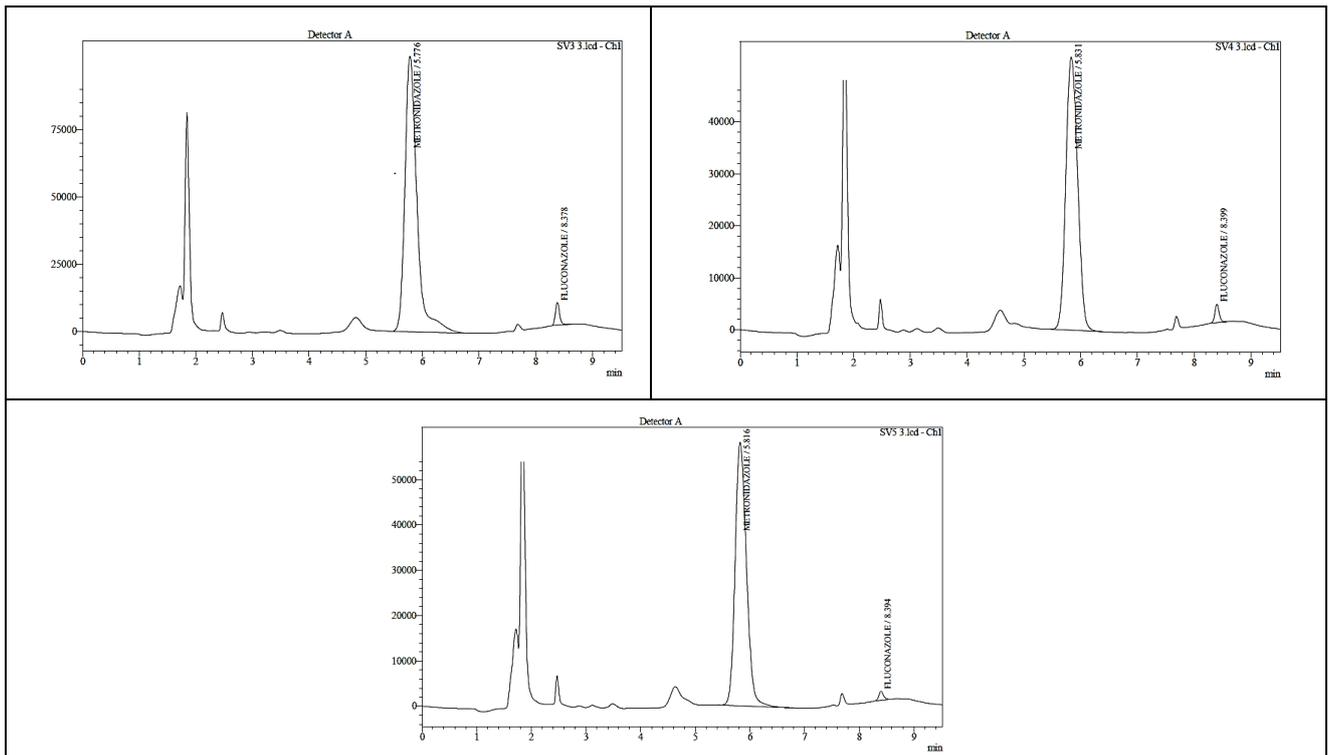


Série 02

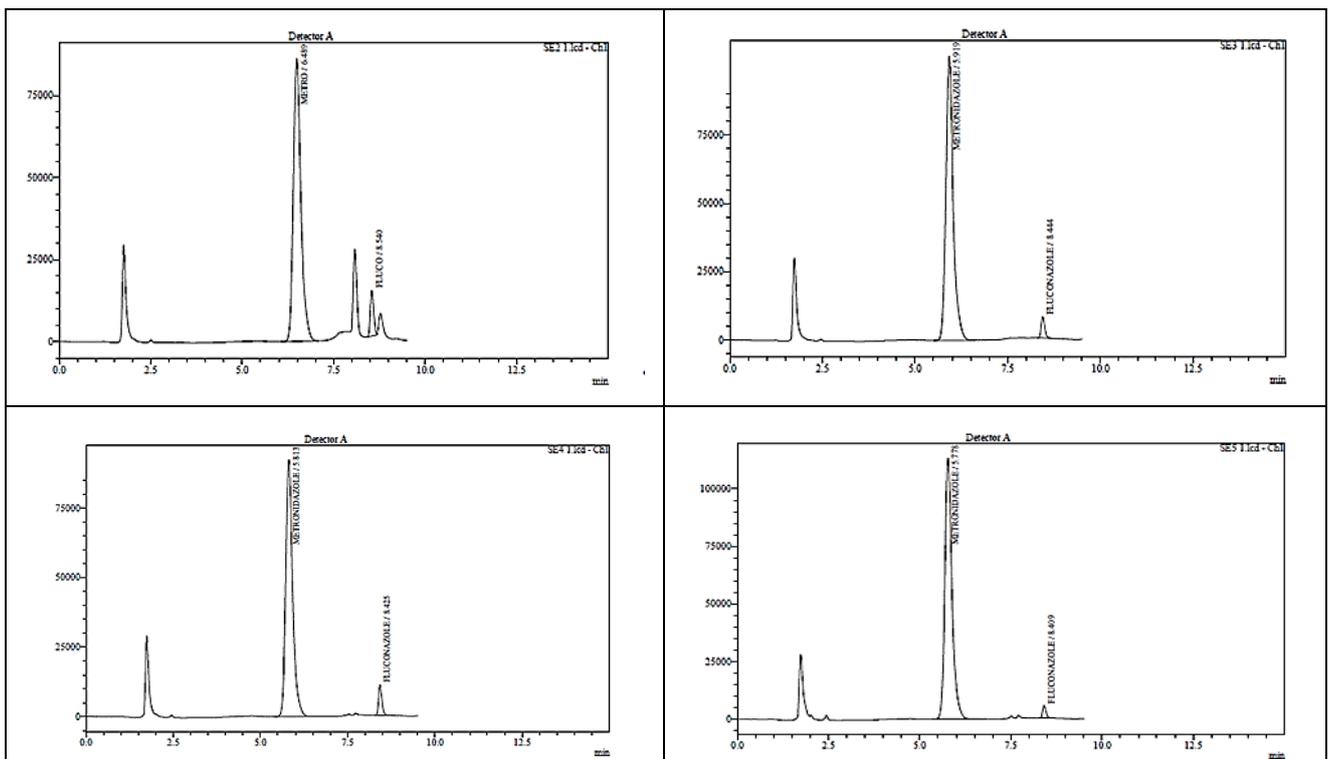


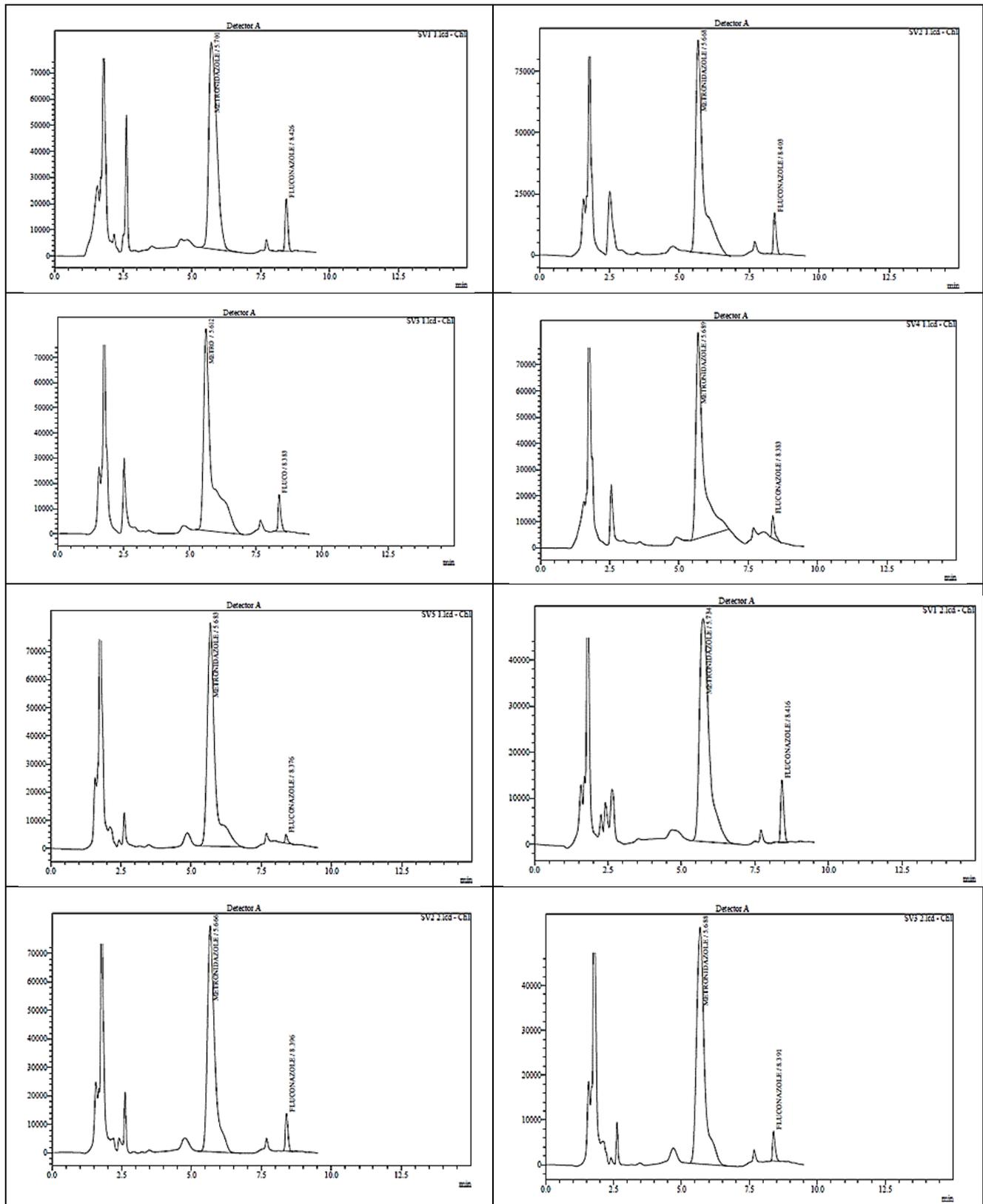


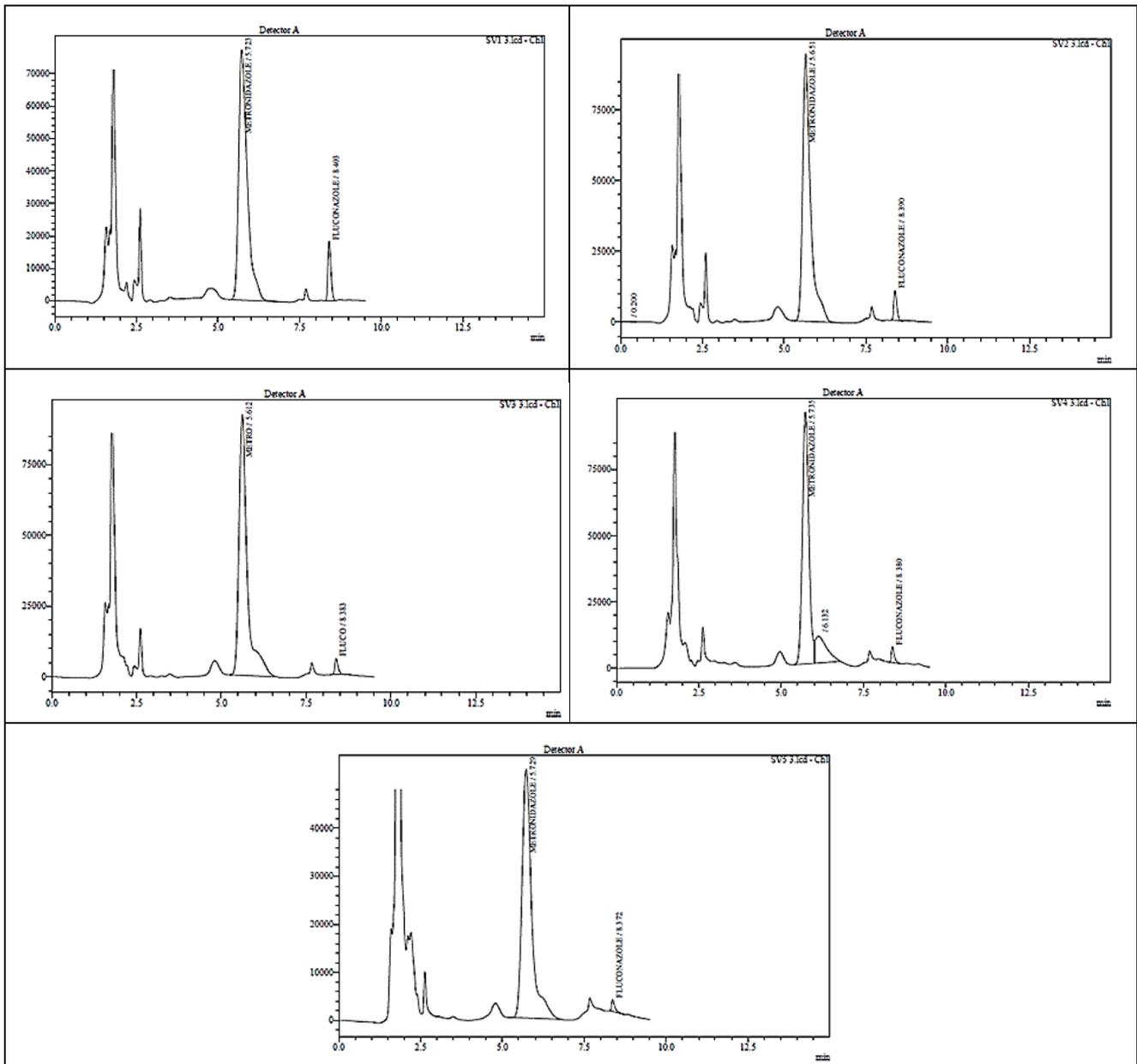




Série 03

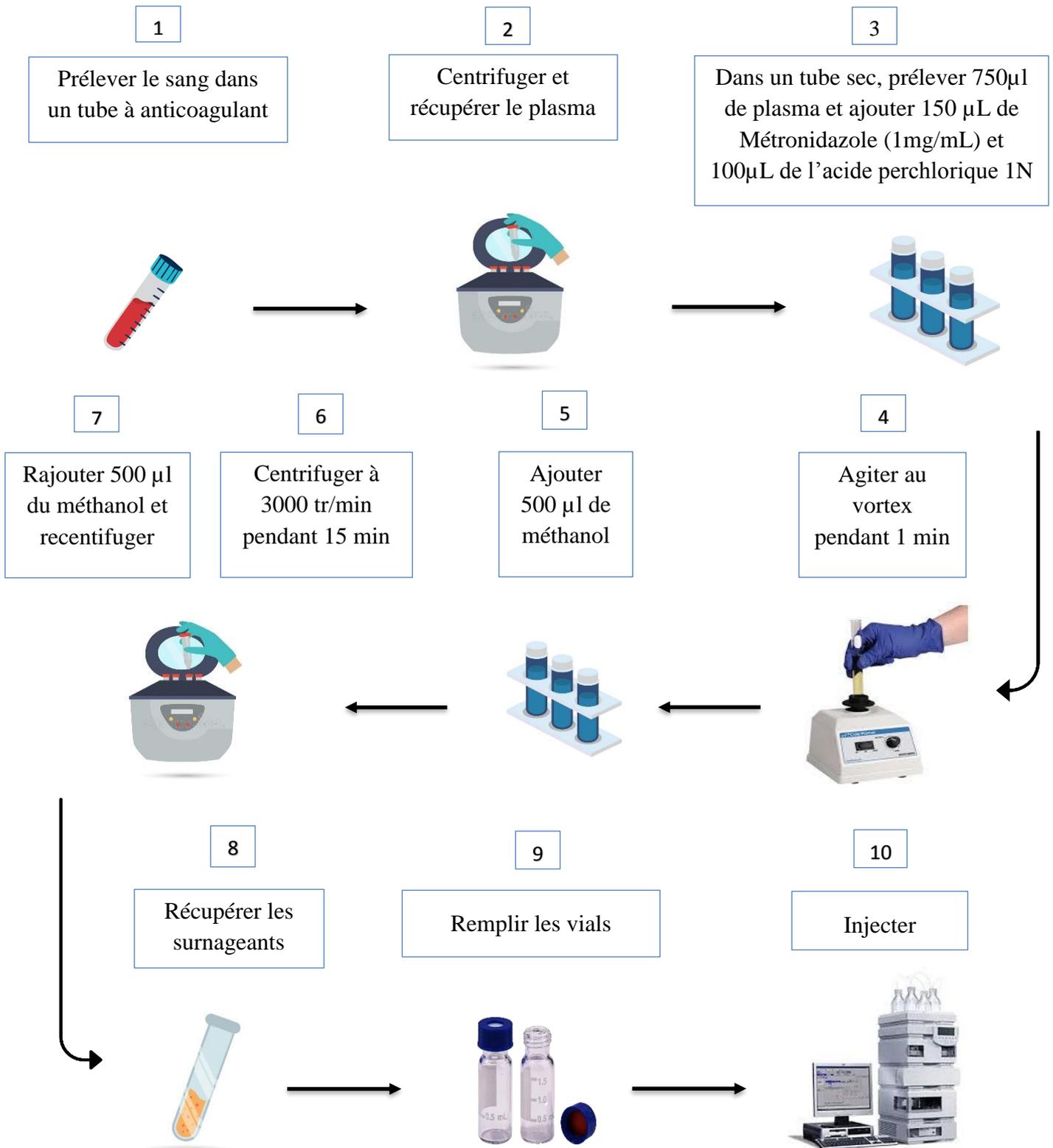






ANNEXE VII :
Fiche Technique

Protocole expérimental



Résumé

Ce travail expérimental mené aux Laboratoires de Chimie Analytique et de Biochimie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou s'inscrit dans le domaine de la validation analytique. Son objectif principal est de mettre au point, d'optimiser et de valider une méthode de dosage du Fluconazole dans le plasma par Chromatographie Liquide Haute Performance HPLC qui sera appliqué pour le suivi thérapeutique de ce dernier. Le profil d'exactitude ou l'erreur totale est utilisé comme outil de décision. La sélectivité de la méthode analytique est évaluée au préalable. Elle est suivie de l'évaluation de la fidélité et de la justesse de cette dernière à partir des standards d'étalonnage et standards de validation. Ces derniers sont utilisés pour estimer les paramètres statistiques des différents modèles d'étalonnage et pour la construction du profil d'exactitude. Cette expérience a satisfait tous les critères du profil d'exactitude et compte tenu du haut niveau de fiabilité et de précision des résultats obtenus, la méthode a été démontrée juste, fidèle et exacte sur un intervalle de dosage de [25,05 ; 100] mg/L dans les limites d'acceptabilité de +/-15% et un degré de confiance de 85%. Il s'ensuit que la méthode de dosage est valide et adaptée pour le suivi thérapeutique du Fluconazole dans le plasma humain.

Mots clés : Fluconazole, validation, HPLC, dosage, plasma, profil d'exactitude.

Abstract

This experimental work carried out at the Analytical Chemistry and Biochemistry Laboratories of the Mouloud Mammeri University of Tizi-Ouzou falls within the field of analytical validation. Its main objective is to develop, optimize and validate a method for the determination of Fluconazole in plasma by High Performance Liquid Chromatography HPLC which will be applied for the therapeutic monitoring of the latter. The accuracy profile or total error is used as a decision tool. The selectivity of the analytical method is assessed beforehand. It is followed by the evaluation of the precision and trueness of the latter from the calibration standards and validation standards. These are used to estimate the statistical parameters of the various calibration models and for the construction of the accuracy profile. This experiment satisfied all the criteria of the accuracy profile and considering the high level of reliability and precision of the results obtained, the method has been demonstrated to be true, precise and accurate over a dosing interval of [25,05; 100] mg/L within the acceptability limits of +/-15% and a confidence probability of 85%. It follows that the assay method is valid and suitable for the therapeutic monitoring of Fluconazole in human plasma.

Keywords: Fluconazole, validation, HPLC, assay, plasma, accuracy profile.