Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie

Isabelle Pinguet

▶ **To cite this version:**

Isabelle Pinguet. Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01188779

HAL Id: dumas-01188779

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01188779

Submitted on 31 Aug 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BORDEAUX

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2015 Thèse n°55

THÈSE pour l'obtention du

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

le 29 mai 2015 à Bordeaux, par

ISABELLE PINGUET

Née le 22/02/1988 à Saintes (Charente-Maritime)

Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie

Directeur de thèse

Mme Catherine Chèze

Membres du jury

Mme Catherine Chèze,	Président & Directrice
Mme Evelyne Laborde,	Assesseur
M. Jean-Pierre Dubost,	Assesseur

REMERCIEMENTS

A Madame Catherine Chèze,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider et diriger cette thèse.

Soyez assurée, Madame, de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

A Madame Evelyne Laborde,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury et de m'avoir accompagnée tout au long du travail de préparation de cette thèse.

Je te remercie sincèrement de ton soutien et de tes encouragements.

A Monsieur Jean-Pierre Dubost,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury.

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

A ma mère,

Merci pour ton soutien inconditionnel pendant toutes mes études de pharmacie et cette thèse. Si je peux écrire ces mots aujourd'hui, c'est grâce à toi.

A mon père et à ma sœur,

Merci pour vos encouragements et votre soutien malgré la distance qui nous sépare.

A mes amis de fac et d'ailleurs,

Merci pour toutes ces années passées ensemble. Je n'oublierai jamais les bons moments que l'on a partagés, ni ceux qui restent à venir.

A Cécile Miette,

Merci pour ton aide et ta disponibilité pendant et après mon stage. Ce travail a pu être réalisé grâce à toi et je t'en remercie.

A Aurélien,

Merci d'être toujours là pour moi.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction 11
Partie I. : La validation des méthodes analytiques 12
I.1. Généralités 12
I.1.1. Définitions 12
I.1.2. Contexte réglementaire 14
I.1.3. Objectifs d'une validation analytique 15
I.1.4. Concept de « fitness-for-purpose » 17
I.2. Cycle de vie d'une méthode 18
I.2.1. Sélection de la méthode 18
I.2.2. Mise au point de la méthode 19
I.2.3. Validation de la méthode 19
I.2.4. Estimation de l'incertitude et vérification de l'aptitude 20
I.2.5. Utilisation en routine 21
I.2.6. Revalidation 21
I.3. Etalonnage d'une méthode 22
I.3.1. Notion de résidu 22
I.3.2. Calcul du modèle d'étalonnage 23
I.3.3. Méthode des moindres carrés classique 24
I.3.4. Méthode du maximum de vraisemblance 24
I.3.5. Erreur résiduelle et coefficient de détermination 25
I.4. Fidélité d'une méthode 26
I.4.1. Conditions d'estimation de la fidélité 26
I.4.2. Calcul de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire 27
I.4.3. Interpréter une valeur de fidélité 28
I.5. Justesse d'une méthode 30
I.5.1. Expression de la justesse 30
I.5.2. Spécificité, erreur systématique 30
I.6. Profil d'exactitude 33
I.6.1. Objectifs de la validation 33
I.6.2. Plan d'expérience de validation, plan d'expérience d'étalonnage 34

I.6.3. Etalonnage inverse 35
I.6.4. Critères de validation et intervalle de tolérance 36
I.6.5. Construction du profil d'exactitude et interprétation des résultats. 38
I.7. Incertitude de mesure 42
I.7.1. Généralités 42
I.7.2. Utilisation du profil d'exactitude 42
Partie II. 2ème partie : Contrôle de la qualité des médicaments à base de plantes 44
II.1. Généralités 44
II.1.1. Définitions 44
II.1.2. Contexte réglementaire 45
II.1.3. Constituants des médicaments à base de plantes 48
II.1.4. Catégories de HMP 49
II.2. Variabilité des plantes : notion de chimiotype 51
II.2.1. Principe 51
II.2.2. Impact sur le contrôle qualité des HMP 51
II.3. Contrôle qualité des médicaments à base de plantes 53
II.3.1. Principe 53
II.3.2. Problèmes rencontrés 53
II.3.3. Identification par fingerprint 54
II.4. Dosage des HMP 56
II.4.1. Principe 56
II.4.2. Choix du composé à doser 56
II.4.3. Utilisation de marqueurs : principe et limites 57
II.4.4. Développement de la méthode de dosage 58
II.4.5. Validation de la méthode de dosage 60
II.4.6. Critères d'acceptation 60
Partie III. 3ème partie : Validation analytique des produits à base de plantes 62
III.1. Généralités 62
III.2. Applicabilité du protocole de validation SFSTP 2003-2006 à la validation des médicaments à base de plantes 64
III.2.1. Etablissement du protocole de validation 64
III.2.2. Statistiques 68

III.2.3. Conclusion 68
III.3. Etude pratique : validation analytique d'un produit de phytothérapie 69
III.3.1. Matériel et méthodes 69
III.3.2. Résultats 73
III.3.3. Conclusions 82
Conclusion 84
Bibliographie 85

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 Exemples de fonctions de réponse 23
Tableau 2 Profil du gradient d'élution pour l'analyse quantitative par HPLC du marqueur 72
Tableau 3 Résultats de l'étude de spécificité 73
Tableau 4 Résultats des comparaisons des droites $[Z = f(X)]$ 75
Tableau 5 Résultats de l'étude statistique sur la droite $[Z = f(X)]$ 76
Tableau 6 Recouvrements entre X et Z 77
Tableau 7 Etude statistique de fidélité par série 78
Tableau 8 Etude statistique de justesse et de fidélité par niveau de concentration 79
Tableau 9 Calcul de l'intervalle de tolérance 80

TABLE DES FIGURES

Figure 1 Droite de justesse 32
Figure 2 Profil d'exactitude 39
Figure 3 Impact de la proportion β sur le profil d'exactitude 40
Figure 4 Exemples de choix possibles pour les niveaux de concentration des standards en fonction du type de procédure (Reproduction du Tableau IV du guide SFSTP 2003 [3]) 65
Figure 5 Nombres recommandés de séries et de répétitions par série (Reproduction du Tableau VII du guide SFSTP 2003 [3]) 67
Figure 6 Droite $\left[Z = f\left(X\right)\right]$ 75
Figure 7 Profil d'exactitude 81

LISTE DES ABREVIATIONS

AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
EMA	European Medicines Agency
IC	Intervalle de Confiance
ICH	International Conference on Harmonisation
IT	Intervalle de Tolérance
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
PTFE	PolyTétraFluoroEthylène
PVDF	PolyVinyliDene Fluoride
SE	Standard d'Etalonnage
SFSTP	Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques
SPE	Solid Phase Extraction
SV	Standard de Validation

INTRODUCTION

Le contexte industriel impose aux entreprises pharmaceutiques de démontrer que l'ensemble des procédés et des méthodes utilisés pour l'élaboration d'un produit de santé conduit effectivement au résultat attendu.

Les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de prouver que les méthodes d'analyses employées sont parfaitement valides et fiables.
Si la qualité d'une méthode analytique n'est pas confirmée, la décision de conformité ou non des produits finis basée sur les données obtenues par le Contrôle Qualité en utilisant cette procédure analytique devient contestable. C'est pourquoi l'assurance de la fiabilité de la méthode garantie par la validation est non seulement une exigence réglementaire, mais également un critère essentiel de l'assurance de la Qualité.
Actuellement, de nouvelles tendances et de nouveaux concepts scientifiques apparaissent afin de faire évoluer la validation des méthodes analytiques, avec notamment l'apparition de l'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision.

Ces nouveaux outils et concepts ont pour la plupart comme objectif commun de remettre les résultats obtenus au centre de la notion de validation analytique. Les anciennes procédures de validation, plus orientées vers la qualité de l'analyse statistique, ne tiennent pas suffisamment compte du produit concerné, de ses spécificités, et de la qualité des résultats qui seront finalement obtenus avec la méthode analytique validée.

C'est dans ce contexte de refonte des méthodologies de validation que se positionne cette thèse, en proposant d'appliquer ces nouveaux concepts et outils aux validations analytiques de produits aux caractéristiques bien spécifiques et jusqu'alors oubliés des guides de validation : les produits de phytothérapie, ou médicaments à base de plante(s).

PARTIE I. : LA VALIDATION DES MÉTHODES ANALYTIQUES

I.1. GÉNÉRALITÉS

I.1.1. DÉFINITIONS

La clause 5.4.5.1. de la norme ISO 17025:2005 définit ainsi la **validation** :
« 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 » [1].
La validation analytique d'une méthode correspond à l'étude de plusieurs critères de validation définis ci-après.

La **spécificité** ou sélectivité d'une procédure analytique est sa capacité à permettre l'évaluation univoque de la substance à analyser en présence d'autres composés potentiellement présents [2].

La **linéarité** d'une procédure d'analyse est sa capacité à prédire des concentrations retrouvées proportionnelles aux concentrations théoriques d'une série d'échantillons [2].

La **justesse** d'une méthode exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée soit comme vraie, soit comme valeur de référence, et la valeur trouvée [3].

La **fidélité** exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Elle est exprimée en termes de coefficient de variation à partir d'une série de mesures.
La fidélité peut être évaluée à trois niveaux :

- la **répétabilité** exprime la fidélité sous des conditions opératoires identiques et sur un court intervalle de temps ;
- la **fidélité intermédiaire** exprime les variations intra-laboratoires : jours différents, analystes différents, équipements différents… ;

- la **reproductibilité** exprime la fidélité inter-laboratoire.

L'**exactitude** d'une méthode combine justesse et fidélité d'un mesurage.

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

La **limite de quantification** est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie.

Un **mesurage** est un processus consistant à obtenir expérimentalement une ou plusieurs valeurs que l'on peut raisonnablement attribuer à une grandeur [4].

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

La **limite d'acceptabilité** d'une méthode sert à chiffrer ses objectifs. Il s'agit d'une valeur seuil globale exprimée le plus souvent sous forme de pourcentage, fixée de préférence par l'utilisateur du résultat.

L'**incertitude** est un paramètre associé au résultat d'une mesure qui caractérise la dispersion des valeurs que l'on peut raisonnablement attribuer à un mesurage [5].

L'intervalle de confiance (IC) déterminé au risque α % est un intervalle de valeurs qui a (1-α) % de chance de contenir la vraie valeur du paramètre estimé : par exemple, l'intervalle de confiance déterminé au risque de 5% à 95% de chance de contenir la vraie valeur du paramètre estimé

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

Le **profil d'exactitude** est la combinaison, sous la forme d'un graphique, de plusieurs intervalles de tolérance calculés à différents niveaux de concentration et d'une limite d'acceptabilité.

Son but est d'estimer, à partir des résultats obtenus lors de la validation, quelle garantie aura l'utilisateur que la méthode utilisée en routine fournira des résultats acceptables.

L'**étalonnage** est l'opération qui, dans des conditions spécifiées, établit en une première étape une relation entre les valeurs et les incertitudes de mesures associées qui sont fournies par des étalons, et les réponses correspondantes avec leurs incertitudes associées. Dans une seconde étape, cette information est utilisée pour établir une relation permettant d'obtenir un résultat de mesure à partir d'une réponse [4].

Si l'on considère une série d'observations suivant une distribution statistique, le **quantile** *q(p)* est défini comme étant la valeur telle qu'une proportion *p* des observations est plus petite que *q(p)* [6].

La **fonction de réponse** d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existant entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon [3].

I.1.2. CONTEXTE RÉGLEMENTAIRE

Des directives sur la validation des méthodes analytiques sont fournies dans des publications comme les guidelines ICH, notamment le guideline ICH Q2 (R1) paru en 2005 : « Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology » [2].
Son but est de fournir des recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique. En outre, le document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d'enregistrement.
Ce guideline ICH est une exigence réglementaire, toute validation de méthode analytique présentée dans un dossier d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) doit répondre à ses exigences.
Il existe également des publications ne constituant pas des exigences réglementaires, comme les guides de validation analytique de la SFSTP :

- SFSTP « Guide de validation analytique – Rapport d'une commission SFSTP »

    - I. Méthodologie, paru dans STP Pharma Prat. en 1992 [7] ;
    - II. Exemples d'application, paru dans STP Pharma Prat. en 1992 [8] ;
- SFSTP « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP » paru dans STP Pharma Prat. en 1997 [9] ;
- SFSTP « Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches »
    - I. Généralités, paru dans STP Pharma Prat. en 2003 [3] ;
    - II. Statistiques, paru dans STP Pharma Prat. en 2006 [10] ;
    - III. Exemples d'application, paru dans STP Pharma Prat. en 2006 [11] ;
    - IV. Exemples d'application, paru dans Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis en 2008 [12].

Ces guides ont été élaborés dans le but d'aider les industriels à valider leurs procédures analytiques en appliquant les recommandations réglementaires, dans le but d'obtenir une AMM.

I.1.3. OBJECTIFS D'UNE VALIDATION ANALYTIQUE

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

Elle permet de garantir que chaque mesure qui doit être réalisée en routine est comprise dans une limite d'acceptation appropriée au type de procédure analytique et au produit concerné. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions et le but dans lesquels la méthode sera utilisée.

Ces principes s'appliquent à toutes les méthodes utilisées par un fabricant de médicaments, qu'elles soient ou non décrites dans une pharmacopée.

Les objectifs de la validation ne sont pas seulement d'obtenir une estimation de la justesse, du biais ou de la fidélité de la méthode, mais également d'évaluer le risque statistique lié à son utilisation, qui peut être exprimé par l'incertitude de mesure associée au résultat [13].

Par rapport aux méthodes de validation classiques antérieures basées sur l'estimation des critères de validation tels que la justesse, la fidélité ou la linéarité, l'introduction du concept de profil d'exactitude représente une avancée pour l'évaluation de ce risque. L'idée principale derrière ce concept est qu'une procédure analytique peut être validée s'il est très probable, ou bien s'il existe un risque limité, que la différence entre chaque mesure X d'un échantillon et sa vraie valeur inconnue μ soit à l'intérieur de limites d'acceptabilité prédéfinies, selon les objectifs de la méthode. Il est alors possible de démontrer sans ambigüité le « fitness-for-purpose » de cette méthode [14].

I.1.4. CONCEPT DE « FITNESS-FOR-PURPOSE »

Il est reconnu que le but d'une validation de méthode analytique est de démontrer que la méthode est adaptée à son usage [15].

Cette affirmation se traduit par le concept de « fitness-for-purpose », dont l'IUPAC donne la définition suivante : *« degré auquel les données produites par un processus de mesure permettent à l'utilisateur de prendre des décisions techniques et administratives correctes dans un but spécifié »* [16].

On peut donc traduire cette notion par l'aptitude d'une méthode à l'usage auquel elle est destinée.

Une méthode analytique s'intégrera dans ce concept si les résultats qu'elle fournit correspondent aux exigences requises de son application.

Ceci suppose que ces exigences aient été établies au préalable. Il peut s'agir d'exigences réglementaires, avec par exemple des limites d'acceptabilité appliquées aux résultats, ou bien de performances déterminées par l'analyste au cours du développement de la méthode, comme par exemple le choix de la fonction de réponse la mieux adaptée pour la courbe d'étalonnage.

Nous verrons dans cette thèse comment l'application du protocole proposé par la SFSTP en 2003-2006, basé sur l'utilisation du profil d'exactitude et de l'intervalle de tolérance β, permet d'appliquer ce concept de « fitness-for-purpose » à la validation analytique.

I.2. CYCLE DE VIE D'UNE MÉTHODE

Le cycle de vie d'une méthode est un concept souligné dans la norme ISO 17025 [1]. L'idée de base est qu'une méthode d'analyse n'est pas statique, mais une entité vivante qui passe par plusieurs étapes interdépendantes. Ainsi, pour bien comprendre le rôle et la place de la validation, il convient de décrire les différentes étapes de ce cycle, depuis la création de la méthode analytique jusqu'à son remplacement par une autre. L'exemple d'une méthode de dosage est utilisé ci-après pour illustrer ces différentes étapes [14].

I.2.1. SÉLECTION DE LA MÉTHODE

Cette première étape va permettre de définir les objectifs de la méthode et les conditions opératoires initiales.
L'analyste va choisir parmi les diverses méthodes physico-chimiques possibles, la méthode la plus pertinente pour permettre le dosage de l'analyte à déterminer.
La norme ISO 17025 [1] précise que :

« Le laboratoire doit utiliser des méthodes d'essai et/ou d'étalonnage, y compris des méthodes d'échantillonnage, qui répondent aux besoins du client et qui conviennent aux essais et/ou étalonnages qu'il effectue, de préférence les méthodes publiées comme normes internationales, régionales ou nationales ».

Ce texte précise qu'il est préférable d'utiliser des méthodes officielles, lorsque cela est possible. Cependant, l'utilisation de méthodes développées par le laboratoire est acceptée.
Dans ce deuxième cas, le développement de la méthode doit être confié à du personnel qualifié, avec des ressources adéquates, et la démarche de développement ainsi que les résultats obtenus doivent être correctement renseignés.

I.2.2. MISE AU POINT DE LA MÉTHODE

Il s'agit d'une étape de développement de la méthode sélectionnée, afin d'optimiser les différents paramètres du protocole opératoire pour les adapter à la matrice des échantillons qui seront dosés ainsi qu'aux conditions opératoires d'utilisation de la méthode.

Il est important, lors de cette étape de développement, de suivre un cheminement précis et non pas de simplement réaliser des expériences aléatoires, afin de maîtriser la programmation des essais et les délais.

En tenant compte de cette remarque, l'analyste peut utiliser des plans d'expériences, qui vont permettre d'optimiser le nombre d'expériences à réaliser pour trouver les valeurs optimales des variables susceptibles d'influencer le paramètre à optimiser.

Au terme de cette seconde étape, l'analyste devrait avoir recueilli des informations de base sur les performances de la procédure analytique, concernant la pertinence du modèle de régression utilisé pour établir la fonction de réponse, la variabilité des résultats, la limite de quantification et l'intervalle de dosage.

Ces prérequis vont ainsi constituer une base pour l'étape suivante, qui est la phase de validation proprement dite.

I.2.3. VALIDATION DE LA MÉTHODE

L'étape de validation intervient après le développement d'une nouvelle procédure d'analyse. En effet, les performances de la méthode vont évoluer tout au long du cycle de vie, et plus particulièrement au cours des deux premières étapes. Ainsi, la fiabilité du résultat analytique fourni par la méthode doit être améliorée lors de ces premières phases, pour tendre vers une confiance accrue qui sera attestée durant cette troisième étape de validation.

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

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

I.2.4. ESTIMATION DE L'INCERTITUDE ET VÉRIFICATION DE L'APTITUDE

L'estimation de l'incertitude de mesure, tout comme la validation analytique, est une exigence de la norme ISO 17025 qui indique que :

« les laboratoires d'essais doivent aussi posséder et appliquer des procédures pour estimer l'incertitude de mesure » [1].

Cette incertitude permet d'estimer la capacité de mesure de la méthode, et l'adéquation des résultats qu'elle fournit avec les exigences qui lui sont liées. En ce sens, l'estimation de l'incertitude de mesure et la vérification de l'aptitude de la méthode rejoignent le concept de « fitness-for-purpose » développé à la section I.1.4.
L'estimation de l'incertitude de mesure et la validation analytique de la méthode sont des concepts interdépendants, et le protocole développé par la commission SFSTP et publié en 2003-2006 lors de la démarche d'harmonisation des validations analytiques permet de les combiner.
Ainsi, l'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision illustre comment l'incertitude peut être obtenue à partir des résultats de validation. Le calcul de

l'intervalle de tolérance selon la méthode développée par Mee (1984) [17] permet de démontrer clairement le « fitness-for-purpose » de la méthode [5].

I.2.5. UTILISATION EN ROUTINE

L'objectif d'une méthode analytique n'est pas sa validation, mais bien son utilisation en routine pour l'analyse d'échantillons de valeur vraie inconnue. Le passage en routine de la méthode s'inscrit dans le cadre d'un système de contrôle de la qualité qui a pour objectifs de valider les résultats obtenus sur des échantillons inconnus, et de contrôler les performances de la méthode analytique au fil du temps.

I.2.6. REVALIDATION

Au cours de l'utilisation en routine de la méthode analytique, certaines améliorations peuvent être apportées à la méthode. Ces modifications vont alors conduire à une procédure plus ou moins complète de revalidation. Un test simple devra être effectué pour déterminer l'impact de ces modifications. En règle générale, une modification de réglage est considérée comme mineure, tandis qu'une modification affectant le principe de la méthode est considérée comme majeure. Dans ce dernier cas, une procédure de validation complète devra de nouveau être appliquée.

I.3. ETALONNAGE D'UNE MÉTHODE

La majorité des méthodes d'analyse quantitatives ne mesure pas directement une quantité absolue de l'analyte recherché, mais procède indirectement par comparaison avec une quantité connue de l'analyte. La validation de ces méthodes comporte donc nécessairement une étape d'étalonnage, qui consiste à construire un modèle permettant de prédire la concentration inconnue d'échantillons, par analogie avec des concentrations connues des solutions d'étalonnage.

I.3.1. NOTION DE RÉSIDU

En pratique, l'étalonnage est réalisé à partir de solutions de témoin de pureté connue, préparées à des concentrations connues, et appelées Standards d'Etalonnage (SE).

L'analyse de ces SE va donner une réponse observée mesurée par l'appareillage. Cette réponse est constituée de plusieurs composantes :

- une fonction de réponse déterministe, basée sur les « lois » chimiques, physiques et/ou biologiques ;
- un bruit de fond aléatoire équivalant à une erreur expérimentale.

Pour évaluer cette dualité, on introduit la notion de **résidu** [4].

Le résidu est la différence entre la valeur observée Y, donnée par l'appareillage, et la valeur théorique X de l'échantillon. Cette valeur théorique, également appelée valeur prédite, correspond à la composante déterministe de la réponse. Elle est calculée et non mesurée, et ne comprend donc pas de bruit de fond ou d'erreur expérimentale.

La variance des résidus, ou variance résiduelle, nous permet ainsi de mesurer la dispersion des résultats et d'évaluer la composante aléatoire de mesure.

I.3.2. CALCUL DU MODÈLE D'ÉTALONNAGE

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

$$Y = f(X) + \varepsilon \qquad \text{(Eq. 1)}$$

Avec ε, l'erreur résiduelle associée à la fonction de réponse. Cette fonction n'est pas nécessairement linéaire mais elle doit être strictement monotone sur l'intervalle de dosage envisagé.

La fonction de réponse doit être ajustée, c'est-à-dire que ses paramètres doivent être évalués de telle sorte que l'erreur résiduelle ε soit minimisée.

La procédure SFSTP 2003-2006 propose d'appliquer le concept de « fitness-for-purpose » pour choisir la fonction de réponse la mieux adaptée pour la courbe d'étalonnage, et ainsi avoir un modèle d'étalonnage permettant de minimiser ε et donc de calculer les concentrations prédites les plus correctes possibles [15].

Le Tableau 1 illustre quelques exemples des différentes fonctions de réponse pouvant être envisagées lors d'une validation de méthode analytique.

Tableau 1 Exemples de fonctions de réponse

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

Les modèles d'étalonnage vont être calculés pour chaque série de validation, et le calcul des concentrations prédites *X* des solutions d'échantillon, appelées

Standards de Validation (SV) devra être effectué en utilisant le modèle d'étalonnage de la série correspondante [18].
Les paramètres des fonctions de réponse vont être estimés soit par la méthode des moindres carrés classique, soit par la méthode du maximum de vraisemblance, comme recommandé dans la procédure SFSTP 2003-2006.

I.3.3. MÉTHODE DES MOINDRES CARRÉS CLASSIQUE

La méthode des moindres carrés est la méthode de calcul la plus utilisée pour l'estimation des paramètres d'un modèle à deux variables ayant un lien de causalité entre elles.
Cette méthode de calcul consiste à estimer les paramètres de la droite d'étalonnage en minimisant la somme des différences entre les valeurs observées et les valeurs prédites correspondantes, soit la somme des résidus E.

$$Y = X + E \qquad \text{Réponse observée (Eq. 2)}$$

$$E = Y - X \qquad \text{Résidu (Eq. 3)}$$

Les résidus pouvant être positifs ou négatifs, ils sont élevés au carré pour le calcul de leur somme afin d'éviter leur contrebalancement.
L'équation de la droite pour laquelle la somme de ces carrés est minimale permet d'obtenir des valeurs prédites au plus proche des vraies valeurs.

I.3.4. MÉTHODE DU MAXIMUM DE VRAISEMBLANCE

Le protocole SFSTP 2003-2006 recommande d'estimer les paramètres du modèle d'étalonnage en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance. L'estimation par maximum de vraisemblance repose sur la notion de vraisemblance d'un ensemble donné d'observations relatives à un modèle. Dans le cadre d'un étalonnage, cette méthode consiste à trouver les paramètres permettant de maximiser la fonction de vraisemblance associée au modèle d'étalonnage, qui représente la vraisemblance d'avoir obtenu les données que nous avons générées.

Les pré-requis de cette méthode sont d'une part la normalité de la réponse à chaque niveau de concentration, et d'autre part l'homogénéité des variances ou homoscédasticité.
Cependant, comme spécifié dans le protocole SFSTP 2003-2006, un modèle d'étalonnage fournissant de bons résultats sera préféré à un modèle ayant de bonnes qualités d'ajustement, même si les pré-requis ne sont pas respectés.

I.3.5. ERREUR RÉSIDUELLE ET COEFFICIENT DE DÉTERMINATION

En complément des paramètres de la fonction d'étalonnage, on peut obtenir d'autres statistiques, en particulier l'écart-type résiduel s_E. Cet écart-type permet d'évaluer la qualité de l'ajustement car il indique l'étroitesse de l'ajustement entre la droite calculée et les points expérimentaux.
Les variances résiduelles sont estimées pour chaque niveau de concentration, après alignement des valeurs :

$$s_E^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n} (Y_i - \overline{Y})^2}{I - 2}$$

Variance résiduelle (Eq. 4)

Avec I, le nombre de séries.
Cette variance résiduelle s_E^2 est un estimateur de la variance des erreurs expérimentales σ^2 [4].
La norme ICH Q2 (R1) demande également de calculer le coefficient de détermination R^2 de la droite pour évaluer la qualité de l'ajustement par série. Ce coefficient exprime la partie de la variance totale des réponses expliquée par le modèle. Il n'est cependant pas approprié, et un coefficient de type $R^2 > 0{,}99$ n'est pas un gage de qualité des résultats qui seront obtenus.
Un moyen simple de diagnostiquer un problème de régression est d'utiliser la représentation graphique des résidus des résultats. Pour un modèle adéquat, les résidus sont normalement distribués, donc leur représentation ne doit pas montrer de motif particulier [13].

I.4. FIDÉLITÉ D'UNE MÉTHODE

I.4.1. CONDITIONS D'ESTIMATION DE LA FIDÉLITÉ

Comme défini à la section I.1.1., la fidélité est une mesure de « l'écart entre des répétitions faites sur un même échantillon ». C'est une estimation de l'amplitude avec laquelle une méthode disperse les répétitions, et ainsi elle fournit des indications sur les erreurs aléatoires. Il est nécessaire de tenir compte de cette variabilité dans l'interprétation pratique des résultats d'un essai.

Il est important de garder à l'esprit que la fidélité d'une méthode dépend de nombreux facteurs, qui vont s'ajouter pour former un ensemble de sources de variation que l'on peut organiser selon les 5M :

1. La main d'œuvre. Des opérateurs bien entraînés et qualifiés sont plus à même de faire des mesures proches les unes des autres.
2. Le milieu. Un laboratoire dont l'agencement est bien adapté aux mesures effectuées permet de réduire la variabilité entre répétitions.
3. La méthode. Même si une méthode est normalisée, il existe de légères variations dans la façon de l'appliquer (réactifs, qualité de la préparation des solutions d'étalonnage…).
4. Le moyen. L'utilisation d'appareillage qualifié est fondamentale.
5. La matière. La conservation des échantillons au sein du laboratoire influence la variabilité des mesures.

L'estimation de la fidélité d'une méthode peut être effectuée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité. Trois conditions d'estimations de la fidélité peuvent alors être rencontrées :

- Condition de répétabilité : les sources de variations listées ci-dessus sont minimisées autant que possible.
- Condition de reproductibilité : contrairement au cas précédent, les sources de variations sont maximisées afin d'obtenir des mesures dans les conditions où le plus grand nombre de sources de variations sont intervenues.

- Condition intermédiaire de fidélité : dans ce cas également plusieurs sources de variations viennent interférer, mais les mesures sont effectuées au sein d'un même laboratoire.

Dans le cadre de la validation analytique d'une méthode destinée à être utilisée au sein d'un seul laboratoire, les conditions étudiées seront uniquement la répétabilité et la fidélité intermédiaire, correspondant au cas d'une validation intra-laboratoire qui est abordé en section I.2.3. La condition de reproductibilité est nécessaire uniquement dans le cadre d'une validation inter-laboratoire.

I.4.2. CALCUL DE LA RÉPÉTABILITÉ ET DE LA FIDÉLITÉ INTERMÉDIAIRE

Seul le cas de plans de validation équilibrés, c'est-à-dire de plans où toutes les séries de validation ont le même nombre de répétitions, sera traité dans cette thèse.

La mesure de fidélité est calculée à partir des écart-types des résultats d'essais.

Le traitement statistique des données consiste à utiliser une méthode appelée analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA). Elle permet de décomposer la variance totale de toutes les mesures – toutes séries confondues, ou variance de fidélité intermédiaire – en une variance intra-série et une variance inter-série.

Les pré-requis à l'étude ANOVA sont la normalité de la distribution des données, l'homogénéité des variances inter-séries et l'indépendance des séries les unes par rapport aux autres.

Une fois l'analyse ANOVA réalisée, deux conclusions sont envisageables. Soit l'hypothèse nulle est confirmée, et il n'y a alors pas de différence significative entre les séries, soit l'hypothèse alternative est confirmée, et une différence significative est établie.

Cette analyse calcule également la variance intra-série selon la formule suivante :

$$s_r^2 = \frac{SCE_r}{I(J-1)}$$ Variance intra-série (Eq. 5)

Avec : SCE_r, la somme des carrés intra-série,

I, le nombre de séries,

J, le nombre de répétitions par série.

A partir de cette variance intra-série, nous pouvons calculer la variance inter-séries :

$$s_L^2 = \frac{\left(\frac{SCE_L}{I-1} - s_r^2\right)}{J}$$ Variance inter-séries (Eq. 6)

Avec : SCE_L, la somme des carrés inter-séries.

Les variances intra et inter-séries que nous venons de calculer sont en fait des estimations, respectivement, de la variance de répétabilité et de la variance de fidélité intermédiaire.

Nous pouvons ainsi calculer nos paramètres de fidélité, qui sont l'écart-type de répétabilité et de reproductibilité, comme suit :

$$s_r = \sqrt{s_r^2}$$ Ecart-type de répétabilité (Eq. 7)

$$s_R^2 = s_L^2 + s_r^2$$ Variance de reproductibilité (Eq. 8)

$$s_R = \sqrt{s_L^2 + s_r^2}$$ Ecart-type de reproductibilité (Eq. 9)

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

I.4.3. INTERPRÉTER UNE VALEUR DE FIDÉLITÉ

Les paramètres de fidélité que nous venons de calculer ne nous permettent pas, en soi, de juger de la fidélité de la méthode analytique. Il nous faut donc trouver une approche permettant d'affirmer si les valeurs de fidélité obtenues sont correctes ou non.

La variabilité d'une méthode est souvent exprimée sous forme de coefficient de variation. Ce paramètre ne peut pas à lui seul représenter la fidélité d'une méthode, car il dépend de la moyenne des valeurs, et de leur écart-type. Il s'agit donc d'une mesure relative qui ne permet pas de caractériser de façon absolue une méthode, du fait de son manque de robustesse.

Le modèle proposé par Horwitz pour estimer les performances d'une méthode analytique en termes de fidélité, dans le domaine de la chimie alimentaire [19], est

une approche plus aboutie. Ce modèle part du principe que la fidélité, exprimée par exemple sous forme d'un écart-type de reproductibilité, dépend de la concentration de l'analyte à doser.

Ce postulat se retrouve également dans la procédure SFSTP 2003-2006, avec le calcul d'un intervalle de tolérance dépendant de la fidélité de la méthode pour chaque niveau de concentration. Ce calcul sera détaillé dans la sous-section I.6.4.2.

I.5. JUSTESSE D'UNE MÉTHODE

I.5.1. EXPRESSION DE LA JUSTESSE

Selon la définition donnée en section I.1.1., la justesse d'une méthode concerne les deux paramètres suivants :

- la valeur de référence X de l'échantillon étudié ;
- la valeur moyenne Z de mesurages répétés sur ce même échantillon.

Dans le cadre d'une validation analytique, la justesse est donc obtenue en calculant la différence entre la moyenne des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées.

Cette différence peut être exprimée de plusieurs façons.

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

$$B = \overline{Z} - X$$ Biais absolu (Eq. 10)

$$B\% = \left(\frac{\overline{Z} - X}{X} \right) \times 100$$ Biais relatif (Eq. 11)

Ainsi, si la méthode analytique conduit à une surestimation de la quantité d'analyte à doser, le biais absolu ou relatif sera positif. A l'inverse, dans le cas d'une sous-estimation ce biais sera négatif.

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

$$R\% = \frac{\overline{Z}}{X} \times 100$$ Taux de recouvrement (Eq. 12)

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

I.5.2. SPÉCIFICITÉ, ERREUR SYSTÉMATIQUE

La notion de spécificité définie en section I.1.1 est intrinsèquement liée à la justesse de la méthode, dans le sens où les éventuelles interférences provenant

d’une non-spécificité de la méthode analytique vont entraîner un défaut de justesse, et donc un biais de mesure.

Ces 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. Nous verrons dans la Partie II que nous nous trouvons dans ce deuxième cas lors de l’analyse d’une substance végétale, qui est une matrice complexe.

Un moyen simple de représenter graphiquement l’impact des interférences est de construire une droite de justesse.

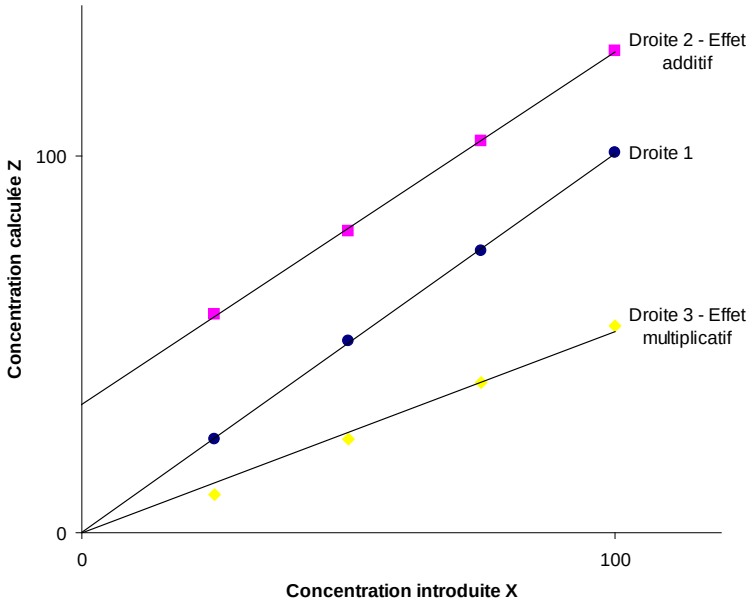
Cette droite de justesse représente les concentrations calculées Z en fonction des concentrations introduites de référence X, et est définie par l’équation suivante :

$$Z = f(X)$$ Droite de justesse (Eq. 13)

La Figure 1 illustre cette droite de justesse selon trois situations possibles :

- la droite 1 représente un cas où il n’y a pas d’interférence ;
- la droite 2 représente un décalage systématique des concentrations calculées, il s’agit d’un effet additif ;
- la droite 3 représente un biais proportionnel à la concentration, il s’agit d’un effet multiplicatif.

Figure 1 Droite de justesse



En pratique, les effets sont souvent combinés, et l'équation de la droite de justesse est alors de la forme :

$$Z = b_0 + b_1 X$$ Droite de justesse avec interférences (Eq. 14)

Les coefficients b_0 et b_1 peuvent alors servir de base pour le calcul d'un facteur de correction des données.

I.6. PROFIL D'EXACTITUDE

La méthode de validation utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision a été développée par une commission de la SFSTP (SFSTP 2003 et 2006), pour pallier aux faiblesses des guides de validation précédents.

Cette commission est repartie des objectifs fondamentaux de la validation analytique pour proposer un outil de décision permettant de prévoir avec quelle garantie une proportion donnée des résultats futurs seront compris dans les limites d'acceptabilité.

Ceci permet de mieux intégrer les besoins de l'utilisateur final de la méthode analytique aux objectifs de la validation.

Les différentes étapes de cette méthode sont donc :

- définir les objectifs de validation ;
- définir un plan d'expérience de validation et d'étalonnage ;
- calculer les concentrations retrouvées par étalonnage inverse ;
- calculer les critères de validation et l'intervalle de tolérance par niveau de concentration ;
- construire le profil d'exactitude ;
- interpréter les résultats.

Chacune de ces étapes est étudiée ci-après.

I.6.1. OBJECTIFS DE LA VALIDATION

L'objectif d'une méthode de dosage est de pouvoir déterminer avec le plus d'exactitude possible chacune des quantités (ou concentrations) inconnues qu'un laboratoire aura à doser.

L'objectif d'une validation est de pouvoir donner au laboratoire et aux autorités réglementaires la garantie que chaque résultat Z qui sera obtenu dans le futur par la méthode d'analyse sera suffisamment proche de la vraie valeur X de l'échantillon à doser.

Dans cette définition le terme « suffisamment proche » impose en premier lieu de choisir la limite d'acceptabilité qui correspond à l'écart maximum λ accepté entre

le résultat *Z* obtenu par la méthode d'analyse et la valeur de référence *X* acceptée comme valeur vraie.

$$\left|X - Z\right| < \lambda \qquad \text{(Eq. 15)}$$

La limite d'acceptabilité λ doit être fixée en fonction des exigences réglementaires, et en fonction des performances de la méthode, en particulier de son incertitude. Cette limite d'acceptabilité λ est de 1% à 2% pour le dosage d'une substance active dans une matière première [20] et de 5% pour le dosage d'une substance active dans un produit fini [21]. Il est généralement admis qu'elle est de 15% pour le dosage de substance active dans des produits biologiques

Pour apporter les garanties que l'équation (Eq. 15) soit vérifiée, il faut que la probabilité que $\left|X - Z\right| < \lambda$ soit supérieure ou égale à une valeur minimale β (au moins 80%)

$$\Pr\left(\left|X - Z < \lambda\right)\right) \geq \beta \qquad \text{(Eq. 16)}$$

I.6.2. PLAN D'EXPÉRIENCE DE VALIDATION, PLAN D'EXPÉRIENCE D'ÉTALONNAGE

I.6.2.1. Plan d'expérience de validation

Le plan d'expérience de validation doit être choisi de manière à se situer en situation de fidélité intermédiaire, en effectuant les mesures par séries en tenant compte de diverses sources d'incertitude.

Le plus souvent, une série est équivalente à un jour, ce qui permet de prendre en compte un certain nombre de sources d'incertitude : évolution des échantillons, changements d'opérateurs, changement des étalonnages, évolution des réactifs, modification des réglages instrumentaux, etc…

Il faut ensuite fixer le nombre de séries (jours) *I* de mesures, le nombre de répétitions *J* par niveau et par jour, et le nombre de niveaux de concentration *K*.

Ces choix dépendent non seulement de contraintes statistiques, mais également pratiques et économiques. Par exemple, le nombre de jours de travail va dépendre de la stabilité de l'échantillon ; la durée de préparation de l'échantillon et le temps d'analyse vont influencer le nombre de répétitions ; un minimum de

trois niveaux de concentrations est nécessaire pour vérifier si la justesse est bien linéaire sur tout le domaine de validation.

Une fois le plan d'expérience de validation défini, en connaissance du coût d'une analyse, le coût de la validation et sa durée peuvent être évalués. Les quantités nécessaires d'échantillons et un calendrier des analyses à réaliser peuvent ainsi être planifiés.

I.6.2.2. Plan d'expérience d'étalonnage

Le nombre de niveaux et de répétitions pour le plan d'étalonnage peut différer de celui du plan de validation. En revanche, le nombre de séries *I'* doit être identique à celui du plan de validation puisque l'on va vérifier sur plusieurs jours si la méthode est capable de quantifier de la même façon dans le temps les échantillons de validation.
Le nombre de niveaux *K'* est fixé suivant le modèle d'étalonnage étudié durant le développement de la méthode.

I.6.3. ETALONNAGE INVERSE

Après collecte des données, et détermination du modèle d'étalonnage le mieux adapté à la méthode comme présenté au chapitre I.3., on utilise la fonction inverse du modèle d'étalonnage pour transformer les réponses mesurées en concentrations calculées pour chaque mesurage.
Ce calcul s'effectue indépendamment pour chaque série de validation, en utilisant les paramètres du modèle correspondant à la série.

$$Z_{ijk} = \frac{Y_{ijk} - \alpha_i}{\beta_i} \qquad \text{(Eq. 17)}$$

Avec α_i et β_i les coefficients du modèle d'étalonnage de la série *i*, dans le cas d'un modèle linéaire.
Les concentrations prédites calculées Z des échantillons de validation sont ainsi obtenues.

A partir là, le biais de chaque mesurage peut être calculé grâce au Biais absolu (Eq. 10) et au Biais relatif (Eq. 11) définis à la section I.5.1.
La droite de justesse vue à la section I.5.2 peut également être construite.

I.6.4. CRITÈRES DE VALIDATION ET INTERVALLE DE TOLÉRANCE

I.6.4.1. Justesse et fidélité par niveau

Nous avons vu précédemment que la justesse et la fidélité d'une méthode pouvaient dépendre du niveau de concentration de l'analyte. Il serait donc incorrect de calculer une valeur unique représentant la totalité des mesures obtenues par cette méthode, comme les approches classiques de validation le conseillent généralement.
La méthode du profil d'exactitude propose de déterminer la justesse et la fidélité de la méthode en calculant les critères suivants pour chaque niveau de concentration étudié [22] :

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\sum_{i=1}^{I}\sum_{j=1}^{J} X_{ij}}{I \times J}$$ Concentration introduite moyenne (Eq. 18)

$$\overline{\overline{Z}} = \frac{\sum_{i=1}^{I}\sum_{j=1}^{J} Z_{ij}}{I \times J}$$ Concentration calculée moyenne (Eq. 19)

$$s_r = \sqrt{\frac{SCE_r}{I(J-1)}}$$ Ecart-type de répétabilité (Eq. 20)

$$s_B = \sqrt{\frac{\frac{SCE_B}{I-1} - s_r^2}{J}}$$ Ecart-type inter-séries (Eq. 21)

$$s_{FI} = \sqrt{s_B^2 + s_r^2}$$ Ecart-type de fidélité intermédiaire (Eq. 22)

$$CV_{FI} = \frac{s_{FI}}{\overline{\overline{X}}} \times 100$$ Coefficient de variation de fidélité intermédiaire (Eq. 23)

$$\frac{\overline{\overline{Z}}}{\overline{\overline{X}}} \times 100$$ Taux de recouvrement moyen (Eq. 24)

Avec : SCE_r la somme des carrés des écarts résiduelle,

SCE_B la somme des carrés des écarts inter-séries.

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

I.6.4.2. Intervalle de tolérance par niveau

Comme défini à la section I.1.1, il s'agit d'un intervalle dans lequel on est capable de prédire que se trouve en moyenne une proportion connue de mesures.

Cet intervalle peut être calculé de plusieurs façons, et la commission SFSTP a retenu la méthode de calcul proposée par Mee [17].

On appelle β la proportion attendue de résultats futurs, comme vu à la section I.6.1 concernant la limite d'acceptabilité.

L'intervalle de tolérance (IT) est calculé pour chaque niveau de concentration selon la formule suivante :

$$\left[Biais\% - Q_t \times s_{IT}, Biais\% + Q_t \times s_{IT}\right]$$ Intervalle de tolérance (Eq. 25)

Les coefficients intervenant dans cette formule sont calculés comme suit :

$$B = \sqrt{\frac{R+1}{J \times R + 1}}$$ Coefficient B (Eq. 26)

$$R = \frac{s_B^2}{s_r^2}$$ Coefficient R (Eq. 27)

$$s_{IT} = s_{FI} \times \sqrt{1 + \frac{1}{IJ \times B^2}}$$ Ecart-type de l'IT (Eq. 28)

$$Q_t = t_{\nu, \frac{1+\beta}{2}}$$ Facteur de couverture de l'IT (Eq. 29)

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

$$\nu = \frac{(R+1)^2}{\frac{\left(R+\frac{1}{J}\right)^2}{I-1} + \frac{1-\frac{1}{J}}{IJ}}$$

Nombre de degrés de liberté (Eq. 30)

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

Une fois les calculs des coefficients effectués, on peut calculer les limites haute et basse de l'intervalle de tolérance par niveau selon l'équation Intervalle de tolérance (Eq. 25), qui vont nous permettre de construire le profil d'exactitude de la méthode.

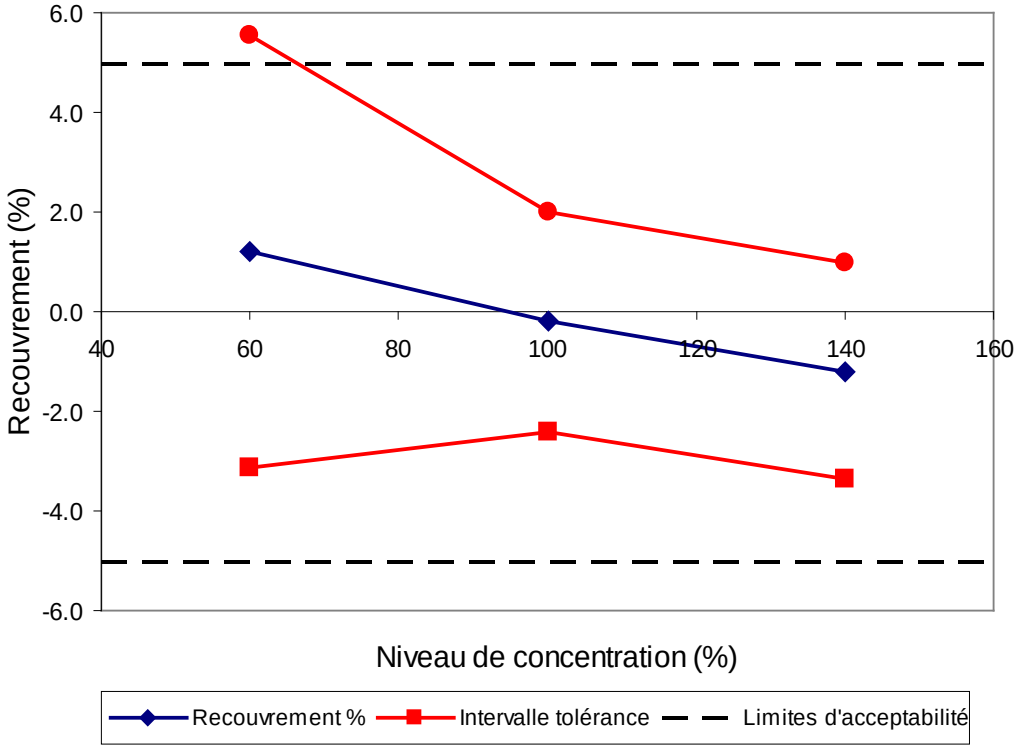
I.6.5. CONSTRUCTION DU PROFIL D'EXACTITUDE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Une représentation graphique des résultats en valeurs relatives par rapport à la valeur de référence du niveau est effectuée.

On reporte sur l'axe horizontal les valeurs de référence moyennes, et sur l'axe vertical :

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

Figure 2 Profil d'exactitude



L'interprétation du profil d'exactitude présenté à la Figure 2 est simple. Aussi longtemps que l'intervalle de tolérance est compris entre les limites d'acceptabilité, la probabilité que la différence entre la valeur *Z* trouvée par la méthode en routine et la valeur de référence *X* reste inférieure à la limite d'acceptabilité est supérieure à la valeur β choisie (en général 80%) : la méthode reste valide.

Dans le cas de la Figure 2, on voit que la limite supérieure de l'intervalle de tolérance coupe la limite supérieure d'acceptabilité vers le niveau de concentration 70 %. Cela signifie que pour une concentration inférieure à ce niveau, l'analyste ne peut plus garantir que la méthode est capable, en routine, de produire en moyenne une probabilité β de résultats acceptables.

Le domaine de validité correspond aux concentrations pour lesquelles l'intervalle de tolérance est compris dans les limites d'acceptabilité. Pour la Figure 2, le domaine de validité de la méthode est donc compris entre les niveaux de concentration 70 % et 140 %.

La Figure 2 montre également d'autres informations à partir desquels nous pouvons effectuer un certain nombre de diagnostics pour la méthode correspondante.

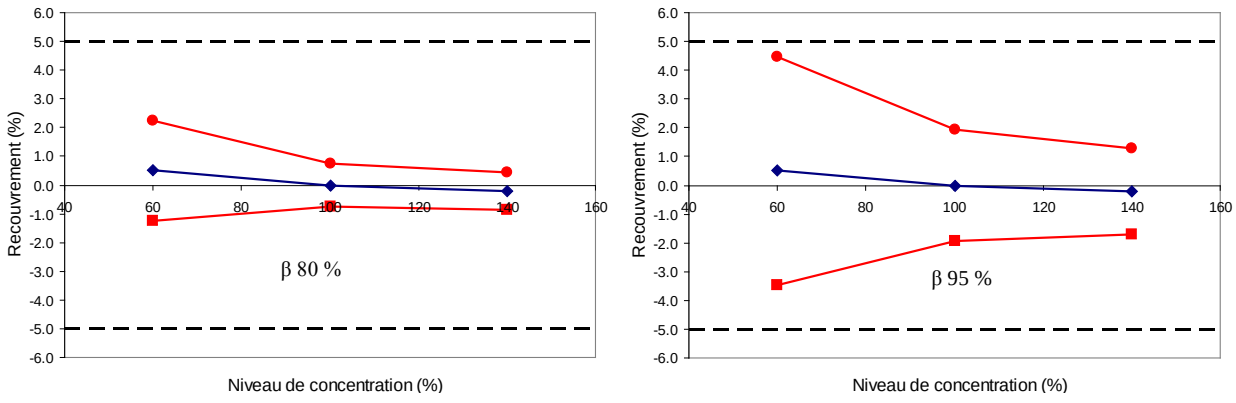
Tout d'abord, on note que le biais varie en fonction de la concentration. Il passe de + 2 % à -2 % environ entre les niveaux de concentration 60 et 140%. Nous avons vu à la section I.5.2 les biais de justesse pouvant être à l'origine de ce phénomène, qu'il serait intéressant d'étudier.

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

Une autre question peut être abordée à ce stade : le profil d'exactitude montre clairement l'impact de la limite d'acceptabilité fixée pour la méthode, mais qu'en est-il du deuxième critère de décision fixé en amont, à savoir la proportion β ?

Celle-ci est généralement fixée à 80 %, mais elle peut également être fixée à d'autres valeurs telles que 90 % ou 95 %. On peut alors se demander quel est l'impact de ce choix sur le profil d'exactitude.

Figure 3 Impact de la proportion β sur le profil d'exactitude



La Figure 3 montre à gauche, un profil d'exactitude construit avec une proportion β fixée à 80 %, et à droite le même profil d'exactitude avec cette fois une proportion β de 95 %. Une proportion β de 80 % signifie que l'on peut avoir 1 résultat sur 5 hors de l'intervalle de tolérance en routine, tandis qu'avec β fixée à 95 % ce risque tombe à 1 résultat sur 20.

Augmenter la proportion β revient donc à diminuer le risque d'avoir un résultat hors des limites de l'intervalle de tolérance, et donc ce dernier est d'autant plus large que β est élevée.

I.7. INCERTITUDE DE MESURE

I.7.1. GÉNÉRALITÉS

L'estimation de l'incertitude de mesure, tout comme la validation analytique, est une exigence fondamentale de la norme ISO 17025.

D'après la définition donnée en section I.1.1, l'incertitude de mesure est « *un paramètre qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesurage* ».

L'incertitude permet donc d'évaluer la dispersion des valeurs effectuées sur un échantillon, tout comme la fidélité.

Il existe cependant des différences fondamentales entre ces deux notions :

- l'incertitude de mesure s'applique à une mesure, tandis que la fidélité caractérise une méthode. En ce sens, l'incertitude de mesure est plus proche de l'exactitude, qui concerne également un mesurage.
- l'estimation de l'incertitude de mesure ne fait pas partie de la validation d'une méthode analytique.
- l'incertitude associée à une mesure va permettre à l'utilisateur final de ce résultat de prendre une décision concernant sa conformité.

Bien que l'estimation de l'incertitude de mesure ne fasse pas partie du processus de validation analytique, ces deux exigences peuvent être combinées. Le profil d'exactitude illustre comment l'incertitude peut être obtenue à partir des données générées durant la validation d'une méthode analytique.

Ainsi, les estimations de la fidélité et de la justesse obtenues lors de la validation analytique peuvent être utilisées pour estimer l'incertitude de mesure de la méthode.

I.7.2. UTILISATION DU PROFIL D'EXACTITUDE

Une approche classique de l'estimation de l'incertitude de mesure consiste à identifier toutes les sources d'incertitude et à estimer leur impact sur la mesure. On retrouve donc une démarche semblable à celle utilisée en validation pour évaluer la fidélité de la méthode, où l'on se place en condition de fidélité intermédiaire afin de tenir compte de diverses sources de variabilité.

On propose donc d'utiliser les données de validation recueillies en condition de fidélité intermédiaire afin d'estimer l'incertitude de mesure. De plus, le profil d'exactitude étant construit sur l'ensemble du domaine d'application de la méthode, on peut estimer cette incertitude pour chaque niveau de concentration étudié. Pour un niveau de concentration donné, l'incertitude-type élevée au carré est donnée par la formule suivante :

$$u^2(Z) = u^2(D) + s_{FI}^2 \qquad \text{(Eq. 31)}$$

Avec : *Z* la valeur de la mesure,

D le biais absolu moyen.

En négligeant les incertitudes sur la valeur de référence, on démontre que :

$$u(D) = \sqrt{\frac{s_{FI}^2 - \left(1 - \frac{1}{I}\right)s_r^2}{J}} \qquad \text{(Eq. 32)}$$

En réorganisant les calculs, on obtient l'équation suivante :

$$u(Z) = s_{FI} \times \sqrt{1 + \frac{1}{IJ \times B^2}} \qquad \text{(Eq. 33)}$$

On remarque que l'équation (Eq. 33) est identique à l'équation Ecart-type de l'IT (Eq. 28) calculant l'écart-type de l'intervalle de tolérance. On peut donc conclure que l'écart-type de l'intervalle de tolérance s_{IT} permet une estimation de l'incertitude de mesure.

Cependant, les composantes de l'incertitude prises en compte dans ce calcul ne sont pas exhaustives et dépendent beaucoup des conditions de fidélité intermédiaire choisies pour réaliser les essais. En particulier, l'incertitude sur les valeurs de référence n'est pas prise en compte. C'est pourquoi cette méthode ne remplace pas l'application d'une procédure exhaustive d'estimation de l'incertitude, et il reste indispensable d'établir la liste des principales sources d'incertitude sous la forme d'un diagramme causes/effets [4].

PARTIE II. 2ÈME PARTIE : CONTRÔLE DE LA QUALITÉ DES MÉDICAMENTS À BASE DE PLANTES

II.1. GÉNÉRALITÉS

II.1.1. DÉFINITIONS

La **phytothérapie** est une médecine traditionnelle ancestrale basée sur l'utilisation des propriétés pharmacologiques naturelles des molécules contenues dans les plantes. Il s'agit donc de l'art de soigner ou de prévenir une maladie par les plantes médicinales.

La directive 2004/24/CE du Parlement européen et du Conseil donne une définition claire du **médicament à base de plantes** (Herbal Medicinal Product ou HMP) : *« Tout médicament dont les substances actives sont exclusivement une ou plusieurs substances végétales ou préparations à base de plantes ou une association d'une ou de plusieurs substances végétales ou préparations à base de plantes »* [23].

Une **Pharmacopée** est un ouvrage réglementaire destiné à être utilisé par les professionnels de santé. Il s'agit d'un recueil qui précise entre autres les normes de qualité des plantes médicinales et de leurs préparations utilisées en thérapeutique.
Elle définit notamment les critères de qualité des matières premières ou des préparations entrant dans la fabrication des médicaments (à usage humain et vétérinaire) et les méthodes d'analyse à utiliser pour en contrôler la qualité [24]. L'ensemble des critères est regroupé et publié sous forme de monographies.

La notion de **chimiotype**, officialisée en Union Européenne en 2006 avec l'adoption du règlement REACH, désigne une entité chimique distincte au sein d'une même espèce. En effet certaines espèces de plantes présentent des variations chimiques de leurs métabolites secondaires en fonction des influences de leurs écosystèmes (altitude, humidité, ensoleillement …) sans que leur morphologie ou leur génétique ne soit changée [25].

Les **métabolites secondaires** sont des molécules qui ne participent pas directement à l'assimilation des nutriments et au développement de la plante. L'activité médicinale d'une plante est souvent due à ces métabolites secondaires, qui sont soumis à des variations selon la notion de chimiotype définie ci-dessus, ce qui va poser problème pour l'analyse de la plante [25].

La **standardisation** désigne l'ajustement d'une substance/préparation végétale à une teneur définie pour un constituant ou un groupe de constituants d'activité thérapeutique connue, soit par ajout d'excipients, soit par mélange de lots de substance végétale et/ou de préparation à base de plante (e.g. les extraits standardisés) [26].

Une **spécification** est un ensemble de tests, de références à des procédures analytiques, et des critères d'acceptation appropriés, qui sont des limites numériques, intervalles, ou autres critères pour les tests décrits. Elle établit notamment l'ensemble des critères auxquels une substance ou préparation végétale ou un HMP doit se conformer pour être considéré comme acceptable pour son utilisation [26].

Les **marqueurs** d'une plante sont des constituants chimiquement définis ou groupes de constituants d'une substance végétale, d'une préparation à base de plantes ou d'un HMP qui sont d'intérêt pour son contrôle, qu'ils aient des activités thérapeutique et pharmacologique ou non. Les marqueurs servent à calculer la quantité de substance végétale ou de préparation à base de plantes dans les HMP si le marqueur a été préalablement dosé quantitativement dans la substance végétale ou la préparation à base de plantes [26].

II.1.2. CONTEXTE RÉGLEMENTAIRE

Comme tous les médicaments, les médicaments à base de plantes doivent répondre à plusieurs exigences réglementaires concernant leur fabrication, leur composition, les tests effectués pour leur contrôle, leur stockage et leur distribution [6].

Les principaux référentiels concernant les médicaments à base de plantes sont, d'une part, les monographies des plantes médicinales des différentes

Pharmacopées, et d'autre part les guidelines publiées par l'European Medicine Agency (EMA).

En effet, au sein de l'EMA un comité d'experts spécialisés dans le domaine de la phytothérapie, le Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), est en charge des questions concernant les HMP [24].

Ces derniers sont soumis à la réglementation générale s'appliquant aux médicaments, mais le HMPC publie également des guidelines spécifiques aux HMP, afin de porter un éclairage sur des points de la réglementation générale ne prenant pas en compte les spécificités des HMP. Par exemple, le guideline EMEA/HMPC/246816/2005 porte sur les bonnes pratiques agricoles et de récolte (Good Agricultural and Collection Practice, GACP) pour les matières premières d'origine végétale [27].

Les monographies des plantes médicinales peuvent être trouvées dans la Pharmacopée Européenne, mais également dans les Pharmacopées nationales des pays européens, la United States Pharmacopeia (USP), la Pharmacopée Japonaise, ou toute autre Pharmacopée nationale.

Comme pour tous les médicaments, la commercialisation des HMP est soumise à l'obtention d'une AMM. Cependant, une procédure d'enregistrement simplifiée a été établie par la Directive 2004/24/CE pour les médicaments traditionnels à base de plantes à usage humain, définis à l'article L5121-14-1 du Code de la Santé Publique [26].

Cette procédure simplifiée autorise la démonstration de la qualité et de l'innocuité du HMP uniquement sur la base de données bibliographiques, sans procéder à une étude clinique.

Les principales problématiques concernant la réglementation des médicaments à base de plantes sont d'une part, le manque d'harmonisation entre les contraintes réglementaires des différents pays, et d'autre part le manque de guidelines strictes sur le contrôle de la qualité, et sur l'évaluation de la sécurité et de l'efficacité des produits à base de plantes.

Ainsi, selon les réglementations, une **plante** peut être définie comme un aliment, un aliment fonctionnel, un complément alimentaire ou bien comme une plante médicinale.

De plus, le terme de **plantes médicinales** inclut les plantes, les matières végétales, les préparations végétales et les produits finis végétaux.

L'EMA définit la **drogue végétale** comme étant la plante entière, fragmentée ou coupée, les parties de plantes, algues, champignons, lichens dans un état non-traité, sous forme fraîche ou séchée. Un exsudat non traité est également considéré comme une drogue végétale.

Lorsque la drogue végétale est soumise à un traitement tel que l'extraction, la distillation, l'expression, le fractionnement, la purification, la concentration ou la fermentation, elle devient alors une **préparation végétale**. Les plantes pulvérisées, teintures, extraits, huiles essentielles, jus pressés et exsudats sont des préparations végétales [28].

II.1.3. CONSTITUANTS DES MÉDICAMENTS À BASE DE PLANTES

Selon la définition de l'EMA, une substance active est :
« Toute substance ou mélange de substances destinée à être utilisé pour la fabrication d'un produit médicinal et qui, lorsqu'elle est utilisée pour la production d'une drogue, devient un ingrédient actif du produit médicinal » [29].

Pour les médicaments d'origine chimique, la substance active est une molécule bien définie, dont les propriétés thérapeutiques sont connues, qui est ajoutée en quantité maîtrisée au médicament lors de sa fabrication.

Pour les HMP, selon la définition donnée à la section II.1.1, la substance active est une ou plusieurs substance(s) végétale(s) ou préparation(s) à base de plantes.
Or, les matériaux bruts végétaux et leurs extraits sont habituellement composés de mélanges complexes de plusieurs molécules chimiques. Parmi ces nombreux composants, le (ou les) composé(s) responsable(s) de l'effet pharmacologique n'est (ne sont) pas connu(s) avec certitude. Il est vraisemblable que l'effet rapporté soit dû à l'action synergique de plusieurs constituants.

Les lignes directrices de l'EMA portant sur la qualité des HMP [26] [30] [31] [32] définissent différents types de constituants :

- les **constituants caractéristiques** ;
- les **constituants ayant une activité thérapeutique connue** ;
- les **marqueurs actifs** et les **marqueurs analytiques** ;
- les **constituants toxiques**.

Les **constituants caractéristiques** sont des substances chimiquement définies ou des groupes de substances qui sont spécifiques d'une plante médicinale et peuvent être utilisés à des fins d'identification.

Les **constituants ayant une activité thérapeutique connue** sont des substances chimiquement définies ou des groupes de substances généralement

considérées comme contribuant substantiellement à l'activité thérapeutique de la substance végétale, la préparation à base de plante ou le HMP. Ces constituants doivent obligatoirement être dosés.

Il existe deux catégories de marqueurs (définition en section II.1.1) :

- Les **marqueurs analytiques**, constituants ou groupes de constituants qui servent uniquement à des buts analytiques ;
- Les **marqueurs actifs**, constituants ou groupes de constituants qui sont généralement considérés comme contribuant à l'activité thérapeutique.

Nous verrons au chapitre II.4 que la présence ou non de certains types de constituants dans un HMP va influencer son dosage.

La présence de **constituants toxiques** devra être étudiée, et le cas échéant leur quantité doit être maîtrisée et limitée sur la base d'une évaluation toxicologique.

II.1.4. CATÉGORIES DE HMP

Les substances végétales/préparations à base de plantes sont essentiellement définies par leur processus de fabrication, ainsi que par les constituants qui les composent.

Ainsi il existe trois catégories de substances végétales et préparations à base de plantes :

- Les substances végétales/préparations à base de plantes **standardisées** contiennent des constituants ayant une activité thérapeutique connue. Ces constituants sont ajustés à une teneur connue par l'ajout d'excipients ou bien par mélange de différents lots de substance végétale / préparation à base de plantes.
- Les substances végétales/préparations à base de plantes **quantifiées** contiennent des marqueurs actifs ajustés à une teneur définie exclusivement par mélange de différents lots de substance végétale/préparation à base de plantes.

- Les autres substances végétales/préparations à base de plantes n’ont pas de constituants ayant une activité thérapeutique connue ni de marqueurs actifs connus. La teneur en marqueur analytique n’est pas ajustée.

Ces trois catégories de substances actives peuvent également être classifiées en deux groupes selon leur processus de fabrication :

- Les substances végétales/préparations à base de plantes constituées de substance végétale broyée ou pulvérisée ;
- Les substances végétales/préparations à base de plantes dont la préparation s’effectue par étapes, allant au-delà du broyage.

Cette classification va déterminer, entre autres, les spécifications de la matière concernée, ainsi que le choix du constituant de la matière végétale à doser pour son analyse quantitative [31].

II.2. VARIABILITÉ DES PLANTES : NOTION DE CHIMIOTYPE

II.2.1. PRINCIPE

La notion de chimiotype définie en section II.1.1 introduit le concept de variation chimique des constituants d'une plante. Ces variations peuvent être d'ordre qualitatif, ou bien quantitatif. Or, comme vu à la section II.1.2, la plante ainsi que ses différents composants constituent la substance active des HMP.

La fabrication de médicaments à base de plantes implique de travailler avec une substance active qui peut subir des variations qualitatives et quantitatives suivant un certain nombre de facteurs, par exemple :

- La plante en elle-même : espèce, organe, etc…
- L'environnement : degré d'humidité, type de terrain, ensoleillement, température, méthode de culture, etc…
- La récolte : variations diurnes, saisonnières, méthode de collecte, etc…
- Les traitements apportés : contamination, substitution, frelatage, pratique de production, etc…

Ainsi, la fabrication d'un produit avec une formulation constante, qui fournira l'effet physiologique désiré est un des challenges les plus complexes pour les entreprises fabricant des produits de phytothérapie.

La qualité du produit fini étant directement reliée à la qualité des matières premières, le contrôle de la qualité d'un HMP sera fortement conditionné par l'assurance de la qualité de la plante médicinale, notamment par son identification précise et par la maîtrise des facteurs décrits précédemment [33].

II.2.2. IMPACT SUR LE CONTRÔLE QUALITÉ DES HMP

L'établissement des standards d'évaluation de la qualité des HMP sous-entend que des standards initiaux pour la matière première à usage médical ont également été établis.

Comme vu en section II.1.3., la matière première à usage médical d'un HMP peut être soit une préparation à base de plantes issue d'une matière première végétale, soit la drogue végétale brute elle-même.

Les spécifications applicables à ces matières premières seront retrouvées dans des monographies pour les préparations végétales, mais également dans des monographies pour les drogues végétales desquelles elles sont issues.

Par exemple, pour un HMP contenant de l'extrait sec de Millepertuis, la matière première devra répondre aux exigences de la monographie Ph. Eur. 1874 « Millepertuis (extrait sec quantifié de) », et la matière végétale dont l'extrait est issu devra répondre aux exigences de la monographie Ph. Eur. 1438 « Millepertuis ».

Les monographies concernant les drogues végétales doivent être très spécifiques, et bien définir le genre et l'espèce dont la partie de plante est issue. Une identification précise de la drogue est nécessaire compte tenu de la notion de chimiotype vue précédemment.

De plus, des mesures de contrôle des conditions pouvant impacter la qualité de la plante doivent être prises depuis le point d'approvisionnement en plante médicinale jusqu'à son analyse, et la collecte doit s'effectuer sous les Bonnes Pratiques Agricoles, dans un champ sauvage ou une culture [34].

II.3. CONTRÔLE QUALITÉ DES MÉDICAMENTS À BASE DE PLANTES

II.3.1. PRINCIPE

Comme pour tout médicament, le contrôle de la qualité des HMP est essentiel pour attester de la qualité, la sécurité et de l'efficacité du produit.

Comme vu en section II.2.2., le contrôle de la qualité d'un HMP se fera à plusieurs étapes du processus de fabrication. Devront être contrôlés :

- La qualité de la drogue végétale utilisée ;
- Le cas échéant, la qualité de la préparation à base de plantes issue de cette drogue ;
- Enfin, la qualité du HMP à libération.

Le contrôle qualité des substances végétales est basé sur des paramètres tels que l'identification de la matière, la teneur en eau de la substance, le dosage, les impuretés inorganiques, les limites microbiologiques, les mycotoxines, les pesticides et autres.
Pour les HMP, en plus de ces tests s'ajoutent la désintégration, la dissolution, la dureté et l'uniformité de teneur.

Ces spécifications sont bien souvent différentes de celles appliquées aux drogues synthétiques ou hautement purifiées, dont les constituants actifs peuvent être plus facilement identifiés chimiquement et quantifiés [28].

II.3.2. PROBLÈMES RENCONTRÉS

La nature particulière des médicaments d'origine végétale va engendrer un certain nombre de problèmes concernant leur contrôle qualité [35].
Ces problèmes peuvent être d'origine externe au produit, ou bien être dus au produit en lui-même.

Les problèmes externes rencontrés sont les suivants :

- La contamination du matériel végétal, par des métaux lourds, des pesticides, des mycotoxines, des micro-organismes ou toute autre matière étrangère. L'évaluation de ces différents types de contamination doit être systématiquement effectuée.
- Le frelatage, d'origine frauduleuse, doit être contrôlé par des méthodes adéquates d'identification de la plante.
- Les erreurs d'identification fortuites, également contrôlées par l'identification du matériel végétal.

Les problèmes internes au produit sont les suivants :

- La complexité phytochimique des plantes qui peuvent synthétiser une immense variété de composés tels que des acides gras, des alcaloïdes, des flavonoïdes, des tanins, etc… Le matériel végétal à contrôler peut donc contenir plusieurs centaines de composés chimiques organiques, ce qui rend difficile la maîtrise de sa qualité.
- La variabilité des plantes, abordée au chapitre II.2.

Il est indispensable de trouver des solutions à ces problématiques. Les problèmes externes peuvent être contrôlés par la maîtrise de l'origine de la plante, l'évaluation des contaminants et l'identification rigoureuse du matériel végétal. Ce dernier point est critique, du fait de la complexité du matériel végétal, des techniques d'identification spécifiques sont donc requises, comme l'établissement de fingerprint. Il s'agit d'une véritable « empreinte digitale » représentant l'ensemble des constituants de la plante. Cette méthode est décrite au paragraphe II.3.3.
Les problèmes internes vont avoir un impact important sur le dosage des HMP, qui est étudié au chapitre II.4.

II.3.3. IDENTIFICATION PAR FINGERPRINT

La technique d'identification par fingerprint est une méthode qualitative utilisant des profils chromatographiques obtenus par CLHP-UV, CLHP-MS, CPG ou

encore CCM, et permettant d'identifier une plante particulière, de la distinguer d'espèces proches. Cette technique peut être utilisée pour surveiller la constance de la composition de la plante.
En effet, un fingerprint chromatographique est, comme son nom l'indique, une « empreinte digitale » présentant les constituants représentatifs de la plante.
Ainsi, l'identification de la plante peut se faire par comparaison à un fingerprint de référence.
De plus, en utilisant les témoins appropriés, l'identification de composés caractéristiques de la plante est possible.
Le suivi de l'évolution du fingerprint dans le temps donne également une indication sur la stabilité de la composition de la plante.

Ainsi, l'utilisation de méthodes qualitatives de fingerprint et de méthodes quantitatives est une approche complémentaire recommandée par la FDA et l'EMA pour le contrôle de la qualité et l'évaluation de la stabilité des HMP [36] [37].

II.4. DOSAGE DES HMP

II.4.1. PRINCIPE

La méthode de dosage des constituants des plantes et préparations à base de plantes inscrites dans une Pharmacopée est indiquée dans la monographie correspondante.
Pour les matières ne possédant pas de monographie Pharmacopée, des procédures analytiques de dosage doivent être développées.

Lorsque la substance active d'un médicament est connue, comme pour les médicaments produits par synthèse chimique, il est évident que le dosage du médicament correspondra au dosage de cette substance active.

Or, comme nous l'avons vu précédemment, pour les médicaments à base de plantes, la substance active ne peut pas être réduite à une entité chimique simple, et les composés responsables de l'activité thérapeutique ne sont bien souvent pas encore identifiés.
Le choix du, ou des constituants à doser se fera alors au cas par cas, en fonction du type de constituants présents dans la plante à analyser [38].

II.4.2. CHOIX DU COMPOSÉ À DOSER

Le choix du composé à doser dans le cadre de l'étude quantitative du matériel végétal est imposé par la classification décrite à la section II.1.4.

Ainsi, dans le cas d'un matériel végétal standardisé, les lignes directrices de l'EMA relatives à la qualité des médicaments à base de plantes stipulent que les constituants ayant une activité thérapeutique connue doivent être utilisés pour la quantification [32].

Dans le cas d'un matériel végétal quantifié, le marqueur actif doit être choisi pour la quantification.

Enfin, dans le cas d'un matériel végétal pour lequel ni le constituant ayant une activité thérapeutique, ni le marqueur actif ne sont connus, le choix d'un marqueur analytique s'impose.

II.4.3. UTILISATION DE MARQUEURS : PRINCIPE ET LIMITES

Les marqueurs sont des outils importants pour faire le lien entre la substance active végétale et le médicament à base de plante, qu'ils possèdent une activité thérapeutique ou non. En effet, en connaissant la quantité de marqueur présente dans la substance active végétale, et celle présente dans le HMP, il est possible de déduire la quantité de substance active végétale présente dans le médicament final. Il s'agit donc d'une information cruciale pour le contrôle qualité du HMP.

Le choix du (ou des) marqueur(s) est une étape critique du développement de la méthode de dosage d'un HMP, qui doit être justifiée.

Pour les substances végétales inscrites dans une Pharmacopée, le constituant à doser ainsi que la méthode de dosage et le critère d'acceptation associé sont décrits dans la monographie correspondante.

Pour les substances végétales non inscrites à la Pharmacopée, le choix d'un ou de plusieurs marqueurs appropriés doit être effectué et justifié. Cependant, il existe peu de guides relatifs aux exigences de qualité pour les marqueurs permettant d'aider à faire ce choix.

Le guideline de l'EMA « Reflection paper on markers used for quantitative and qualitative analysis of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products » [30] offre une base de réflexion en proposant les critères principaux suivants :

- Le choix devra se porter en priorité sur des marqueurs spécifiques de la substance active à analyser ;
- Le marqueur sert à calculer la quantité de substance active dans le produit fini ;

- La sélection de marqueurs pour l'analyse quantitative permet l'analyse quantitative de chaque substance active dans le produit fini ;
- Le marqueur doit être présent constamment dans la substance active, et être une entité chimiquement définie ;
- Le marqueur doit être analysable avec un équipement analytique de routine ;
- Le marqueur doit être présent en teneur adéquate dans la substance active pour permettre le développement d'une méthode quantitative valide et reproductible, et être stable.

Plusieurs problématiques sont à l'origine de la complexité du choix des marqueurs :

- Les constituants caractéristiques de la substance végétale ne sont pas toujours clairement identifiés, et sont parfois présents en trop petite quantité pour être quantifiés ;
- Les marqueurs peuvent être instables ou difficiles à définir chimiquement, il peut aussi s'agir d'un groupe de constituants, ou ils peuvent ne pas être caractéristiques de la substance végétale ;
- Les marqueurs caractéristiques ne sont pas toujours commercialement disponibles ;
- Les marqueurs caractéristiques peuvent subir des pertes au cours de la fabrication ou peuvent être masqués par d'autres composants du produit.

Une fois le choix du marqueur effectué, la limite d'acceptation associée à ce marqueur doit être établie et justifiée en se basant sur la validation analytique de la méthode [30] [39].

II.4.4. DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE DE DOSAGE

- *Préparation de l'échantillon : extraction*

La préparation d'échantillon est toujours une étape clé du développement d'une méthode analytique de dosage, a fortiori dans le cas d'un médicament à base de

plantes. En effet, il faut dans un premier temps extraire les composés de la matrice de l'échantillon afin de pouvoir les doser.
Les monographies des Pharmacopées recommandent habituellement des méthodes d'extraction comme le passage aux ultra-sons, le chauffage à reflux ou l'extraction au Soxhlet.
De nouvelles techniques permettant de réduire le temps d'extraction, de diminuer la consommation en solvants organiques et d'améliorer le rendement d'extraction apparaissent, comme par exemple l'extraction automatisée ASE® (Accelerated Solvent Extraction), utilisant de hautes températures et une pression élevée [40], ou bien l'extraction sur phase solide SPE (Solid Phase Extraction) permettant notamment de minimiser l'effet matrice.

- *Méthode d'analyse*

La solution obtenue après extraction de la matière, ou extrait, peut être analysée par des méthodes spectrophotométriques (spectrophotométrie UV), et/ou par des méthodes chromatographiques (CPG, CHLP, CLUP).
L'extraction étant dans la plupart des cas non sélective du composé à doser, les méthodes chromatographiques sont préférées car elles permettent de séparer les différents composés en solution dans l'extrait.

- *Effet de matrice*

Lorsqu'une méthode ne permet pas de séparer le composé à doser du reste de la matrice, l'évaluation de la teneur en composé va être faussée. Il s'agit d'un effet de matrice, qui est un problème important pour l'analyse des HMP. En effet, il est impossible d'avoir des échantillons de matrice végétale seule, exempte de composés à doser. Il est donc impossible d'obtenir des blancs d'analyse pour les matières végétales, rendant les problèmes d'effet de matrice plus difficiles à détecter et à corriger.
Il est donc crucial de développer des méthodes d'analyse des HMP permettant d'éviter au maximum cet effet de matrice [38].

II.4.5. VALIDATION DE LA MÉTHODE DE DOSAGE

Une fois développée, la méthode de dosage d'un HMP doit être validée selon les exigences réglementaires en vigueur citées à la section I.1.2.
Les problématiques spécifiques à la validation analytiques des méthodes de dosage des HMP sont détaillées dans la Partie III.

II.4.6. CRITÈRES D'ACCEPTATION

Une fois la procédure analytique de dosage établie et validée, les critères d'acceptation de ce dosage doivent être établis.
Les exigences de la réglementation européenne sur la teneur en substance active du produit fini sont très strictes, et l'erreur liée à la procédure analytique s'ajoutant à la variabilité des plantes, il est très difficile de satisfaire ces exigences.

Pour les substances végétales, qui constituent les matières premières des HMP, une teneur minimale en constituants ayant une activité thérapeutique connue ou en marqueurs est requise [31].

Pour les produits finis, la directive 75/318/CEE amendée stipule :

> « Sauf justification appropriée, les écarts maximaux tolérables de la teneur en substance active ne peuvent dépasser ± 5% dans les produits finis au moment de la fabrication. […] Les limites excédant ± 5% au moment de la libération doivent être justifiées dans la partie « Développement du procédé de fabrication » par des résultats expérimentaux habituellement basés sur un intervalle de confiance de 95%. Les limites élargies incluent également les variations liées à la production et à la procédure analytique » [21].

Cette directive s'applique aux médicaments dont les substances actives sont chimiquement définies. Compte tenu de ce qui a été décrit précédemment sur la

variabilité naturelle des teneurs en constituants des plantes, on comprend aisément qu'un écart maximal tolérable de ± 5% à libération pour la teneur en substance active du produit fini peut difficilement être applicable aux médicaments à base de plantes.

Des exceptions peuvent être acceptées, si justifiées et autorisées. Pour les HMP, des limites élargies peuvent être fixées au cas par cas, mais aucune limite générale ne peut être recommandée car la variation dépend de la substance végétale utilisée.

PARTIE III. 3ÈME PARTIE : VALIDATION ANALYTIQUE DES PRODUITS À BASE DE PLANTES

III.1. GÉNÉRALITÉS

Aucune ligne directrice spécifique expliquant comment effectuer la validation analytique des produits d'origine végétale n'a été publiée à ce jour [41].

La validation d'une procédure analytique non décrite à la Pharmacopée suit la même réglementation que les médicaments renfermant des substances actives chimiquement définies, et doit donc satisfaire aux exigences de la norme ICH Q2 (R1) [2]. L'utilisation des guides de validation de la SFSTP est également possible.

Or, comme vu en Partie I, ces lignes directrices et ces guides s'appliquent aux médicaments renfermant des substances actives chimiquement définies, ou aux produits biologiques, mais ils gardent une portée générale et ne tiennent donc pas compte des spécificités des HMP.

L'application de ces normes et guides de validation peut alors conduire à des situations problématiques pour la validation d'un HMP.

Compte tenu de leur matrice complexe, les HMP se rapprochent plus des produits biologiques et nous pouvons être tentés de valider leurs méthodes de dosage analytique en suivant les procédures des guides adaptés aux produits biologiques.

Cependant ceux-ci ne sont pas idéaux pour les HMP, d'une part en raison des variations naturelles d'une matrice végétale en termes qualitatif et quantitatif, et d'autre part en raison de l'impossibilité de se procurer une matrice exempte de l'analyte à doser, contrairement au produit biologique pour lequel la matrice seule peut être disponible.

Une réflexion s'impose donc afin de proposer des protocoles de validation applicables aux médicaments à base de plante(s) [41]. Une étude de l'applicabilité du protocole de validation SFSTP 2003-2006 à la validation des médicaments à base de plantes est présentée au chapitre III.2. Le chapitre III.3 présente une proposition de protocole de validation adapté au dosage d'un médicament à base

de plantes, ainsi qu'une discussion sur l'application de ce protocole et sur les résultats obtenus.

III.2. APPLICABILITÉ DU PROTOCOLE DE VALIDATION SFSTP 2003-2006 À LA VALIDATION DES MÉDICAMENTS À BASE DE PLANTES

Ce chapitre met en lumière les propositions présentées dans les guides de validation SFSTP 2003 et 2006, nécessitant des adaptations afin d'être utilisées pour la validation d'une méthode de dosage d'un médicament à base de plantes.
Les propositions des guides de validation pouvant être directement appliquées à cette fin, car non impactées par les spécificités des produits considérés, ne seront pas abordées.

III.2.1. ETABLISSEMENT DU PROTOCOLE DE VALIDATION

III.2.1.1. Préparation des standards d'étalonnage

Le guide de validation SFSTP 2003 présente une démarche permettant de sélectionner un protocole expérimental de validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage à valider (voir figure 7 et tableau 3 du guide SFSTP 2003) [3].
Dans le cas où la procédure de dosage présente un effet de matrice, il est proposé de réaliser un étalonnage avec la matrice du produit, c'est-à-dire de préparer les standards d'étalonnage en ajoutant les excipients du produit à une quantité connue de témoin de substance active.
Or, dans les matières végétales, la matrice est intrinsèquement liée aux substances actives. En considérant les principes énoncés à la section II.1.3, la plante ne peut être considérée que dans son ensemble, et l'obtention d'une matrice végétale exempte de substance active paraît irréalisable.
Il est donc impossible de soumettre les standards d'étalonnage à l'effet matrice, ce qui représente un problème capital pour la validation analytique des médicaments à base de plantes.

III.2.1.2. Niveaux de concentration

Plusieurs choix de niveaux de concentration sont proposés (voir Figure 4 ci-dessous) en fonction du type de procédure à valider.

Figure 4 Exemples de choix possibles pour les niveaux de concentration des standards en fonction du type de procédure (Reproduction du Tableau IV du guide SFSTP 2003 [3])

Tableau IV. Exemples de choix possibles pour les niveaux de concentration des standards en fonction du type de procédure.

Procédure	1	2	3	4	5	6
Standards d'étalonnage						
Bas		LQ	80%(3) LA	LQ/LA(3)	C_{min}	LQ
Médian	100%(1)	(1/2 C_{max})(3)	100% LA	(50%)(3)	(50%)(3)	½ C_{max}
Haut	(120%)(2)	(C_{max})(3)	(120%)(3) LA	120%	120%	C_{max}
Additionnel(s)						(X)(4)
Standards de validation						
Bas	80%	LQ	80% LA	LQ/LA	C_{min}	LQ
Médian	100%	½ C_{max}	100% LA	50%	50%	½ C_{max}
Haut	120%	C_{max}	120% LA	120%	120%	C_{max}

(1) L'utilisation d'un seul niveau de concentration implique que le zéro soit inclus dans le système d'étalonnage (cf. figure 8).
(2) Sélection éventuelle d'un niveau de concentration supérieure à la concentration cible pour l'étalonnage (120% au lieu de la concentration cible 100%).
(3) Suppression éventuelle du niveau de concentration pour l'étalonnage (modèle de régression plus simple).
(4) L'utilisation d'un ou de plusieurs niveaux de concentration additionnels peut être requise selon les cas (exemple : modèle de régression plus complexe, intervalle de dosage plus grand).
LQ : limite de quantification. LA : limite admise. C_{max} : concentration maximale.

La procédure 1 correspond au « *dosage d'une substance chimique seule dont la référence est disponible ou dosage d'une substance chimique (principe actif, agent conservateur) dans une spécialité pharmaceutique (matrice)* ».
La procédure 6 correspond au « *dosage d'une substance chimique dans une matrice complexe (exemple : principe actif et ses métabolites dans le plasma [médicaments], résidus médicamenteux ou autres contaminants dans les aliments, etc.) ».*

On peut alors se demander quelle procédure convient le mieux pour un médicament à base de plantes.

En effet, le dosage étant appliqué à un médicament, la procédure 1 semble la mieux indiquée. Mais pour certaines plantes, les marqueurs sont présents en faibles quantités, et la substance végétale étant une matrice complexe, la procédure 6 pourrait être plus adaptée.

Le choix des niveaux de concentration des standards ne peut donc pas être formalisé de manière générale, mais doit être étudié au cas par cas.

III.2.1.3. Prévalidation de la méthode

Une étude préalable à la validation analytique de la méthode est proposée, la prévalidation. Contrairement à ce qui est établi, cette étude ne peut pas être réalisée sur les standards d'étalonnage pour les médicaments à base de plantes compte tenu de l'effet de matrice, mais plutôt sur un échantillon de concentration connue afin d'étudier cet effet.
Ainsi la prévalidation d'une méthode de dosage d'un médicament à base de plante sera plutôt remplacée par une étude d'optimisation de la méthode.
Cette optimisation portera notamment sur les conditions d'extraction de la matière, qui est une étape cruciale pour évaluer correctement la quantité de marqueur contenue dans la plante.
Ensuite, la minimisation de l'effet de matrice et l'amélioration de la spécificité de la méthode pourront être étudiées.

III.2.1.4. Nombre optimal d'expériences en phase de validation

Plusieurs choix de nombre de séries et de répétitions par série pour les standards de validation sont proposés en fonction de la fidélité observée de la méthode (voir Figure 5 ci-après).

Figure 5 Nombres recommandés de séries et de répétitions par série (Reproduction du Tableau VII du guide SFSTP 2003 [3])

Tableau VII. Nombres recommandés de séries et de répétitions par série pour les SV en fonction des coefficients de variation de la répétabilité et de la variance interséries obtenus avec les SE en phase de prévalidation.

CV_J (r)						
		4%	5%	6%	7%	8%
CV_J (g)	Nb. séries	Nb. répétitions				
4%	3	4	4	5	6	
	4	4	4	4	5	9
	5	4	4	4	5	5
5%	3	4	4	4	5	
	4	4	4	4	6	
	5	4	4	4	5	8
	6	4	4	4	4	5
6%	3	4	4	6	10	
	4	4	4	6	7	
	5	4	4	5	7	
	6	4	4	5	5	6
7%	3	6	8			
	4	4	4	6		
	5	4	4	5	7	
	6	4	4	5	7	9
8%	4	9				
	5	6	8			
	6	4	5	8		

CV_J (r) : coefficient de variation de la répétabilité. CV_J (g) : coefficient de variation de la variance interséries.

En pratique, les méthodes utilisées pour le dosage des médicaments ont rarement des coefficients de variation de fidélité élevés, et le plan de validation retenu sera généralement trois séries de validation avec quatre répétitions par séries.

Comme vu à la sous-section I.6.2.1, le nombre de répétitions va également dépendre du temps de préparation de l'échantillon. Pour le dosage des médicaments à base de plantes, cette étape, avec notamment la phase d'extraction, peut être relativement longue et ainsi accroître considérablement la durée d'une série de validation.

Dans ce contexte, le nombre de répétitions sera généralement ramené à trois par séries pour les HMP.

III.2.2. STATISTIQUES

Après la réalisation des essais de validation et l'estimation des paramètres d'étalonnage, le guide de validation SFSTP 2006 indique que, dans le cas où les quantités introduites ne sont pas identiques, il faut aligner les concentrations sur la concentration moyenne du niveau par interpolation.
Pour le dosage des médicaments à base de plante, il semble préférable de procéder autrement pour s'affranchir des différences de pesées.
En effet, afin d'obtenir des résultats plus facilement exploitables, les quantités de marqueurs calculées par étalonnage inverse vont être exprimées sous forme de recouvrement par rapport à la quantité théorique introduite.
Cette méthode est expliquée dans la proposition présentée au chapitre III.3.

III.2.3. CONCLUSION

La méthodologie statistique proposée par les guides de validation SFSTP 2003 et 2006 est dans l'ensemble bien adaptée au dosage des médicaments à base de plantes. En effet, la construction du profil d'exactitude ne nécessite pas d'adaptation pour s'appliquer à la validation du dosage de ce type de produits.
Le guide de validation SFSTP 2003 présente bien la difficulté d'établir un protocole de validation approprié permettant de démontrer les qualités fonctionnelles de la méthode. Or, les propositions présentées ne tiennent pas compte des spécificités du travail sur du matériel végétal, et doivent donc être adaptées pour les validations de médicaments à base de plantes.
Il apparaît alors important d'établir des guides aidant à la préparation des standards de validation adaptés aux produits végétaux, car si les données obtenues à l'issu des essais de validation sont insuffisantes ou inadaptées, les outils statistiques, aussi performants soient-ils, ne pourront pas permettre d'évaluer correctement la qualité de la méthode d'analyse.

III.3. ETUDE PRATIQUE : VALIDATION ANALYTIQUE D'UN PRODUIT DE PHYTOTHÉRAPIE

Le but de cette étude était de valider la méthode de dosage d'un marqueur analytique par chromatographie liquide en mode gradient avec une détection UV, dans un produit fini composé à 100 % de poudre de plante. Pour des raisons de confidentialité, aucun détail sur le produit fini concerné ne peut être communiqué dans cette thèse.

Cette validation a ensuite été présentée aux autorités dans le cadre de la soumission du dossier d'autorisation de mise sur le marché du médicament, et a été acceptée sans remarques ou demande d'informations complémentaires.

III.3.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

III.3.1.1. Domaine de validation

La plante contenue dans le produit fini possédant une monographie à la Pharmacopée Européenne, le marqueur utilisé est celui préconisé par cette monographie.

Le domaine de validation a été calculé en tenant compte de la spécification concernant la teneur du marqueur proposé par la monographie Ph. Eur., de la perte à la dessiccation maximale admise sur la substance végétale, ainsi que de la teneur maximale obtenue sur le recul historique de la teneur des lots.

Il a donc été choisi de valider :

- de 80 % de la spécification minimale corrigée par la perte à la dessiccation, soit 0,036 % *m/m* sur la substance telle que ;
- à 120 % de la teneur maximale observée sur l'historique des lots, soit 0,075 % *m/m* sur la substance telle que.

Nous avons travaillé sur un lot de produit fini quantifié en interne à une teneur en marqueur de 0,053 % *m/m* sur la substance telle que.

Ainsi, pour couvrir le domaine de validation choisi, les prises d'essai de produit fini ont été adaptées.

III.3.1.2. Plans d'expérience

Pour cette validation, le nombre *I* de séries de validation a été fixé à 3, en considérant qu'une série est équivalente à un jour.

Pour le plan d'expérience de validation, le nombre *J* de répétitions a été fixé à 3 et le nombre de niveaux de concentration *K* est de 5 : 60%, 80%, 100%, 120% et 140% de la teneur en marqueur de la matière utilisée pour effectuer la validation.

Pour le plan d'expérience d'étalonnage, le nombre *J'* de répétitions est fixé à 2 et le nombre de niveaux de concentration *K'* est de 1 : 100% de la teneur en marqueur de la matière utilisée pour effectuer la validation.

III.3.1.3. Appareillage

Le dosage du marqueur dans le produit fini est réalisé à l'aide d'une chaîne HPLC Waters Alliance (appareillage A), et d'une UHPLC Dionex (appareillage B).
La colonne utilisée sur ces deux appareillages est de type Hypersil C18 provenant de chez Thermo-Hypersil-Keystone.

III.3.1.4. Echantillons, réactifs et matériaux

La forme pharmaceutique reconstituée est obtenue à partir d'un lot de produit fini.
Le témoin utilisé provient de chez Extrasynthèse, et est déclaré à une pureté de 100,00 %.
Les solvants utilisés proviennent de chez Sigma-Aldrich et sont tous de qualité HPLC.
Les filtres utilisés sont des filtres de 0,45µm en PTFE et des filtres de 0,22µm en PVDF provenant de chez Millipore.

III.3.1.5. Méthode d'extraction

Le produit est extrait trois fois en utilisant du *méthanol R*, par extraction à reflux au bain-marie pendant 30 minutes.
La solution est ensuite filtrée, puis complétée par du méthanol R à un volume de 250,0 ml. 50,0 ml de filtrat sont évaporés à siccité, puis le résidu est repris dans 5,0 ml de phase mobile A composée d'*eau R*, de *méthanol R*, de *tétrahydrofuranne R* et d'*acide acétique R*. Cette solution est ensuite filtrée sur un filtre membranaire 0,45 µm en PTFE avant injection.

Les témoins sont préparés par dissolution du composé témoin dans de la phase mobile.

III.3.1.6. Méthode de dosage

Le dosage est effectué par chromatographie liquide (Ph. Eur. *2.2.29*).
L'analyse quantitative du marqueur est effectuée par un détecteur UV couplé au système chromatographique.
La séparation chromatographique est réalisée sur une précolonne de type C18 suivie d'une colonne Hypersil C18 (250 mm × 4,6 mm de diamètre interne, taille des particules de 5 µm).
L'élution se fait à un débit de 0,5 ml/min, avec une phase mobile A composée d'*eau R*, de *méthanol R*, de *tétrahydrofuranne R* et d'*acide acétique R* (42/45/5/8 *V/V/V/V*), et une phase mobile B composée de *méthanol R*. Le profil du gradient d'élution est indiqué dans le Tableau 2.
La colonne est maintenue à une température de 25°C et le volume d'injection est de 20 µl.

Tableau 2 Profil du gradient d'élution pour l'analyse quantitative par HPLC du marqueur

Temps (min)	Phase mobile A (% *V/V*)	Phase mobile B (% *V/V*)
0	100	0
40	100	0
41	30	70
60	30	70
61	100	0
75	100	0

La détection s'effectue à la longueur d'onde fixe de 258 nm, correspondant à un maximum d'absorption du marqueur, et également en barrette de diodes sur la zone spectrale entre 200 nm et 450 nm.

Le calcul de la teneur en marqueur en mg/gélule de produit tel que, s'effectue en utilisant l'expression suivante :

$$T_{PF}\ (\%) = \frac{Ae \times mt \times P \times Ve \times PM}{At \times me \times Vt}$$

Avec :

Ae : Aire du pic de marqueur dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ;

At : Aire du pic de marqueur dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin ;

me : Prise d'essai de forme pharmaceutique reconstituée, en grammes ;

mt : Prise d'essai de témoin, en grammes ;

P : Pureté du témoin, en % ;

Ve : Volume de dilution de la solution à examiner, en millilitres ;

Vt : Volume de dilution de la solution témoin, en millilitres ;

PM : Masse théorique du contenu d'une gélule.

III.3.2. RÉSULTATS

III.3.2.1. Spécificité

La spécificité de la méthode de dosage du marqueur dans le produit est étudiée par comparaison des chromatogrammes obtenus à partir d'une solution de blanc de dilution (phase mobile A), d'une solution de standard d'étalonnage, et d'une solution de standard de validation.
De plus, la superposition spectrale (200-450 nm) des pics de marqueur des chromatogrammes obtenus à partir des standards d'étalonnage et de validation est effectuée.

Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 3 :

Tableau 3 Résultats de l'étude de spécificité

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

La spécificité de la méthode est confirmée par :

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

La méthode de dosage est spécifique et permet le dosage du marqueur dans le produit.

III.3.2.2. Concentrations inverses prédites

Les concentrations inverses prédites ou concentrations retrouvées Z des standards de validation sont calculées en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage.
Ces concentrations retrouvées permettent de calculer le biais de chaque mesurage, et également de vérifier la linéarité de la méthode.

III.3.2.3. Linéarité

La linéarité de la méthode de dosage est vérifiée sur l'intervalle de validation, en utilisant les données des premières répétitions de chaque niveau de concentration, pour les trois séries de validation.
La linéarité est, dans un premier temps, évaluée par comparaison visuelle des représentations graphiques des réponses instrumentales Y en fonction des concentrations introduites X selon la fonction $\left[Y = f\left(X\right)\right]$, pour la forme pharmaceutique reconstituée et pour les standards d'étalonnage.
Dans un deuxième temps, la linéarité de la relation entre les concentrations retrouvées Z et les concentrations introduites X est évaluée en représentant graphiquement la fonction $\left[Z = f\left(X\right)\right]$ pour les trois séries de validation conjointement. Une analyse statistique de la droite obtenue est effectuée, la pente est comparée à la valeur de référence 1, l'ordonnée à l'origine est comparée à la valeur de référence 0, et la vérification de l'ajustement est effectuée.

Les résultats obtenus pour la comparaison des droites $\left[Y = f\left(X\right)\right]$ pour les standards d'étalonnage (SE) et les standards de validation (SV) sont résumés dans le Tableau 4:

Tableau 4 Résultats des comparaisons des droites $[Z = f(X)]$

Séries de validation	Superposition visuelle des droites SE et SV
1	Conforme
2	Conforme
3	Conforme

La droite $[Z = f(X)]$ est représentée à la Figure 6, et les résultats de l'analyse statistique sont résumés dans le Tableau 5:

Figure 6 Droite $[Z = f(X)]$

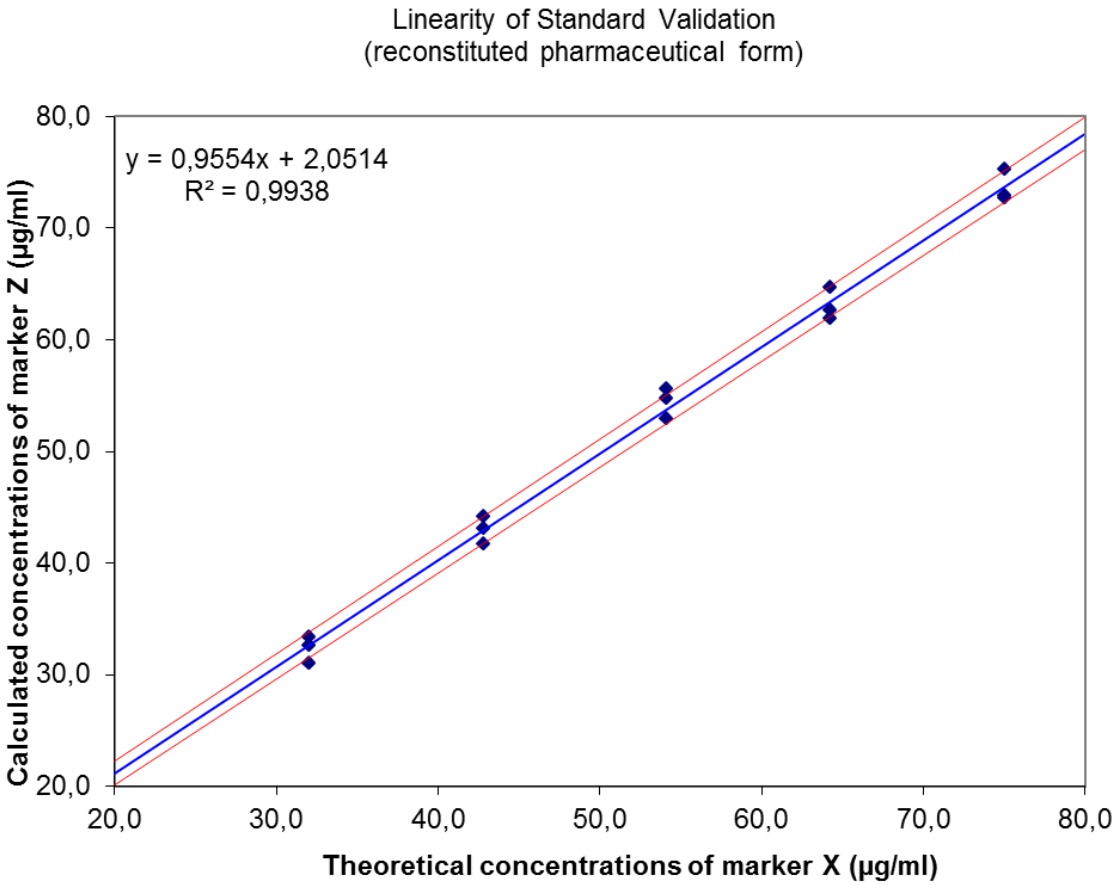


Tableau 5 Résultats de l'étude statistique sur la droite $[Z = f(X)]$

Paramètre calculé	Résultat
Pente	0.9554
Ordonnée à l'origine	2.0514
Coefficient de détermination	0.9938
Comparaison de la pente à 1	Intervalle de confiance (risque 5%) : [0.9063; 1.0032] La pente est significativement différente de zéro, il existe une relation linéaire La pente n'est pas significativement différente de 1 (risque 5%)
Comparaison de l'ordonnée à l'origine à zéro	Intervalle de confiance (risque 5%) : [-0.6158; 4.7865] L'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de zéro (risque 5%)
Test de validité de l'ajustement	Somme des carrés résiduels : 0.7% < 1% Le modèle d'étalonnage est bien adapté à la réponse

La comparaison des droites $[Y = f(X)]$ pour les standards d'étalonnage et les standards de validation est satisfaisante. Le système d'étalonnage choisi est satisfaisant.

La linéarité des droites $[Z = f(X)]$ pour les trois séries est confirmée par :

- un coefficient de détermination acceptable de 0,9938 ;
- la pente est comparable à 1 au risque 5% ;
- l'ordonnée à l'origine est comparable à zéro au risque 5% ;
- le pourcentage de résidus est satisfaisant 0,7% < 1%, le modèle d'étalonnage est bien adapté à la réponse.

La méthode de dosage est linéaire pour l'intervalle de validation, soit pour une teneur en marqueur allant de 0,030 à 0,075 % *m/m* sur la substance telle que.

III.3.2.4. Construction du profil d'exactitude

III.3.2.4.1. Fidélité par série

La fidélité de la méthode est évaluée sur chaque série de validation, en utilisant les données obtenues pour les trois répétitions des niveaux de concentrations 60%, 100% et 140%.

Les recouvrements entre les concentrations introduites X et les concentrations retrouvées Z sont calculés pour les trois séries, puis une analyse statistique est effectuée sur ces résultats.

Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau 6, et les résultats de l'étude statistique sont donnés dans le Tableau 7 :

Tableau 6 Recouvrements entre *X* et *Z*

Standards de validation		Recouvrements (%)		
Niveau de concentration	Répétition	Série 1	Série 2	Série 3
60%	1	102,01	104,22	97,02
	2	103,00	104,15	97,83
	3	104,44	104,74	98,88
100%	1	101,19	102,79	97,85
	2	99,11	101,56	98,76
	3	98,46	101,78	98,39
140%	1	96,92	100,29	97,16
	2	97,16	100,23	97,72
	3	97,40	100,63	97,56

Tableau 7 Etude statistique de fidélité par série

Paramètre calculé	Résultat
Nombre de groupes	3
Nombre de valeurs par groupe	9
Nombre de valeurs	27
Somme des moyennes	300,14
Somme des variances	11,28
Variance de répétabilité	3,76
Variance inter-groupes	4,33
Variance de fidélité intermédiaire	8,10
Ecart-type de fidélité intermédiaire	2,85
Recouvrement moyen	100,05
Homogénéité des variances	Test de Cochran Variances statistiquement homogènes (α = 0,01)
CV% de répétabilité	1,9
CV% de fidélité intermédiaire	2,8
Intervalle de confiance du recouvrement moyen	m ± 1,13 [98,92 ; 100,05 ; 101,17]
Intervalle de confiance d'une valeur individuelle	m ± 5,69 [94,36 ; 100,05 ; 105,74]

Les résultats de l'analyse statistique montrent que la méthode est fidèle, avec un écart-type de répétabilité de 1,9% et un écart-type de fidélité intermédiaire de 2,8%.

III.3.2.4.2. Justesse et fidélité par niveau de concentration

La fidélité de la méthode pouvant dépendre du niveau de concentration de l'analyte, une analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) est effectuée pour les niveaux de concentration 60%, 100% et 140%.

Les écart-types de répétabilité et de fidélité intermédiaire, ainsi que le biais relatif des résultats sont évalués.

La justesse de la méthode sur l'intervalle de validation considéré est évaluée en calculant l'intervalle de confiance du recouvrement moyen par niveau de concentration, et en vérifiant que la valeur cible 100 % est inclue dans cet intervalle.

Dans le cas où les valeurs sont très faiblement dispersées, l'intervalle de confiance peut être très étroit et exclure la valeur 100 % sans pour autant signifier que la méthode n'est pas juste. Un biais relatif inférieur à 2 % est alors considéré comme acceptable.

Les résultats sont représentés dans le Tableau 8:

Tableau 8 Etude statistique de justesse et de fidélité par niveau de concentration

Paramètre calculé	Résultat		
	60 %	100 %	140 %
Moyenne des recouvrements moyens	101,81	99,63	98,34
Biais relatif (%)	1,81	-0,37	-1,66
Homogénéité des variances Test de Cochran	Variances statistiquement homogènes (α = 0,05)	Variances statistiquement homogènes (α = 0,05)	Variances statistiquement homogènes (α = 0,05)
Intervalle de confiance du recouvrement moyen	[99,1 ; 101,8 ; 104,5]	[98,3 ; 99,6 ; 101,0]	[97,0 ; 98,3 ; 99,7]
CV de répétabilité (%)	0,9	1,1	0,3
CV de répétabilité « intergroupe » (%)	3,3	1,4	1,7
CV de fidélité intermédiaire (%)	3,4	1,8	1,7

Les résultats de l'analyse statistique montrent que la méthode est fidèle pour chaque niveau de concentration, avec des coefficients de variation de répétabilité

inférieurs à 2% et des coefficients de variation de fidélité intermédiaire ne dépassant pas 3%.
La justesse par niveau de concentration est satisfaisante, compte tenu du fait que les biais relatifs sont inférieurs à 2% pour les trois niveaux et que les intervalles de confiance du recouvrement moyen contiennent ou sont très proches de la valeur cible 100%.

III.3.2.4.3. Intervalle de tolérance et profil d'exactitude

Les limites inférieure et supérieure de l'intervalle de tolérance sont calculées pour les niveaux de concentration 60%, 100%, et 140%, avec une probabilité β de 80%.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 9:

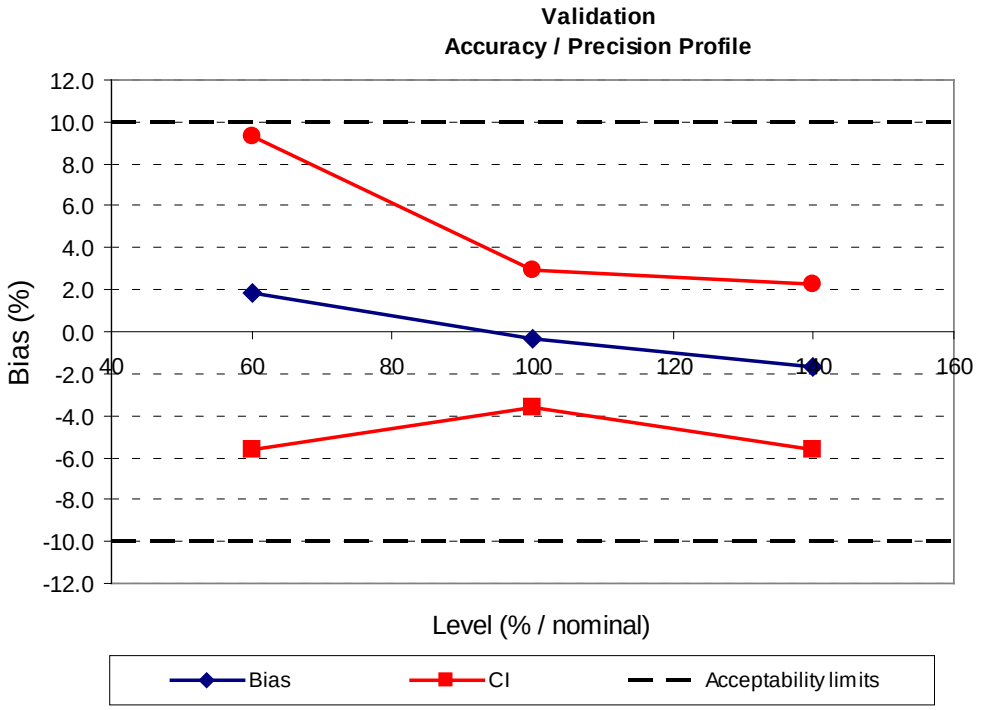
Tableau 9 Calcul de l'intervalle de tolérance

Niveau de concentration	Biais relatif (%)	Ecart-type de l'intervalle de tolérance s_{IT} (%)	Facteur de couverture k_{IT}	Limite inférieure (%)	Limite supérieure (%)
60	1,81	3,96	1,89	-5,66	9,28
100	-0,37	2,00	1,64	-3,64	2,91
140	-0,66	2,10	1,89	-5,61	2,29

Le profil d'exactitude est représenté graphiquement avec en abscisse les niveaux de concentration étudiés, en ordonnée le biais relatif (%), et en y reportant le biais relatif moyen par niveau de concentration, les limites de l'intervalle de tolérance ainsi que les limites d'acceptabilité de la méthode.

Le profil d'exactitude obtenu est représenté en Figure 7 :

Figure 7 Profil d'exactitude



Les limites inférieure et supérieure de l'intervalle de tolérance sont incluses dans la limite d'acceptabilité fixée à ± 10%.

Comme vu à la section I.6.1, cette limite d'acceptabilité λ devrait être de 5% pour le dosage d'une substance active dans un produit fini. Cependant, compte tenu de la faible concentration du marqueur analytique dans le produit et de la variabilité induite par la préparation d'échantillon, une limite d'acceptabilité élargie à ± 10% est justifiable.

III.3.2.5. Stabilité des solutions

La stabilité des solutions utilisées pour la validation analytique a été vérifiée.

Les solutions sont stables durant 7 jours conservées au réfrigérateur (+4°C).

III.3.3. CONCLUSIONS

III.3.3.1. Synthèse des résultats

La spécificité, la linéarité et l'exactitude de la méthode de dosage du marqueur analytique dans le produit fini sont démontrées sur les intervalles :

- 0,030 à 0,075 % *m/m* de marqueur analytique dans la poudre de plante ;
- 0,10 à 0,24 mg/gélule de marqueur analytique dans le produit fini.

Ces intervalles sont cohérents avec les critères d'acceptation :

- ≥ 0,05% *m/m* de marqueur dans la poudre de plante desséchée ;
- ≥ 0,14 mg/gélule de marqueur dans le produit fini ;
- Au cours des études de stabilité, teneur initiale en marqueur ± 10%.

La méthode analytique est validée pour les limites d'acceptation définies, et sur les intervalles décrits. La méthode de dosage du marqueur analytique dans le produit fini par chromatographie liquide est validée en termes de spécificité, linéarité, justesse et fidélité.

III.3.3.2. Commentaires sur le protocole de validation établi

Le protocole de validation développé à partir des guides de validation analytique SFSTP 2003-2006 est bien applicable aux validations analytiques des méthodes de dosage des médicaments à base de plante(s).

L'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision permet de visualiser rapidement et clairement les caractéristiques des résultats qui seront obtenus en utilisant la méthode analytique validée.

Cette représentation va pouvoir aider l'analyste à justifier que les critères d'acceptation établis sont adéquats, adaptés à la méthode analytique et au produit auquel elle est appliquée.

Par exemple, comme vu au chapitre 4.6 de la partie II de cette thèse, la directive 75/318/CEE amendée stipule pour les médicaments que :

> « Sauf justification appropriée, les écarts maximaux tolérables de la teneur en substance active ne peuvent dépasser ±5% dans les produits finis au moment de la fabrication. […] Les limites excédant ±5% au moment de la libération doivent être justifiées dans la partie « Développement du procédé de fabrication » par des résultats expérimentaux habituellement basés sur un intervalle de confiance de 95%. Les limites élargies incluent également les variations liées à la production et à la procédure analytique. »

Le profil d'exactitude obtenu à partir des résultats de validation peut permettre de soutenir la justification d'un écart de teneur en substance active supérieur à ±5% dans le cas des méthodes de dosage où la variabilité est relativement importante, du fait de l'erreur analytique et/ou du produit considéré. Il est en effet plus aisé de commenter une représentation visuelle des résultats obtenus, plutôt qu'une liste de performances diverses de la méthode, dont il peut être difficile de voir l'impact sur les résultats.

III.3.3.3. Perspectives

Ce protocole de validation a été approuvé par le responsable du laboratoire de R&D et est désormais utilisé pour les validations analytiques au sein du laboratoire de R&D.

Il n'est cependant pas figé et doit être adapté au produit et à la méthode d'analyse à valider.

La mise en place du profil d'exactitude comme outil de décision pour les validations analytique est une avancée majeure consécutive à l'implémentation de ce protocole de validation.

Ce protocole pourra par exemple servir de base au développement d'une procédure plus adaptée aux méthodes analytiques permettant de doser de faibles quantités de marqueurs, en utilisant par exemple la méthode des ajouts dosés. Le profil d'exactitude pourra cependant être conservé comme outil de décision, en raison des multiples avantages qu'il offre et qui ont été décrits dans cette thèse.

CONCLUSION

La validation des procédures analytiques est aujourd'hui un principe accepté et utilisé dans tous les domaines d'activité générateurs de résultats de mesures.

Cependant, bien que ce principe soit reconnu comme indispensable à la gestion de la Qualité dans l'industrie pharmaceutique, son application pratique n'est pas toujours aisée.
En effet, bien qu'il existe de nombreux documents officiels décrivant les critères de validation à tester, les sources proposant des solutions pratiques en termes de protocoles expérimentaux sont rares.

De plus, le protocole expérimental de validation devant être adapté au produit étudié, ces quelques guides ne peuvent pas offrir une solution exhaustive applicable sans adaptation à tous les produits possibles.
Les médicaments à base de plante(s) représentent l'un de ces cas particuliers dont les guides de validation, ainsi que les guidelines actuellement en vigueur, ne tiennent pas compte. L'adaptation de ces textes est donc nécessaire afin de mener à bien les validations analytiques pour ce type de produits, nécessitant une réflexion importante et une bonne connaissance à la fois de la validation analytique, et des spécificités de ces produits.
C'est dans ce cadre que ce travail a trouvé toute sa justification.

Une proposition de protocole de validation s'appuyant sur les guides de validation SFSTP 2003-2006 et adaptée aux médicaments à base de plante(s) a été testée en conditions réelles, pour la validation d'un médicament constitué à 100% de poudre de plante.
Cet essai s'est révélé concluant, et a permis de démontrer que les outils statistiques proposés par les guides de validation SFSTP 2003-2006 pouvaient être appliqués à la validation analytique des médicaments à base de plante(s).

Ce travail représente une porte entrouverte sur ce qui peut être fait dans le domaine de la validation analytique des médicaments à base de plante(s), et propose une solution exploitable permettant de satisfaire aux exigences réglementaires en vigueur.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais . ISO/CEI 17025:2005.

[2] Note for guidance on validation of analytical procedures: Text and methodology. *ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.* CPMP/ICH/381/95.

[3] **Hubert P., Nguyen-Huu J.J., Boulanger B. et al., 2003.** Validation of quantitative analytical procedures: harmonization of approaches. *STP Pharma Pratiques.* 2003, 13, 3, 101-138.

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

[5] **Feinberg M., Laurentie M.,** A global approach to method validation and measurement uncertainty. *Accreditation and Quality Assurance.* 2006, 11, 3–9.

[6] **Morgenthaler S.,** *Introduction à la statistique.* s.l. : PPUR presses polytechniques, 2007, 385 pages.

[7] **Caporal-Gautier J., Nivet J.M., Algranti P. et al.,** Analytical validation guide, Part I. *STP Pharma Pratiques.* 1992, 2, 4, 205-226.

[8] **Caporal-Gautier J., Nivet J.M., Algranti P. et al.,** Analytical validation guide, Part II. *STP Pharma Pratiques.* 1992, 2, 4, 227-239.

[9] **Chapuzet E., Mercier N.,** Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. *STP Pharma Pratiques.* 1997, 7, 3, 169-194.

[10] **Hubert P., Nguyen-Huu J.J., Boulanger B. et al., 2006.** Validation of quantitative analytical procedures: harmonization of approaches. Part II. Statistics. *STP Pharma Pratiques.* 2006, 16, 1, 30-60.

[11] **Hubert P., Nguyen-Huu J.J., Boulanger B. et al., 2006.** Validation of quantitative analytical procedures: harmonization of approaches. Part III. Examples of application. *STP Pharma Pratiques.* 2006, 16, 2, 87-121.

[12] **Hubert P., Nguyen-Huu J.J., Boulanger B. et al.,** Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal part IV. Examples of application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2008, 48, 3, 760-771.

[13] **Gustavo González A., Ángeles Herrador M.,** A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. . *Trends in Analytical Chemistry.* 2007, 26, 3, 227-238.

[14] **Feinberg M., Boulanger B., Dewé W., Hubert P.,** New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2004, 380, 502-514.

[15] **Rozet E., Hubert C., Ceccato A., et al.,** Using tolerance intervals in pre-study validation of analytical methods to predict in-study results. The fit-for-future-purpose concept. *Journal of Chromatography A.* 2007, 1158, 126-137.

[16] **Inczedy J., Lengyel T., Ure A.M.,** *IUPAC, Compendium of Analytical Nomenclature – 3rd edition.* s.l. : Blackwell Science, 1998, 264 pages.

[17] **Mee R.,** β-expectation and β-content tolerance limits for balanced one-way ANOVA random model. *Technometrics.* 1984, 26, 3, 251-254.

[18] **Feinberg M.,** Validation of analytical methods based on accuracy profiles. *Journal of Chromatography A.* 2007, 1158, 174-183.

[19] **Boyer K.W., Horwitz W., Albert R.,** Interlaboratory variability in trace element analysis. *Analytical Chemistry.* 1985, 57, 2, 454-9.

[20] Guide technique pour l'élaboration des monogtaphies. EDQM 6e edition – 2011.

[21] Specifications and control tests on the finished product. Eudralex 3AQ11a.

[22] **Feinberg M.,** Mise en oeuvre du profil d'exactitude. *Cahier des techniques de l'INRA.* N° special, 2010, 27-44.

[23] Directive 2004/24/CE du Parlement européen et du Conseil. *Journal officiel de l'Union Européenne.*

[24] http://www.emea.eu.int/. *Site officiel de l'Agence Européenne d'évaluation des médicaments (EMEA) .* [En ligne] Consulté le 13/03/2014.

[25] **Pothier J.,** La variabilité des plantes, problème important en phytothérapie, notion de chimiotype. *La phytothérapie européenne.* 2011, 65, 26-28.

[26] Guideline on specifications: tests procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products. CPMP/QWP/2820/00 Rev. 2.

[27] Guideline on Good Agricultural and Collection Practice (GACP) for starting materials of herbal origin. EMEA/HMPC/246816/2005.

[28] **Sahoo N., Manchikanti P., Dey S.,** Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia.* 2010, 81, 6, 462-471.

[29] Guideline on summary of requirements for active substances in the quality part of the dossier. CHMP/QWP/297/97 Rev. 1.

[30] Reflexion paper on markers used for quantitative and qualitative analysis of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products. EMEA/HMPC/253629/2007.

[31] Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products. CPMP/QWP/2819/00 Rev. 2.

[32] Guideline on quality of combination herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products. EMEA/HMPC/CHMP/CVMP/214869/2006.

[33] **Khan, Ikhlas A. 2006.** Issues related to botanicals. *Life Sciences.* 2006, 78, 18, 2033-2038.

[34] **Srini Srinivasan V.,** Challenges and scientific issues in the standardization of botanicals and their preparations. United States Pharmacopeia's dietary supplement verification program – A public health program. *Life Sciences.* 2006, 78, 2039-2043.

[35] **Zhang J., Wider B., Shang H., et al.,** Quality of herbal medicines: Challenges and solutions. *Complementary Therapies in Medicine.* 2012, 20, 100-106.

[36] **Xie Y., Jiang Z.H., Zhou H., et al.,** Combinative method using HPLC fingerprint and quantitative analyses for quality consistency assessment of a herbal medicinal preparation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2007, 43, 1, 204-212.

[37] **Li Y., Wu T., Zhu J.,** Combinative method using HPLC fingerprint and quantitative analyses for quanlity consistency evaluation of an herbal medicinal preparation produced by different manufacturers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2010, 52, 4, 597-602.

[38] **Liu Y., Shi X.W., Liu E.H et al.,** More accurate matrix-matched quantification using standard superposition method for herbal medicines. *Journal of Chromatography A.* 2012, 1254, 43-50.

[39] **Schwarz M., Klier B., Sievers H.,** Herbal Reference Standards. *Planta Medica.* 2009, 75, 7, 689-703.

[40] **Shi Ong E.,** Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *Journal of Chromatography B.* 2004, 812, 23-33.

[41] **Bellenot D., Toure H., Chanel-Audigier I. et al.,** Problématiques liées au développement d'une procédure analytique de dosage de constituants dans les médicaments à base de plante(s). Partie I. Données de la littérature et commentaires. *STP Pharma Pratiques.* 2012, 22, 1, 3-15.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Isabelle PINGUET

Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie

---

RESUME :

Le contrôle analytique avant libération d'un médicament sur le marché est une étape importante et nécessaire pour garantir la qualité du produit qui va être délivré aux patients.

Les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de prouver que les méthodes utilisées lors de ce contrôle sont parfaitement valides et fiables, en procédant à leur validation.

L'utilisation du profil d'exactitude couplé à l'intervalle de tolérance comme outil de décision de validation est une méthode développée par une commission de la SFSTP parue en 2003 et en 2006 dans les guides STP Pharma Pratiques. Cet outil de décision permet de prévoir avec quelle garantie une proportion donnée des résultats futurs obtenus avec la méthode seront compris dans des limites d'acceptabilité fixées au préalable.

Cette thèse propose une application pratique de la procédure publiée par la SFSTP en 2003 et 2006 utilisant le profil d'exactitude, à la validation analytique de produits aux caractéristiques bien spécifiques et jusqu'alors oubliés des guides de validation : les produits de phytothérapie, ou médicaments à base de plante(s).

MOTS CLES : Validation analytique – Médicaments à base de plante(s) – Profil d'exactitude – Industrie pharmaceutique

Isabelle PINGUET

Analytical validation : application of SFSTP 2003-2006 procedure to herbal medicines

---

SUMMARY:

Analytical control of a medicinal product before its release on the market is an important and necessary step to guarantee the quality of the product that is going to be delivered to patients.
Pharmaceutical laboratories are required to prove that analytical procedures used for this control are highly valid and reliable, by performing an analytical validation.

The use of accuracy profile based on tolerance interval as decision tool for validation is a procedure developed by a SFSTP commission, published in 2003 and 2006 in STP Pharma Pratiques guides. This decision tool allows to anticipate the guarantee that a given proportion of future results obtained with the procedure will be within pre-established acceptability limits.

This thesis provides a practical application of the procedure published by SFSTP in 2003 and 2006 using accuracy profile, to the analytical validation of products with very specific characteristics and up to now neglected of validation guides: herbal medicinal products, or HMPs.

KEY WORDS: Analytical validation – Herbal medicinal products – Accuracy profile – Pharmaceutical industry