



**HAL**  
open science

## Plan directeur et validation d'une méthode de dosage : application au Ringer Lactate Vetoflex®

Tracy Garcia

### ► To cite this version:

Tracy Garcia. Plan directeur et validation d'une méthode de dosage : application au Ringer Lactate Vetoflex®. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-01983989

**HAL Id: dumas-01983989**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01983989>**

Submitted on 16 Jan 2019

**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.

Université de Bordeaux

U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2018

N°114

Thèse pour l'obtention du

**DIPLOME d'ÉTAT de DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement

Par GARCIA Tracy

Née le 11 août 1994 à Bordeaux

Le 30 novembre 2018 à Bordeaux

Plan directeur et validation d'une méthode de dosage :  
Application au Ringer Lactate Vetoflex<sup>®</sup>

Sous la direction du Docteur Alexandra Gaubert

*Membres du jury :*

Mme Karen Gaudin	Professeur	Présidente
Mme Alexandra Gaubert	Maître de conférences	Directrice
Mme Marie-Hélène Langlois	Maître de conférences	Examineur
Mme Lucile Odin	Pharmacien	Examineur

# Remerciements

---

*Je souhaite témoigner ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué à la rédaction de cette thèse et qui m'ont accompagnée ces six longues dernières années...*

À **Madame le Docteur Alexandra GAUBERT**, pour avoir accepté de diriger cette thèse, j'en suis ravie. Je vous remercie pour toute l'aide, le soutien, les conseils et le temps que vous m'avez précieusement consacrés. Sans votre engagement, cette thèse n'aurait pas vu le jour, merci pour tout.

À **Madame le Professeur Karen GAUDIN**, je vous remercie d'accepter de présider mon jury de thèse. À **Madame le Docteur Marie-Hélène LANGLOIS** pour avoir accepté de juger mon travail. S'il faut être honnête, mon affinité pour la qualité et l'analytique a commencé sur les bancs des amphithéâtres. Je vous remercie donc pour vos enseignements qui m'ont donné envie de poursuivre ce chemin et pour votre contribution à cette thèse.

À **Madame le Docteur Lucile ODIN**, qui partage la même passion que moi pour la qualité en industrie pharmaceutique et qui me fait l'honneur de juger cet écrit.

À mes parents, **Maman** et **Michel**, à qui je dois tout. Vous avez tout mis en œuvre pour que je puisse me forger un avenir. Sachez que je suis fière de mes études et sans vous, sans votre soutien au quotidien, je n'aurais pas réussi. Merci pour tout, et merci de m'avoir supportée toutes ces années.

À **Alexis**, tu as embelli ces quatre dernières années de mon existence. Ta présence à chacun des moments de ma vie étudiante, professionnelle et personnelle représente tout pour moi. Tu as été un réel pilier toutes ces années, je n'imagine plus réussir sans toi. Merci pour tout ce bonheur à tes côtés.

À ma sœur **Lauren** et à mon frère **Samy**, toujours là pour moi quoi qu'il arrive. Vous avez toujours cru en moi et en ma réussite même lorsque j'en doutais. À **Leslie** et à **Romain**. Tous les moments passés ensemble je ne les oublierai pas alors un grand merci à tous les quatre.

À **Papa** et **Florence**, avec qui je souhaite partager cette étape importante à mes yeux, à savoir la thèse qui marque la fin des études mais le début d'une nouvelle vie. J'espère que nous pourrons ensemble vivre de nombreux bons moments.

À **Nathalie**, **Patrice**, **Andréa** et **Thomas**, je suis très heureuse de vous compter parmi mes proches et de partager avec vous d'agréables moments.

Aux **amis**, de l'école primaire à la fac, avec qui j'ai pu m'amuser toutes ces années, profiter de la vie et créer des souvenirs. Pussions-nous ensemble avoir encore plein de fous rires et vivre plein de belles choses. À l'amitié, à Mathilde, Pauline B., Virginie, Robin, Laurent, Florian, Yoann, Pauline G. et au groupe de copines de la fac.

À toute **l'équipe du laboratoire de contrôle qualité de Bioluz**, ce stage de fin d'études à vos côtés m'a donné l'inspiration nécessaire à cette thèse. Merci pour les six mois passés ensemble, j'en garde un bon souvenir.

À **Andy**, mon fidèle compagnon.

---

## Table des abréviations

---

ADC	Article De Conditionnement
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
BPF	Bonnes Pratiques de Fabrication
C	Statistique de Cochran
Cc°	Concentration
CQ	Contrôle Qualité
CV	Coefficient de Variation
CVr	Coefficient de Variation de répétabilité
CVR	Coefficient de Variation de fidélité intermédiaire
EDQM	Direction Européenne de la Qualité du Médicament & soins de santé <i>(European Directorate for the Quality of Medicines &amp; Healthcare)</i>
EPPI	Eau Pour Préparation Injectable
F	Statistique de Fisher
FR	Forme Reconstituée
H <sub>0</sub>	Hypothèse nulle
ICH	Conférence Internationale d'Harmonisation <i>(International Conference on Harmonization)</i>
IRM	Intervalle de confiance sur le Recouvrement Moyen
MP	Matière Première
PDV	Plan Directeur de Validation
Ph. Eur.	Pharmacopée Européenne
PF	Produit Fini
PV	Protocole de Validation
QC	Qualification de Conception
QI	Qualification d'Installation
QO	Qualification Opérationnelle
QP	Qualification des Performances

Qsp	Quantité suffisante pour
RCP	Résumé des Caractéristiques du Produit
RV	Rapport de Validation
SA	Substance Active
SF	Semi Fini
SCE <sub>Fac</sub>	Somme des Carrés des Écarts Factoriels
SCE <sub>Res</sub>	Somme des Carrés des Écarts Résiduels
SCE <sub>Tot</sub>	Somme des Carrés des Écarts Totaux
SFSTP	Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques
SM	Solution Mère
t	Statistique de Student
Var <sub>ep</sub>	Variance due à l'erreur pure
Var <sub>Lin</sub>	Variance due au manque d'ajustement linéaire
V <sub>éq</sub>	Volume équivalent
%R	Pourcentage de Recouvrement

# Glossaire

---

**Effet matrice :** Influence du milieu analysé sur l'élément dosé.

**Équilibrée :** Une méthode analytique est considérée « équilibrée » lorsque les données de fidélité et justesse sont obtenues au moyen de plusieurs séries de mesures homogènes : I séries ( $I \geq 3$ ), J répétitions ( $J \geq 2$ ) et  $I \times J \geq 9$ .

**Forme reconstituée :** Un mélange de tous les composants correspondant qualitativement à la forme pharmaceutique à étudier, excepté la substance à tester qui sera ajoutée en quantité variable suivant le critère étudié.

**Matrice :** Ensemble des constituants de l'échantillon autres que l'analyte d'intérêt.

**Procédure analytique :** Procédure écrite décrivant l'ensemble des moyens et modes opératoires nécessaires pour effectuer l'analyse de l'analyte, c'est-à-dire : domaine d'application, principe et/ou réactions, définitions, réactifs, appareillage, modes opératoires, expression des résultats, tests de conformité, rapport d'essai.

**Risque de significativité  $\alpha$  (dit risque de première espèce) :** Probabilité de rejeter une hypothèse vraie à l'issue d'un test statistique. Ce risque est fixé avant de réaliser un test (5% dans le cadre de cette thèse).

**Standard de validation :** Échantillon, reconstitué dans la matrice ou tout autre matériau de référence, dont la valeur vraie a pu être établie par consensus et qui est utilisé pour la validation de la procédure d'analyse.

**Utilités :** Dans le secteur industriel, les utilités représentent les fluides énergétiques nécessaires au fonctionnement des lignes de production. Par exemple, les systèmes de traitement d'air HVAC (*Heating, Ventilation and Air-Conditioning*) dans les zones à atmosphère contrôlée sont des utilités.

# Table des matières

---

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>1</b>
<b>TABLE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>3</b>
<b>GLOSSAIRE .....</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>11</b>
<b>PARTIE 1 : ÉTAT DE L'ART .....</b>	<b>13</b>
<i>Chapitre 1 : Mise en place d'un plan directeur de validation .....</i>	<i>13</i>
1. DÉFINITION ET INTÉRÊT.....	13
2. CHAMPS D'APPLICATION .....	14
3. OBJECTIF.....	15
4. CONTENU DU PLAN DIRECTEUR DE VALIDATION.....	15
4.1. POLITIQUE ET STRUCTURE ORGANISATIONNELLE DE QUALIFICATION ET VALIDATION.....	16
4.2. RÉCAPITULATIF DES ÉLÉMENTS CONCERNÉS PAR LE PDV .....	16
4.2.1. Intérêt.....	16
4.2.2. Exemple d'un cas pratique.....	16
4.3. LA MAITRISE DES CHANGEMENTS ET LA GESTION DES DÉVIATIONS.....	18
4.4. LES RECOMMANDATIONS CONCERNANT LA DÉTERMINATION DES CRITÈRES D'ACCEPTATION .....	19
4.5. LES RÉFÉRENCES AUX DOCUMENTS EXISTANTS .....	19
4.6. LA STRATÉGIE DE QUALIFICATION, DE VALIDATION ET DE REQUALIFICATION/REVALIDATION .....	20
5. DÉROULEMENT DU PROCESSUS DE QUALIFICATION ET DE VALIDATION .....	20
5.1. ORGANISATION DOCUMENTAIRE.....	20
5.2. PROCESSUS DE QUALIFICATION .....	21
5.3. PROCESSUS DE VALIDATION.....	21
5.3.1. Généralités .....	21
5.3.2. Justification de la stratégie de validation .....	22
6. PLANNING DE REVALIDATION SELON LA GESTION DES RISQUES.....	24
6.1. REQUALIFICATION DES ÉQUIPEMENTS.....	24
6.2. REVALIDATION DES MÉTHODES .....	27
7. DISCUSSION AUTOUR DE LA MISE EN PLACE D'UN PDV .....	29
<i>Chapitre 2 : Qualification des équipements.....</i>	<i>30</i>
1. DÉFINITION ET INTÉRÊTS.....	30
2. CHAMPS D'APPLICATION .....	31
3. OBJECTIFS.....	31
4. LES ÉTAPES DE LA QUALIFICATION.....	31
4.1. LA QUALIFICATION DE CONCEPTION (QC).....	32
4.2. LA QUALIFICATION D'INSTALLATION (QI).....	32
4.2.1 Principe .....	32
4.2.2 Déroulement .....	32
4.3. LA QUALIFICATION OPÉRATIONNELLE (QO) .....	33
4.3.1 Principe .....	33
4.3.2 Déroulement .....	33
4.3.3 Exemple.....	34
4.4. LA QUALIFICATION DES PERFORMANCES (QP).....	34
4.4.1 Principe .....	34
4.4.2 Déroulement .....	34
5. MAINTIEN EN ETAT QUALIFIÉ D'UN ÉQUIPEMENT.....	35

6.	LA DOCUMENTATION.....	36
7.	CAS PRATIQUES.....	37
7.1.	LA QUALIFICATION D'INSTALLATION.....	37
7.1.1	Vérification de la documentation.....	37
7.1.2	Vérification de l'appareil.....	37
7.1.3	Vérification dimensionnelle.....	38
7.1.4	Vérification des accessibilités de l'appareil.....	38
7.1.5	Vérification des conformités.....	38
7.2.	LA QUALIFICATION OPÉRATIONNELLE.....	38
7.2.1	Détermination des tests et de leurs critères d'acceptation.....	39
7.2.2	Déroulement des essais.....	40
7.2.3	Illustration du test n°3.....	40
7.3.	LA QUALIFICATION DES PERFORMANCES.....	41
8.	DISCUSSION AUTOUR DE LA QUALIFICATION.....	44
	<i>Chapitre 3 : Validation analytique d'un dosage</i> .....	46
1.	GÉNÉRALITES.....	46
1.1.	RINGER LACTATE VETOFLEX®.....	46
1.1.1	Indication.....	46
1.1.2	Composition.....	46
1.2.	ARGENTIMÉTRIE.....	47
1.3.	POTENTIOMÉTRIE.....	48
2.	DÉFINITION ET DÉROULEMENT DE LA VALIDATION.....	49
2.1.	OBJECTIF DE LA VALIDATION.....	49
2.2.	LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE VALIDATION.....	49
2.3.	LES RÉFÉRENTIELS ET CRITÈRES UTILISÉS DANS LE CADRE DE LA VALIDATION DE MÉTHODE.....	50
2.3.1	Présentation des différents référentiels.....	50
2.3.2	Critères de validation.....	51
2.3.2.1	La spécificité.....	52
2.3.2.2	La linéarité.....	52
2.3.2.3	L'exactitude.....	55
2.3.2.4	La fidélité.....	56
2.3.2.5	L'intervalle de mesure.....	58
2.3.2.6	L'incertitude de mesure.....	58
	<b>PARTIE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE</b> .....	61
1.	PRÉ-REQUIS À LA VALIDATION.....	61
2.	VALIDATION DU DOSAGE DES CHLORURES.....	62
2.1.	DESCRIPTION DE LA MÉTHODE.....	62
2.2.	REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES ÉTAPES DE LA VALIDATION.....	62
3.	PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL ET PRINCIPAUX RÉSULTATS.....	63
3.1.	SPÉCIFICITÉ.....	63
3.1.1	Protocole.....	63
3.1.2	Résultat.....	64
3.2.	LINÉARITÉ.....	65
3.2.1	Gamme de la substance active seule.....	65
3.2.1.1	Protocole.....	65
3.2.1.2	Résultats.....	66
3.2.1.3	Étude statistique.....	67
3.2.2	Gamme de la forme reconstituée.....	69
3.2.2.1	Protocole.....	69
3.2.2.2	Résultats.....	70
3.2.2.3	Étude statistique.....	71
3.3.	COMPARAISON DES GAMMES.....	72
3.4.	EXACTITUDE.....	74
3.4.1	Résultats.....	74
3.4.2	Étude statistique.....	75

3.5.	FIDÉLITÉ .....	76
3.5.1	Protocole .....	76
3.5.2	Résultats .....	78
3.5.3	Étude statistique .....	80
3.6.	INTERVALLE DE MESURE.....	81
3.7.	INCERTITUDE DE MESURE .....	81
4.	STATUT DE LA MÉTHODE : VALIDÉE OU NON VALIDÉE ? .....	82
5.	DISCUSSION AUTOUR DE LA VALIDATION DE MÉTHODE .....	83
5.1.	LES ERREURS DE MANIPULATION .....	83
5.1.1	Les erreurs théoriques .....	83
5.1.2	Les erreurs pratiques .....	84
5.2.	LE CHOIX DU GUIDE DE VALIDATION.....	84
5.3.	LA REVALIDATION .....	87
<b>CONCLUSION .....</b>		<b>89</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>91</b>
<b>LISTE DES ANNEXES .....</b>		<b>95</b>
<b>SERMENT DE GALIEN .....</b>		<b>121</b>

## Liste des tableaux

---

Tableau 1 - Essais à valider lors du contrôle PF/SF : cas du Ringer Lactate Vetoflex® .....	22
Tableau 2 - Essais à valider lors du contrôle MP : cas du Ringer Lactate Vetoflex® .....	23
Tableau 3 - Essais à valider lors du contrôle ADC : cas du Ringer Lactate Vetoflex® .....	23
Tableau 4 - Matrice de criticité pour la fréquence de requalification des équipements.....	25
Tableau 5 - Tests et critères d'acceptation pour la QO de la balance Mettler Toledo .....	39
Tableau 6 - Trame fiche test QO équipement.....	40
Tableau 7 - Illustration du tarage et de l'effacement de la tare lors de la QO de la balance .....	41
Tableau 8 - QP d'une micropipette Eppendorf : paramètres à vérifier et tolérances .....	42
Tableau 9 - Composition du Ringer Lactate Vetoflex® .....	46
Tableau 10 - Paramètres à valider lors d'un dosage selon l'ICH Q2(R1) .....	51
Tableau 11 - Statut de qualification des équipements.....	61
Tableau 12 - Composition du blanc reconstitué pour l'étude de la spécificité .....	64
Tableau 13 - Composition des solutions mères (Gamme SA) .....	65
Tableau 14 - Préparation des gammes de la SA .....	66
Tableau 15 - Volumes équivalents (Gammes SA).....	66
Tableau 16 - Résultats de l'étude statistique de la linéarité sur la gamme SA seule.....	69
Tableau 17 - Composition de la matrice (Gamme FR) .....	69
Tableau 18 - Composition des solutions mères (Gamme FR) .....	70
Tableau 19 - Préparation des gammes de la FR .....	70
Tableau 20 - Volumes équivalents (Gamme FR).....	71
Tableau 21 - Résultats de l'étude statistique de la linéarité sur la gamme FR .....	71
Tableau 22 - Recouvrements (Exactitude) .....	74
Tableau 23 - Résultats de l'étude statistique de l'exactitude sur la gamme FR.....	76
Tableau 24 - Composition de la matrice (Fidélité) .....	76
Tableau 25 - Composition des solutions mères (Fidélité).....	77
Tableau 26 - Préparation du point 100% des 3 séries (Fidélité).....	77
Tableau 27 - Volumes équivalents (Fidélité).....	79
Tableau 28 - Recouvrements (Fidélité) .....	79
Tableau 29 - Résultats de l'étude statistique de la fidélité sur la gamme FR.....	80
Tableau 30 - Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi (selon STP PHARMA PRATIQUES - volume 13 - N°3 - mai/juin 2003).....	86

## Liste des figures

---

<i>Figure 1 - Exemple de compilation exhaustive des données relatives aux équipements de CQ</i> .....	17
<i>Figure 2 - Exemple de compilation exhaustive des données relatives aux méthodes</i> .....	18
<i>Figure 3 - Les étapes de qualification d'un équipement</i> .....	36
<i>Figure 4 - Formation du précipité blanc de chlorure d'argent</i> .....	47
<i>Figure 5 - Titrage potentiométrique à point d'équivalence - Courbe <math>E = f(\text{Vol})</math> [31]</i> .....	48
<i>Figure 6 - Les étapes d'une validation de méthode analytique</i> .....	49
<i>Figure 7 - Présentation des deux composantes de l'exactitude : justesse et fidélité [36]</i> .....	55
<i>Figure 8 - Composantes croissantes de variabilité lors de l'étude de la fidélité [37]</i> .....	57
<i>Figure 9 - Représentation synthétique du déroulement des essais systématiques</i> .....	63
<i>Figure 10 - Représentation synthétique du déroulement de l'essai supplémentaire</i> .....	63
<i>Figure 11 - Graphique de comparaison des gammes SA seule VS FR</i> .....	73
<i>Figure 12 - Schéma du protocole pour l'étude de la fidélité</i> .....	78
<i>Figure 13 - Représentation graphique de l'incertitude de mesure type-composée</i> .....	82
<i>Figure 14 - Exemple d'incertitude de la verrerie de laboratoire [44]</i> .....	84
<i>Figure 15 - Cycle de vie d'une méthode d'analyse</i> .....	87

# Introduction

---

Un médicament a pour rôle de prévenir ou guérir une maladie humaine ou animale, mais sa mise sur le marché obéit à une réglementation stricte [1]. En effet, la preuve documentée que le médicament répond à 3 critères est nécessaire : qualité, efficacité, sécurité. Répondre à ces requis est l'objectif principal des pharmaciens de l'industrie pharmaceutique. Pour cela, l'activité de contrôle qualité joue un rôle essentiel. Il s'agit d'une opération qui vise à démontrer qu'un produit est conforme (ou non) à des exigences définies et cela par le biais de techniques de laboratoire (méthodes) mises au point sur des équipements spécifiques. Cependant, tous les aspects d'un médicament doivent être vérifiés, c'est-à-dire tous les éléments qui le composent.

Au cours du contrôle effectué sur les matières premières, articles de conditionnement, semi-finis et produits finis, les paramètres relatifs aux équipements et aux méthodes peuvent varier dans le temps ce qui peut impacter la conformité de ces éléments et par conséquent la libération du produit fini sur le marché. Ainsi, dans le but de maîtriser cette variabilité et d'assurer la qualité des résultats, il est indispensable de qualifier les équipements et de valider les méthodes de contrôle.

D'autre part, bien que le contrôle qualité représente la dernière étape indispensable à la libération des produits sur le marché, la validation concerne aussi d'autres activités comme par exemple les procédés de fabrication ou le nettoyage. Dans tous les cas, il faut garantir la qualité, l'efficacité et la sécurité des produits à toutes les étapes du cycle de vie du médicament.

L'objectif est de présenter les différents moyens possibles de répondre à l'exigence suivante : **satisfaire aux spécifications par le biais du contrôle et de l'assurance qualité.**

C'est pourquoi, une première partie exposera le rôle de la qualité dans l'industrie pharmaceutique avec notamment la mise en place d'un plan directeur de validation (PDV). Son élaboration est importante car un tel document permet d'établir un état des lieux et une planification de toutes les activités de qualification et validation. Ensuite, ces deux activités seront détaillées, en commençant par la qualification des équipements. En effet, il faut prouver que les équipements sont qualifiés pour assurer une fiabilité et une reproductibilité des mesures lors d'un contrôle. Enfin une fois ce prérequis assuré, il devient alors possible de valider les méthodes utilisées comme techniques d'analyse. Le concept explicité en première

partie sera appliqué dans le cadre du dosage des chlorures contenus dans le médicament vétérinaire Ringer Lactate Vetoflex<sup>®</sup>. Ainsi, la seconde partie à visée expérimentale illustrera le déroulement complet de la validation de la méthode de quantification.

# Partie 1 : État de l'art

## CHAPITRE 1 : MISE EN PLACE D'UN PLAN DIRECTEUR DE VALIDATION

La validation est définie comme la preuve documentée que le procédé (de fabrication, de contrôle...) mis en place permet d'obtenir un produit conforme à des spécifications préalablement établies (dans un dossier d'enregistrement pour un médicament) et ce de manière efficace et reproductible, selon des conditions opératoires précises. Les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), référentiel opposable et indispensable pour les industriels du médicament, stipulent clairement l'**obligation de validation** : « le fabricant doit contrôler les aspects critiques des opérations qu'il met en œuvre au moyen de qualification et de validation tout au long du cycle de vie du produit et des procédés ». Par conséquent, toutes les activités relatives à la qualification et la validation concernant tout type d'installations, d'équipements, de méthodes, d'utilités... doivent être planifiées. C'est pourquoi il existe un document, le **plan directeur de validation** (le terme validation englobant aussi la partie qualification), permettant de définir et de documenter l'ensemble des éléments primordiaux à l'élaboration d'un programme de qualification et de validation.

### 1. DÉFINITION ET INTÉRÊT

Il s'agit d'un guide expliquant la **démarche générale de validation d'une entreprise**, destiné aux responsables et acteurs des opérations de qualification et validation. En effet, ce document offre un aperçu de l'ensemble de ces opérations en définissant la structure organisationnelle, le contenu et surtout, il permet d'établir une planification de ces deux activités. Le PDV peut être considéré comme un référentiel qualité d'autant plus qu'il doit être approuvé par la direction [2].

L'élaboration d'un tel document se justifie par de **nombreux avantages**. Premièrement, il aide au respect des coûts et délais grâce à sa représentation d'ensemble de toutes les validations à réaliser. Ensuite, il énonce clairement les responsabilités de chacun permettant aux différentes personnes impliquées de connaître leurs missions. Enfin, c'est un document utile lors d'audits et inspections car il est reconnu pour fournir une vision claire de la stratégie de validation et de son organisation mises en place par une entreprise [3].

## 2. CHAMPS D'APPLICATION

Le programme de validation défini dans ce chapitre concerne le **processus de contrôle qualité** (CQ). Ce processus permet le contrôle et la libération des matières premières, articles de conditionnement (en particulier primaires, c'est-à-dire en contact direct avec le produit), semi-finis (SF) et produits finis (PF) fabriqués au sein de l'industrie pharmaceutique. Il comporte 2 entités :

- Les équipements du laboratoire de CQ
- Les méthodes de contrôle analytique et microbiologique

De plus, il doit comprendre tous les types de validation ainsi que les revalidations. En effet, il existe trois types de validation [4] :

- La validation **prospective** représente l'option la plus optimale car très sécurisante et est ainsi privilégiée. Il s'agit d'une validation avant la mise sur le marché d'un médicament et la preuve de cette validation est jointe dans le dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM). Cela sous-entend que les lots réalisés pour cette validation ne sont pas destinés à la vente.
- La validation **concomitante ou simultanée** est conduite lors de la production des premiers lots sur le marché, c'est-à-dire que la libération des médicaments n'est possible qu'une fois le processus validé. L'avantage de cette validation réside dans le fait qu'aucun lot produit n'est jeté, cela évite le gaspillage et ainsi la perte de temps et d'argent. Cependant, cette validation demeure applicable dans des conditions exceptionnelles, en particulier pour des produits dont la balance bénéfice/risque est très favorable.
- La validation **rétrospective** s'effectue lorsque le produit commercialisé est déjà sur le marché et s'appuie sur l'historique des données enregistrées. Cette troisième validation « n'est plus considérée comme une approche acceptable » aujourd'hui.

### 3. OBJECTIF

Le premier objectif du PDV est de donner l'assurance que le processus de contrôle qualité est maîtrisé. Pour cela, il faut prouver la validité des méthodes analytiques et microbiologiques en démontrant qu'elles sont aptes à l'usage prévu. Il faut également certifier que l'exploitation des équipements de contrôle garantit une mesure de qualité, fiable et reproductible. Le second objectif est, comme mentionné précédemment, d'élaborer une planification de l'ensemble des activités de qualification et validation mis en œuvre au laboratoire de contrôle.

Ainsi, schématiquement, un programme dédié aux activités d'un laboratoire de CQ doit établir :

- La liste des équipements et leur statut de qualification
- La liste des méthodes de contrôle analytique et microbiologique et leur statut de validation le cas échéant pour les :
  - Semi-finis et produits finis
  - Matières premières
  - Articles de conditionnement

### 4. CONTENU DU PLAN DIRECTEUR DE VALIDATION

L'élaboration du PDV est une tâche qui demeure assez libre pour une entreprise, puisque les BPF mentionnent seulement les éléments clés devant figurer permettant ainsi d'avoir un fil conducteur à suivre. En effet, les paragraphes 1 et 2 de la ligne directrice 15 traitent de la documentation à mettre en place lors du processus de validation (PDV, protocoles et rapports de qualification et validation).

Ainsi, doivent figurer à minima dans un PDV :

- La politique de qualification et de validation
- La structure organisationnelle afin de définir entre autre les rôles et responsabilités relatifs aux activités de qualification et validation
- Le récapitulatif des éléments concernés (*dans le cadre de cette thèse, les équipements du laboratoire de CQ et les méthodes de contrôle*) et leur statut de qualification ou de validation

- La maîtrise des changements
- La gestion des déviations
- Les recommandations concernant la détermination des critères d'acceptation
- Les références aux documents existants
- La stratégie de qualification, de validation et de re-qualification/validation

À présent, chacun de ces points va être développé afin d'illustrer la démarche de construction et de rédaction d'un PDV.

#### 4.1. *POLITIQUE ET STRUCTURE ORGANISATIONNELLE DE QUALIFICATION ET VALIDATION*

Généralement, chaque entreprise a une procédure dans son système documentaire de la qualité explicitant le fonctionnement et la démarche de l'entreprise vis-à-vis des activités de qualification et de validation. De même, il est indispensable de trouver dans ces documents un descriptif clair de la répartition des tâches, c'est-à-dire de définir qui a la responsabilité par exemple de rédiger les protocoles et rapports, de réaliser les essais, d'approuver la décision finale...

D'autre part, il est possible d'envisager qu'une telle responsabilité revient au responsable de service (par exemple au responsable du laboratoire de CQ), néanmoins l'assurance qualité a généralement un droit de regard sur chacune de ces activités en tant qu'approbateur. De plus, bien que le responsable de service soit en charge de gérer tout le système de validation, la direction doit s'assurer que le système dispose de toutes les ressources nécessaires pour couvrir les besoins [5].

#### 4.2. *RÉCAPITULATIF DES ÉLÉMENTS CONCERNÉS PAR LE PDV*

##### **4.2.1. Intérêt**

Il s'agit de compiler les données des activités de validation en précisant un certain nombre de critères : le statut actuel de l'équipement ou de la méthode, le plan et la justification des revalidations, la documentation associée...

##### **4.2.2. Exemple d'un cas pratique**

Disposer d'un PDV regroupant l'ensemble des informations est un outil de travail précieux, ainsi il peut être judicieux de faire un document exhaustif comprenant par exemple les éléments suivants :

- Les équipements

À titre d'exemple, un tableau a été construit pour recenser toute donnée concernant les équipements du laboratoire de contrôle. La figure 1 schématise les informations qui ont été relevées dans le but de regrouper dans un document unique tout ce qui a un lien avec les équipements.

Dénomination de l'équipement
Référence
Localisation
État : actif / back up / rebut
Date de mise en service
Date de la qualification initiale
Nature de l'opération (exemple : qualification de performance, maintenance...)
Périodicité de l'opération
Date prévisionnelle de réalisation
Date de réalisation
Références de la documentation associée
Non conformité, déviation...
Statut de qualification de l'équipement

*Figure 1 - Exemple de compilation exhaustive des données relatives aux équipements de CQ*

- Les méthodes de contrôle

De la même façon, un tableau similaire a été mis en place pour les méthodes de contrôle réalisées sur les semi-finis et produits finis dont le contenu est présenté en figure 2. Cela concerne notamment 3 catégories de contrôle : les méthodes analytiques, les méthodes de pharmacotechnie et les méthodes microbiologiques. En revanche, le même tableau n'a pas été élaboré pour le contrôle des matières premières puisque toutes celles entrant dans le champ d'application du PDV ont une monographie établie dans la Pharmacopée Européenne

(Ph. Eur.). Il en est de même pour les articles de conditionnement primaire (poches en PVC et embouts pour produits stériles) du fait du petit nombre d'essais réalisés dessus comparé à la multitude de contrôles à faire sur les produits finis.

Dénomination du produit
Famille de contrôle (exemple : physico-chimique, en cours de fabrication...)
Type de contrôle (exemple : pH, dosage, volume extractible...)
Technique utilisée
Appareillage utilisé
Critère d'acceptation
Référence Pharmacopée Européenne
Essais d'applicabilité / validation : oui ou non
Date de la validation
Référence de la documentation associée
Statut de validation de la méthode

*Figure 2 - Exemple de compilation exhaustive des données relatives aux méthodes*

#### 4.3. LA MAITRISE DES CHANGEMENTS ET LA GESTION DES DÉVIATIONS

L'entreprise s'engage à contrôler chacun des changements, qu'ils soient mineurs ou majeurs, impactant en particulier les équipements et les méthodes de contrôle du CQ. Mais cela est également valable pour l'ensemble des installations, produits, matériaux, procédés. De plus, chaque déviation doit faire l'objet d'un signalement, d'une investigation, d'une évaluation et éventuellement d'une mise en place d'actions et ce avant la libération des médicaments sur le marché pour assurer la sécurité des lots.

#### 4.4. *LES RECOMMANDATIONS CONCERNANT LA DÉTERMINATION DES CRITÈRES D'ACCEPTATION*

Afin d'évaluer la conformité d'une qualification ou d'une validation, chaque essai réalisé se réfère à un critère d'acceptation. Seul le respect de cette spécification permet d'accepter la validité du test effectué. Parfois, il est possible que plusieurs tests soient nécessaires pour répondre à seulement un critère d'acceptation, et c'est seulement s'ils sont tous conformes que l'essai est validé. Ainsi, il est essentiel de définir et déterminer ces critères. Pour cela, il existe différentes façons :

- Un référentiel opposable donne ce critère à respecter de façon obligatoire
- Un guide propose un critère et cela reflète généralement la pratique courante
- Un client impose son critère d'acceptation, c'est par exemple vrai dans le cas du dosage d'un produit réalisé par un sous-traitant qui rend un résultat conforme ou non selon les spécifications demandées et fournies par le client
- La documentation des fournisseurs procure très souvent des recommandations
- Le critère d'acceptation peut être fixé en interne selon l'expérience acquise au fil des années

#### 4.5. *LES RÉFÉRENCES AUX DOCUMENTS EXISTANTS*

Le champ d'un PDV est large puisqu'il vise aussi bien les installations/équipements que les méthodes et les éléments devant y figurer sont nombreux (relevé des éléments précédemment cités, politique de validation, gestion des changements et des déviations...). Il est donc normal de faire référence aux documents relatifs à la problématique car la majorité de ces points font l'objet de procédures dans une entreprise. Ainsi dans un PDV, les éléments déjà mentionnés dans le système documentaire ne doivent pas être réécrits ; les références des documents en question doivent seulement être indiquées.

D'autre part, il est judicieux de citer également les normes et référentiels appliqués pour élaborer le PDV et la planification qui en découle. Par exemple la Ph. Eur. joue un rôle essentiel dans la stratégie de validation en servant de référentiel à de nombreux essais (*voir paragraphe 5*).

#### 4.6. LA STRATÉGIE DE QUALIFICATION, DE VALIDATION ET DE REQUALIFICATION/REVALIDATION

Enfin, l'élément clé d'un PDV est la définition de la stratégie utilisée pour qualifier, valider, requalifier et revalider. L'objectif est de justifier toutes ces activités, en s'appuyant notamment sur une analyse de risques ou sur des documents de référence comme cela va être illustré dans la partie suivante.

### 5. DÉROULEMENT DU PROCESSUS DE QUALIFICATION ET DE VALIDATION

#### 5.1. ORGANISATION DOCUMENTAIRE

La documentation relative à la qualification et la validation (en particulier les protocoles et les rapports de qualification et de validation) constitue une exigence réglementaire et spécifie comment l'activité doit être conduite [6].

Les protocoles comprennent à minima [7] :

- La méthodologie des contrôles et essais à réaliser
- Les ressources associées (équipements, matériaux...)
- Les étapes critiques à contrôler
- Les critères d'acceptation

De même, les rapports de qualification et de validation comprennent à minima :

- Les résultats des essais réalisés
- L'évaluation des résultats, c'est-à-dire la confrontation des résultats aux critères d'acceptation
- Les déviations le cas échéant
- La conclusion afin de statuer sur l'état qualifié de l'équipement ou l'état validé d'une méthode

La documentation, une fois revue et approuvée, est archivée.

## 5.2. PROCESSUS DE QUALIFICATION

Les plans de qualification ont pour but la mise en œuvre systématique d'une série de contrôles et d'essais, dont les résultats sont enregistrés dans les rapports de qualification en vue d'assurer la conformité de chaque équipement du processus avec les BPF en vigueur :

- Les caractéristiques techniques des équipements
- Le montage et le raccordement de chaque partie de l'installation, le cas échéant
- La suffisance et la pertinence des documents enregistrés

Chaque équipement étant différent, les spécifications particulières sont précisées dans les protocoles de qualification.

## 5.3. PROCESSUS DE VALIDATION

### 5.3.1. Généralités

Plusieurs cas de figure se présentent et pour illustrer cela, les essais réalisés sur le Ringer Lactate Vetoflex® sont mentionnés. C'est-à-dire que les exemples de tests présentés ci-dessous, concernant le produit semi-fini et fini, les matières premières qui le composent et les articles de conditionnement primaire utilisés sont ceux effectués sur ce médicament vétérinaire stérile.

- Une méthode non décrite à la Ph. Eur. : l'entreprise est responsable et doit garantir la validité de cette méthode en procédant à une validation complète.
- Une méthode décrite à la Ph. Eur. [8] :
  - Validation des méthodes de la Ph. Eur. : il faut **valider** en interne une méthode dès lors que cela est précisé dans la monographie ou le chapitre général d'intérêt sinon lorsque ce n'est pas le cas, l'analyste doit seulement suivre les recommandations données.
  - Mise en œuvre des méthodes de la Ph. Eur. : il convient dans chaque cas, même si une méthode approuvée et décrite par la Ph. Eur. est utilisée, de s'interroger sur la nécessité de démontrer l'applicabilité de la méthode dans les conditions effectives de sa mise en œuvre. On parle d'**évaluation**.
- Une méthode non décrite à la Ph. Eur. et développée par un client : dans ce cas un protocole de transfert est généralement réalisé entre le laboratoire du client et le laboratoire de l'entreprise. *Ce cas ne sera pas développé ici.*

### 5.3.2. Justification de la stratégie de validation

À présent, il convient de déterminer au cas par cas la nécessité de valider ou seulement d'évaluer les méthodes pour les semi-finis, les produits finis, les matières premières et les articles de conditionnement primaire.

- Produits finis

Si les produits finis ou semi-finis ne figurent pas dans la Ph. Eur., chaque dosage doit être validé, de même que les méthodes microbiologiques puisque ce référentiel requiert un essai d'applicabilité de la méthode. À l'inverse, les tests physico-chimiques et de pharmacotechnie, décrits à la Ph. Eur., ne sont pas à valider. Le tableau 1 présente les essais à valider ou simplement à évaluer.

*Tableau 1 - Essais à valider lors du contrôle PF/SF : cas du Ringer Lactate Vetoflex®*

	Type de méthodes	Type d'essais	Validation ou évaluation nécessaire
<b>Produits finis</b> ou <b>Semi-finis</b>	Méthodes analytiques	Dosage	<b>Validation</b>
		Identification (Ph. Eur. 2.3.1)	Evaluation
		Physico-chimique : - Caractère (Ph. Eur. 2.2.1 et 2.2.2) - pH (Ph. Eur. 2.2.3) - Osmolalité (Ph. Eur. 2.2.35)	Evaluation
	Méthodes de pharmacotechnie	Volume extractible (Ph. Eur. 2.9.17) Contamination particulaire non visible (Ph. Eur. 2.9.19)	Evaluation
	Méthodes microbiologiques	Contrôle de la contamination microbienne (Ph. Eur. 2.6.12)	<b>Validation</b>
		Essai de stérilité (Ph. Eur. 2.6.1)	<b>Validation</b>
		Endotoxines bactériennes (Ph. Eur. 2.6.14)	<b>Validation</b>

- Matières premières

L'ensemble des matières premières utilisées pour la fabrication du médicament vétérinaire a une monographie établie dans la Ph. Eur. Ainsi tous les contrôles réalisés sur ces matières doivent suivre point par point la démarche dictée par cette dernière (référentiel opposable). Pour cette raison, le laboratoire est exonéré de toute validation des méthodes analytiques tant qu'il suit les monographies de la Ph. Eur. en vigueur. En revanche, le recours à des méthodes microbiologiques nécessite une validation. Ces différents points sont récapitulés dans le tableau 2.

Tableau 2 - Essais à valider lors du contrôle MP : cas du Ringer Lactate Vetoflex®

	Classification de la méthode	Type d'essais	Validation ou évaluation nécessaire
Matières premières	Méthodes analytiques	Monographie de la Ph. Eur. - Caractère - Identification - Essai - Dosage - Impuretés	Evaluation
	Méthodes microbiologiques	Contrôle de la contamination microbienne	<b>Validation</b>
		Essai des endotoxines bactériennes	<b>Validation</b>

Parfois, il est possible d'utiliser une méthode alternative, seulement si l'autorité compétente l'autorise, et cela nécessite obligatoirement une validation. En effet, il faut démontrer que la nouvelle méthode est équivalente à la méthode officielle fournie par la Ph. Eur. ou bien plus appropriée. Un des facteurs de motivation aux méthodes alternatives est notamment l'évolution technique. Par exemple, depuis quelques années, l'identification des matières premières peut être allégée par l'emploi de la spectroscopie Raman. Face aux évolutions techniques, les monographies sont périodiquement révisées et en attendant que les révisions soient faites, une entreprise peut décider de mettre en place une méthode alternative [9-11].

- Articles de conditionnement (ADC) primaire

Comme pour une matière première décrite à la Ph. Eur., seul le contrôle de la contamination microbienne est à valider car les essais analytiques appliqués aux poches nécessitent une mise en œuvre directe des méthodes dictées par la Ph. Eur. au paragraphe 3.2.2.1. La stratégie à appliquer aux ADC est présentée dans le tableau 3.

Tableau 3 - Essais à valider lors du contrôle ADC : cas du Ringer Lactate Vetoflex®

	Classification de la méthode	Type d'essais	Validation ou évaluation nécessaire
Articles de conditionnement	Méthode analytique	Essais Ph. Eur. 3.2.2.1	Evaluation
	Méthode microbiologique	Contrôle de la contamination microbienne	Validation

Enfin, connaître le processus de qualification et de validation ainsi que les éléments entrant dans le champ d'application du PDV rend possible l'élaboration d'un planning de revalidation basé sur la gestion des risques.

## 6. PLANNING DE REVALIDATION SELON LA GESTION DES RISQUES

Les exigences émanant des BPF concernant le processus de CQ avec la qualification des équipements et la validation des méthodes de contrôle sont valables tout au long du cycle de vie du processus. Ainsi, il faut garantir le maintien de ces activités sous contrôle et cela est possible par une vérification en continu. Il s'agit de la **validation périodique** (requalification/revalidation) ; elle permet de prouver le maintien du statut de validation et l'absence de dérive.

Tous les éléments ayant un impact direct sur la conformité de la fabrication sont considérés comme critiques et sont donc soumis à une requalification/revalidation. C'est le cas des équipements et des méthodes de contrôle qui servent à prouver la conformité du produit fini avant sa libération sur le marché. En effet, le contrôle et l'assurance qualité sont indispensables car la libération de médicaments non conformes aux patients ou animaux est susceptible d'engendrer des risques pour la santé.

### 6.1. REQUALIFICATION DES ÉQUIPEMENTS

La fréquence de requalification se base sur une analyse de risque et s'intéresse en particulier à deux sources d'informations :

- Les recommandations du fournisseur
- L'expérience acquise sur l'équipement au fil des années d'exploitation

Un risque est défini comme la combinaison de la probabilité d'occurrence d'un dommage et de sa gravité [12]. Le but est de définir le risque selon une cotation de différents critères afin d'aboutir à un résultat final : la fréquence de requalification des équipements. Pour cela, une matrice de criticité est construite, comme le montre le tableau 4.

**Tableau 4 - Matrice de criticité pour la fréquence de requalification des équipements**

Impact direct sur le résultat de la mesure	Sécurité technicien / produit		Fréquence d'utilisation (usure)			Calibration et vérification à chaque utilisation		Suitability tests		Fragilité des équipements		
	1 (non)	5 (oui)	1 -	3 +	5 ++	1 (oui)	5 (non)	1 (oui)	5 (non)	1 -	3 +	5 ++
1	<b>Risque global : Impact direct sur le résultat de la mesure x Somme des 5 paramètres</b>											
3												
5												
Fréquence	<b>5-45 qualification tous les 2 ans</b>					<b>46-85 qualification annuelle</b>			<b>86-125 qualification 2 fois par an</b>			

Au sein d'un laboratoire de CQ se trouve une multitude d'équipements et chacun a une fonction différente. Il existe par exemple des balances de pesées, des thermomètres, des titrateurs, des étuves, des incubateurs... mais un des critères phares qui les distingue est le suivant : **est-ce que l'équipement a un impact direct sur le résultat de la mesure ?** En effet, un titrateur a une influence directe sur le résultat d'une mesure puisque c'est grâce à lui qu'on peut déterminer une concentration alors qu'un thermomètre sert uniquement à contrôler un paramètre notamment à déterminer par exemple si une solution est à la température optimale avant sa mesure. Ainsi, un appareil est d'autant plus critique que son impact sur un résultat est direct. Pour ce critère, la cotation suivante a été attribuée :

- 1 : l'équipement n'impacte pas la mesure (minuteur)
- 3 : l'équipement n'impacte pas directement la mesure (étuve)
- 5 : l'équipement impacte directement la mesure (balance de pesée)

Ensuite, 5 critères ont été évalués individuellement :

- **Sécurité technicien/produit** : est-ce que l'équipement est utile à la sécurité du technicien ou du produit ? En effet, un équipement qui peut causer des dommages aux manipulateurs ou aux produits est plus critique que ceux qui n'ont pas d'impact, ainsi il faut leur porter davantage d'attention et donc potentiellement les requalifier plus fréquemment. Si l'appareil est important pour la sécurité il est coté 5, sinon il est coté 1.

- **Fréquence d'utilisation** : plus un équipement est sollicité plus il s'use et est susceptible de rendre des résultats erronés. Selon l'utilisation quotidienne, une cotation semblable à celle mise en place pour l'évaluation de l'impact, a été élaborée :
  - 1 : l'équipement est peu utilisé (environ une fois par mois, ou moins)
  - 3 : l'équipement est assez utilisé (environ au moins une fois toutes les deux semaines)
  - 5 : l'équipement est très utilisé (environ plusieurs fois par semaine)
  
- **Calibration ou vérification avant chaque utilisation** : plusieurs équipements doivent effectuer des contrôles avant leur utilisation afin de s'assurer de leur « bon état ». C'est le cas par exemple des balances de pesées, où chaque matin avant la première utilisation, il faut effectuer une calibration en vérifiant les masses de poids étalons. Le fait de vérifier certains paramètres d'un appareil avant son emploi est une chose favorable puisque cela permet de détecter plus facilement un problème, une dérive et ce, avant même d'effectuer la mesure. De cette façon, l'équipement est mieux maîtrisé puisqu'il a un suivi renforcé, ce qui permet d'obtenir un faible score. En effet, un équipement qui requiert ce système est noté 1 car le risque de rendre ensuite un résultat non conforme est plus faible si les paramètres vérifiés au préalable sont conformes. En revanche, les équipements ne réalisant pas de calibration/vérification avant leur utilisation se voient attribuer un score de 5.
  
- **Tests d'aptitude du système (*suitability tests*)** : Il s'agit de tests réalisés pour vérifier que le système utilisé fonctionne conformément aux critères définis dans les procédures et pour garantir les performances du système au moment du test [13]. De ce fait, la vérification des performances du système est favorable pour attester de la qualité des résultats de la mesure. C'est pourquoi, si un équipement dispose de cette composante alors le risque est faible, donc coté à 1, c'est notamment le cas d'équipements complexes comme les chromatographies liquides. À l'inverse, si l'appareil de contrôle ne réalise pas de tests d'aptitude alors la probabilité de fournir un résultat non conforme est plus élevée donc le score attribué est de 5.
  
- **La « fragilité » de l'équipement** : ce 5<sup>e</sup> et dernier critère est certes plus subjectif mais il est défini grâce à l'expérience acquise au fur et à mesure de l'utilisation d'un équipement et éventuellement selon la documentation (documentation fournisseur,

guides...). Pour illustrer, un minuteur est moins fragile qu'une balance, qui elle est moins fragile qu'une micropipette. Ainsi une cotation similaire est établie : 1 ; 3 ; 5 sachant que plus l'équipement est fragile plus le score est élevé.

Une fois la cotation réalisée sur tous les équipements et pour tous les paramètres, le risque global est calculé de la manière suivante : additionner les scores obtenus sur les 5 critères précédemment définis et multiplier le total par le score obtenu pour l'impact direct de la mesure, puisque ce dernier paramètre est jugé le plus critique. En effet, le fait d'appliquer une multiplication permet d'obtenir des résultats plus élevés et plus espacés ce qui est judicieux pour définir en suivant les groupes de requalification. De même, utiliser une cotation espacée, c'est-à-dire, 1 ; 3 ; 5 au lieu de 1 ; 2 ; 3, par exemple, discrimine davantage les différences entre équipements et va dans le même sens que la multiplication, à savoir créer plus facilement des groupes [14]. Ainsi, selon les résultats du cas pratique explicité, 3 groupes de requalification ont été déterminés :

- Pour un score de 5 à 45 : l'analyse de risque recommande une requalification tous les 2 ans
- Pour un score de 46 à 85 : l'analyse de risque recommande une requalification annuelle
- Pour un score de 86 à 125 : l'analyse de risque recommande une requalification biannuelle

Le score minimal (5) est calculé en attribuant à chaque paramètre la cotation minimale possible tandis que le score maximal est défini en considérant un équipement le plus critique possible donc en attribuant à chaque paramètre la cotation maximale (125). Ensuite, l'intervalle [5 ; 125] est divisé en 3 et à chacun des groupes formés correspond une fréquence de requalification, et bien entendu, plus le score est faible plus le besoin en requalification peut être espacé dans le temps.

## 6.2. REVALIDATION DES MÉTHODES

Dans le cadre des méthodes de contrôle, bien qu'il faille maintenir en continu leur état validé, il est plus difficile de définir une fréquence de revalidation selon une cotation des risques potentiels. Ici, il s'agit plutôt de définir les **situations ayant un impact sur la méthode** et pouvant justifier une revalidation.

Selon l'ICH Q2(R1), la revalidation des méthodes analytiques est nécessaire dans les circonstances suivantes :

- Les changements dans la synthèse de la substance médicamenteuse
- Les changements dans la composition du produit fini
- Les changements dans la procédure analytique

Le degré de revalidation requis dépend de la nature des changements. Plus les changements sont importants, plus la revalidation est complète. À l'inverse, lorsque les modifications sont minimales, il est possible d'envisager une revalidation allégée. En revanche, certains changements supplémentaires peuvent engendrer un besoin de revalidation comme le changement d'équipement, le changement d'environnement...

Ainsi, une revalidation analytique est envisagée selon deux cas :

- Soit pour les raisons citées au-dessus
- Soit si la revue annuelle du système, des déviations et des non conformités, montre un intérêt à la revalidation (exemple : constat de plusieurs résultats hors spécifications dans l'année, dérive des résultats...)

## 7. DISCUSSION AUTOUR DE LA MISE EN PLACE D'UN PDV

De nos jours, un PDV est une exigence réglementaire. Cependant, l'obligation n'est pas d'avoir précisément un PDV mais plus exactement de posséder un tel type de document, c'est-à-dire un document qualité permettant la planification des activités de qualification et de validation puisqu'il a été démontré les nombreux intérêts de ce dernier. Pourtant, à l'heure actuelle il n'existe pas encore de guide proposant une démarche quant à son élaboration. Peut-être même que toute industrie ne dispose pas d'une documentation recensant l'ensemble des informations évoquées dans cette partie et ce en raison du manque de référentiel à ce sujet. En effet, la démarche proposée dans cette thèse requiert une grande implication de la part des personnes concernées. Par exemple, mettre en place des fichiers exhaustifs retraçant le cycle de vie de l'ensemble des équipements et des méthodes du laboratoire de CQ exige de très nombreuses heures. De même que proposer une analyse de risque pour justifier la stratégie de requalification nécessite un travail d'équipe puisque chacun peut apporter son expertise sur un équipement. Par ailleurs, chaque membre d'une équipe a ses propres responsabilités : par exemple un technicien de laboratoire maîtrise bien l'aspect pratique d'un équipement ou d'une méthode tandis qu'une personne en charge du traitement des résultats non conformes, des déviations, connaît davantage l'environnement et le contexte d'un système. C'est en combinant tous les éléments grâce au travail d'équipe et de l'expérience de chacun qu'il est possible de mettre en place de manière objective une stratégie de qualification et validation.

À présent que l'intérêt du PDV est démontré, l'importance de qualifier les équipements et de valider les méthodes peut être justifiée.

La qualification des équipements est abordée en premier dans le Chapitre 2 qui suit car c'est un prérequis à la validation.

## CHAPITRE 2 : QUALIFICATION DES EQUIPEMENTS

La première partie sur la mise en place du PDV explicite la nécessité de qualifier les équipements en particulier « afin d'assurer la conformité aux normes ou spécifications définies et nécessaires à la qualité des produits fabriqués » [15]. C'est pourquoi, ce deuxième chapitre traite de la qualification des équipements. Dans un premier temps, les généralités de cette activité sont présentées, notamment la définition, les objectifs et les grandes étapes de la qualification d'équipements. Puis en second lieu, il s'agit d'illustrer les propos par des exemples de cas pratiques de qualification d'équipements utilisés au cours la validation des chlorures (*évoquée en partie 2*).

### 1. DÉFINITION ET INTÉRÊTS

Le processus de qualification est un outil clé de l'assurance qualité qui vise à prouver de façon tangible et documentée qu'un équipement est apte à répondre aux exigences spécifiées. Autrement dit, qualifier consiste à démontrer qu'un matériel donne réellement les résultats attendus et pour cela il doit être **correctement installé** et fonctionner conformément à son usage prévu et ce de manière **efficace** et **reproductible** [16]. Cette activité présente plusieurs intérêts, elle permet notamment de maîtriser les coûts, de gagner du temps et de garantir la sécurité du produit fabriqué mais également de l'environnement et de l'utilisateur. En effet, maîtriser ses instruments permet d'éviter les non conformités et tous les désagréments qui s'ensuivent. À titre d'exemple, utiliser un équipement non qualifié et non conforme pourrait engendrer des répercussions négatives d'un point de vue qualité sur des lots de produits fabriqués, entraînant ainsi l'ouverture de déviations qu'il faudrait investiguer. Qui dit non qualité des produits et gestion des non conformités, dit perte de temps et d'argent. Dans l'industrie pharmaceutique, l'enjeu majeur est la conformité du médicament puisque ce dernier est destiné aux humains ou aux animaux. Par conséquent, il est indispensable de maîtriser cet aspect aussi bien pour la sûreté du patient que pour la perte financière que cela engendre, d'où l'intérêt de la qualification des équipements [4].

## 2. CHAMPS D'APPLICATION

Bien que le terme validation englobe l'activité de qualification, « les étapes de qualification à elles seules ne constituent pas une validation de procédé » [17]. Par conséquent, il est important de différencier les deux activités. Tandis que la validation s'applique aux procédés (fabrication, nettoyage, méthodes d'analyse, systèmes informatisés), la qualification concerne de manière générale les instruments, à savoir les équipements de production, les équipements de mesure, les installations, avec pour exemples : balance de pesée, utilités, enceinte thermostatique, titrateur, thermomètre etc... [18]. Finalement, la qualification est considérée comme un **prérequis à la validation**.

Dans le cadre de cette thèse, les instruments visés par le processus de qualification sont ceux présents et utilisés au laboratoire de contrôle qualité.

## 3. OBJECTIFS

L'objectif principal de la qualification est de **garantir la fiabilité des résultats** obtenus, et cette fiabilité doit être maintenue dans le temps à un niveau de performance correct par des vérifications périodiques. L'acte de vérification représente la « confirmation par des preuves objectives », comme le résultat d'un contrôle par exemple, « que les exigences spécifiées ont été satisfaites » [5].

De plus, la qualification permet d'établir les procédures d'utilisation et toutes les activités de suivi dans le temps (entretien, maintenance, réparation...) en vue d'assurer la conformité, aux normes ou spécifications, indispensable à la qualité des médicaments fabriqués. En définitive, qualifier c'est participer à la maîtrise des aspects critiques des opérations mises en œuvre par tout fabricant.

Les étapes de la qualification vont maintenant être décrites de manière chronologique.

## 4. LES ÉTAPES DE LA QUALIFICATION

En premier lieu, plusieurs situations motivent le recours à la qualification. En effet, il faut qualifier un équipement dès sa réception, lors d'un transfert (changement de lieu) ou lorsqu'une modification susceptible d'affecter la qualité d'un produit se manifeste (comme un changement de pièces ou de conditions opératoires).

La phase de qualification se décompose en 4 étapes principales :

#### 4.1. LA QUALIFICATION DE CONCEPTION (QC)

*« Vérification documentée attestant que la conception proposée pour les installations, les systèmes et les équipements convient pour l'objectif visé » (BPF)*

Cette étape permet de formaliser les besoins en équipement d'un client et ce par la rédaction d'un **cahier des charges** notamment. Ce document définit les besoins et explicite les spécifications souhaitées dans le but de sélectionner l'équipement. Ainsi, le cahier des charges constitue le document de départ d'une qualification et sert de point de référence tout au long du cycle de vie de l'appareil. De ce fait, la QC consiste à vérifier la conformité de la conception avec les BPF d'une part et les exigences formulées dans le cahier des charges d'autre part.

#### 4.2. LA QUALIFICATION D'INSTALLATION (QI)

##### 4.2.1 Principe

*« Vérification documentée attestant que les installations, les systèmes et les équipements, tels qu'ils sont installés ou modifiés, sont conformes à la conception approuvée et aux recommandations du fabricant » (BPF)*

Elle nécessite au préalable l'approbation du cahier des charges et de la QC et a pour objectif de vérifier la conformité de l'installation. Pour cela, le protocole de QI vise à apporter la preuve documentée qu'un système est installé conformément aux spécifications définies dans le cahier des charges, de la conception approuvée sans oublier les recommandations du fournisseur. Ce dernier maîtrise les instruments qu'il fabrique et est donc apte à prodiguer des conseils en termes de qualification, nettoyage... Cette seconde étape permet de détecter tout défaut de conception, fabrication et installation et de s'assurer que la documentation opérationnelle nécessaire à l'utilisation et à la maintenance du système est présente.

##### 4.2.2 Déroulement

Il s'agit de vérifier par **inspection visuelle** que le matériel livré est complet et en bon état et de s'assurer que la documentation associée est fournie (bon de livraison, manuel d'utilisation, certificats de conformité/d'étalonnage...). Ensuite, en fonction de leur lieu d'installation, il est judicieux de vérifier l'accessibilité des appareils :

- Aux installations électriques (prises)
- Pour le nettoyage
- De l'écran d'affichage si présent...

En amont, le protocole de QI doit être rédigé : il décrit les essais à effectuer ainsi que les critères d'acceptation associés. Une fois les essais réalisés, le rapport de QI recense les résultats et aide à la décision finale quant au statut qualifié de l'équipement. Seule la conformité de cette étape permet de passer à l'étape suivante : la qualification opérationnelle.

#### 4.3. LA QUALIFICATION OPÉRATIONNELLE (QO)

*« Vérification documentée attestant que les installations, les systèmes et les équipements, tels qu'ils sont installés ou modifiés, fonctionnent comme prévu dans les gammes de fonctionnement escomptées » (BPF)*

##### 4.3.1 Principe

Généralement réalisée dès que la QI est validée, la QO est l'étape qui vise à démontrer que les **différents modules** de l'équipement tels qu'ils sont installés ou modifiés, fonctionnent dans les conditions prévues. Il s'agit de vérifier que l'équipement répond aux spécifications définies précédemment en réalisant des tests dans l'environnement de travail de l'utilisateur en routine. Cette étape est importante pour la détermination des paramètres critiques de l'instrument et la rédaction des procédures opératoires quant à l'utilisation, le nettoyage ou la maintenance de l'équipement.

##### 4.3.2 Déroulement

Dans un premier temps, le périmètre du système à qualifier doit être délimité avant d'organiser la stratégie de qualification. À cette fin, il faut énoncer tous les tests à effectuer ainsi que les critères d'acceptation respectifs tout en décrivant les moyens mis à disposition pour y parvenir. La réalisation des essais a pour objectifs de vérifier que l'équipement et ses modules à qualifier fonctionnent aussi bien dans les gammes d'exploitation prévues mais également dans les limites d'utilisation du système.

Comme pour chaque activité, il est nécessaire au préalable de rédiger un protocole de QO et une fois les essais réalisés et les paramètres critiques vérifiés, un rapport de QO regroupe tous les éléments nécessaires à la prise de décision. En effet, si tout est conforme alors l'instrument est autorisé à être mis en service et ainsi il est possible de passer à la

dernière étape, la qualification des performances ; sinon il faut envisager de refaire des essais et mettre en place des actions correctives en cas de non-conformité.

### 4.3.3 Exemple

Dans le cas d'une balance de pesée, il faut vérifier toutes les fonctionnalités indépendamment les unes des autres, dont voici une liste non exhaustive :

- La balance s'allume-t-elle ? S'éteint-elle ?
- Le tarage fonctionne-t-il ?
- La plage de pesée est-elle exacte ? Cela revient à tester les limites de l'appareil et par exemple démontrer si c'est le cas qu'un message d'erreur s'affiche lorsque la pesée est supérieure à la limite de l'équipement.

Pour montrer que la balance s'allume, le moyen pour y parvenir doit être décrit « Appuyer sur la touche ON/OFF » puis confronter le résultat obtenu au critère d'acceptation « L'écran d'affichage s'allume et indique 0,0 g ». Si l'écran affiche la même chose que la spécification, alors le module testé est conforme. C'est sur ce même principe que sont vérifiés un par un l'ensemble des paramètres.

## 4.4. LA QUALIFICATION DES PERFORMANCES (QP)

*« Vérification documentée attestant que les systèmes et les équipements sont capables de fonctionner efficacement et de manière reproductible d'après la méthode du procédé approuvée et les spécifications du produit » (BPF)*

### 4.4.1 Principe

L'ultime étape de qualification a pour objectif de prouver que le système en activité, piloté par les opérateurs, fonctionne de manière fiable et reproductible. Autrement, il s'agit de s'assurer du bon fonctionnement de **l'équipement dans sa globalité et ce dans des conditions normales d'utilisation** pour attester des performances de ce dernier.

### 4.4.2 Déroulement

Comme pour les étapes précédentes, le déroulement de la qualification suit le même modèle. Pour commencer, le protocole doit expliciter les tests à réaliser, les critères d'acceptation, les ressources associées... Selon les paramètres critiques à vérifier, les essais sont menés afin de prouver la conformité aux spécifications ou au contraire de mettre en avant un problème de performance de l'instrument. L'ensemble des résultats est repris dans le

rapport pour statuer sur l'état de qualification : si tout est conforme alors c'est l'acceptation finale d'utilisation du système.

Le cycle de vie d'un équipement ne s'arrête pas à la fin des quatre étapes de qualification initiale. Au contraire, il faut maintenir la performance des équipements de leur mise en service jusqu'à la mise au rebut ; c'est ce que souligne le paragraphe 5.

## 5. MAINTIEN EN ETAT QUALIFIÉ D'UN ÉQUIPEMENT

La figure 3 présente de manière schématique et résumée les différentes étapes de qualification (*la qualification de conception est hors du cadre de cette thèse*). Elle permet de mettre en avant l'obligation de la **qualification périodique** mentionnée dans la partie précédente relative à la mise en place du PDV. En effet, une fois un équipement mis en service et utilisé en routine, il faut régulièrement le contrôler et renouveler des tests pour s'assurer qu'il fonctionne toujours de manière fiable et reproductible afin d'attester la conformité des résultats antérieurs effectués entre deux qualifications. Ainsi, tout équipement fait l'objet d'un suivi métrologique, de maintenance... et la QP doit être régulièrement effectuée selon une planification établie et justifiée selon la criticité de l'équipement et sa tendance à dériver dans le temps (comme l'analyse de risques présentée au Chapitre 1). De plus, des modifications apportées sur des pièces d'un équipement ou sur son environnement, entre autres, peuvent motiver la nécessité d'une requalification. Le degré de requalification s'évalue au cas par cas bien que si un changement est jugé majeur c'est-à-dire qu'il impacte un paramètre critique alors il est possible d'envisager de renouveler QI, QO et QP afin de prouver que la fiabilité des mesures fournies par l'équipement n'est pas affectée. Dans tous les cas, il faut porter attention à la possibilité de changements dans le temps qu'ils soient mineurs ou non et agir en conséquence [19].

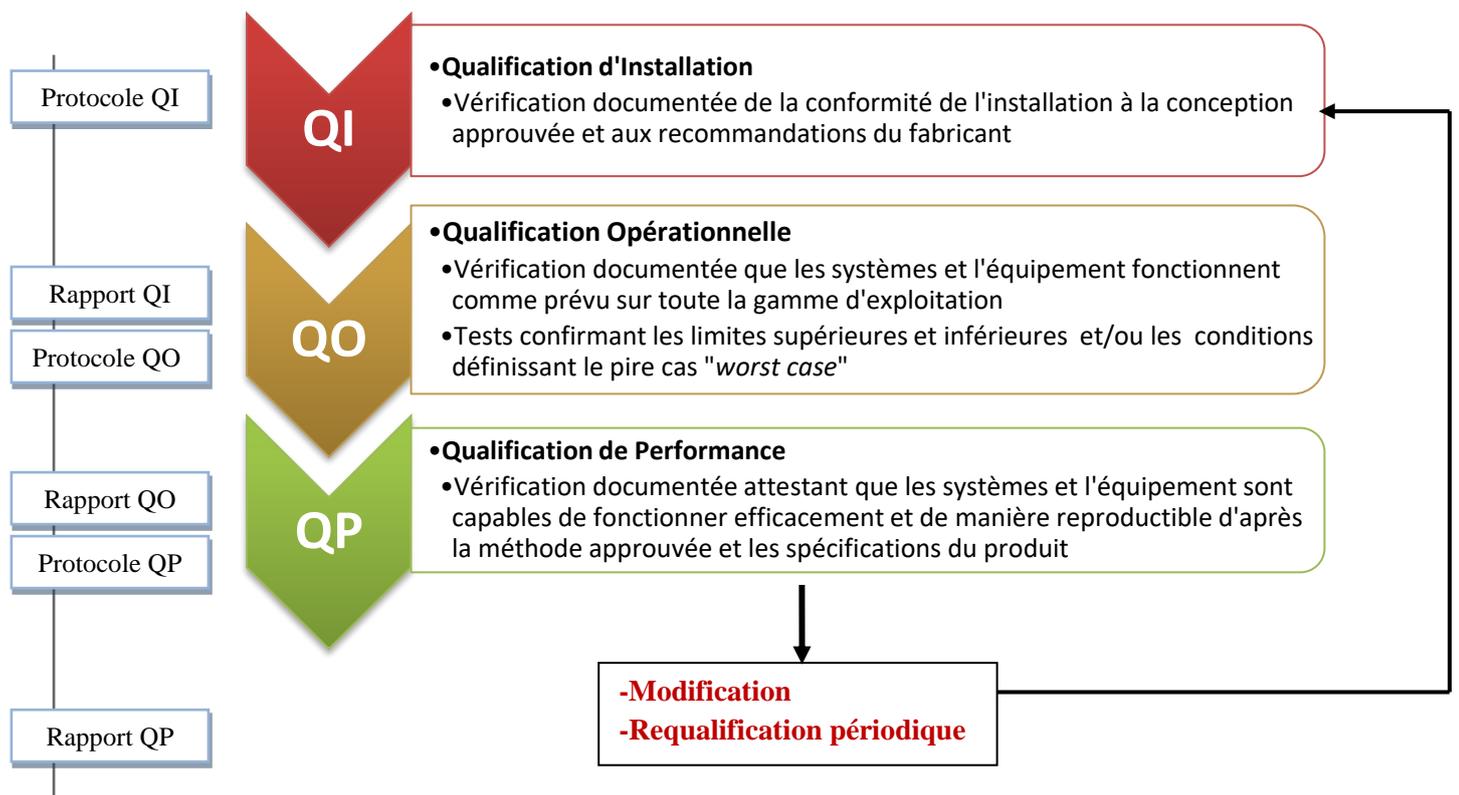


Figure 3 - Les étapes de qualification d'un équipement

## 6. LA DOCUMENTATION

Toute opération menée sur un instrument donne lieu à la rédaction de documents associés permettant de tracer et justifier les « décisions de conformité ou non des instruments » [20]. Généralement, chaque équipement dispose d'une fiche de vie (*Annexe I p96*) synthétisant l'essentiel, comme ses caractéristiques propres (modèle, fournisseur, dimension...) et récapitulant l'ensemble des actions entreprises depuis sa mise en service. D'autre part, il est souvent possible d'établir un constat de vérification qui statue sur l'état de conformité d'un instrument vis-à-vis des exigences requises suite à des essais réalisés et qui le cas échéant aboutit à des certificats d'étalonnage par exemple [21]. Ces documents sont essentiels à la traçabilité documentaire, auxquels s'ajoutent aussi les protocoles et rapports de qualification mais également tout ce qui est documentation interne comme les procédures/instructions/protocoles relatifs à l'utilisation, au nettoyage...de l'appareil.

Pour illustrer de manière concrète la qualification d'équipement, le paragraphe suivant propose une description des étapes de QI, QO et QP de 2 instruments utilisés au cours de la validation du dosage des chlorures présentée en deuxième partie de cette thèse.

## 7. CAS PRATIQUES

### 7.1. LA QUALIFICATION D'INSTALLATION

Contrairement à la plupart des activités, la QI peut suivre une démarche groupée. En effet pour tous les équipements, les mêmes points sont à vérifier.

Prenons l'exemple de la qualification d'installation d'une balance.

#### 7.1.1 Vérification de la documentation

En premier lieu, il convient de s'assurer que toute la **documentation est présente**, en particulier les documents indispensables au bon fonctionnement de l'instrument. Par exemple il faut s'assurer que le service qui détient la balance dispose également de :

- Bon de livraison de l'équipement
- Mode d'emploi de la balance
- Informations liées à la sécurité
- Déclaration de conformité (Union Européenne)
- Notice d'utilisation de l'imprimante si la balance est reliée à un périphérique pour assurer la traçabilité des pesées

En pratique, le critère d'acceptation à respecter est le suivant : tous les documents énoncés sont présents et leur contenu est validé. En effet, il faut s'assurer que toutes les informations concernent bien l'équipement en question, qu'il s'agit de la bonne référence...

#### 7.1.2 Vérification de l'appareil

Ensuite, des vérifications visuelles permettent de s'assurer que **l'équipement livré est complet et conforme**. Pour cela, les différents modules de la balance doivent être présents, correctement installés et en bon état.

Les éléments susceptibles d'être vérifiés dans le cadre d'une QI de balance sont les suivants :

- Présence de la balance sans endommagement
- Présence des pieds ajustables en hauteur
- Présence du plateau de pesée sans endommagement
- Présence de l'organe d'affichage sans endommagement (cadran d'affichage, boutons, niveau à bulle)
- Présence du bloc d'alimentation et bon état visuel

- Vérification des conditions d'emplacement : la balance doit être placée sur un support horizontal, sans vibration et à l'abri de toute exposition directe au soleil ou à un courant d'air [22]. Ces recommandations se retrouvent dans des documents officiels, aidant les industriels dans la qualification des équipements. Notamment la Direction Européenne de la Qualité du Médicament & soins de santé (EDQM) publie des annexes à ce sujet.

### **7.1.3 Vérification dimensionnelle**

Il est d'usage de vérifier les dimensions d'un équipement qui sont souvent référencées dans la fiche de vie de l'équipement. Il faut confronter les résultats obtenus avec les dimensions indiquées par le fournisseur.

### **7.1.4 Vérification des accessibilités de l'appareil**

Tout équipement doit justifier d'un emplacement stratégique lui permettant d'avoir accès aux éléments dont il a besoin ou d'être lui-même accessible. Tout d'abord, chaque module d'un instrument doit être accessible par les opérateurs, en particulier l'écran d'affichage ou le plateau de pesée. Ensuite, il faut également mettre à disposition (proximité physique) les éléments nécessaires au fonctionnement de la balance, comme une prise électrique. Enfin, l'appareil doit être accessible pour son nettoyage et sa maintenance, de la même façon que chaque organe doit également être individuellement accessible.

### **7.1.5 Vérification des conformités**

Pour preuve de la conformité de l'équipement, des inscriptions sont présentes dessus, en principe sous la forme d'une plaque : la plaque constructeur, la plaque attestant du marquage CE le cas échéant.

## ***7.2. LA QUALIFICATION OPÉRATIONNELLE***

Avec de nouveau l'exemple de la balance utilisée pour la validation analytique exposée en partie 2, lors de la QO il faut vérifier que chaque module de l'instrument fonctionne, en définissant en amont les tests à effectuer et leur critère d'acceptation.

### 7.2.1 Détermination des tests et de leurs critères d'acceptation

Il faut définir les tests à réaliser permettant de vérifier le bon fonctionnement des modules de la balance qui serviront en routine et d'associer à chacun son ou ses critères d'acceptation.

Le tableau 5 indique quels tests effectuer et quels critères sont requis pour statuer de la conformité de la balance.

*Tableau 5 - Tests et critères d'acceptation pour la QO de la balance Mettler Toledo*

Tests	Critères d'acceptation
1. Commande MARCHE / ARRÊT	La balance s'allume et s'éteint correctement
2. Mise à niveau de la balance (vérification de la bulle d'air)	Le plateau de pesée est exactement horizontal si la bulle d'air se trouve dans le cercle prescrit 
3. Tarage et effacement de la tare	Le tarage est effectif après sa réalisation et le zéro s'affiche après son effacement
4. Réalisation d'une pesée	Les valeurs de pesée s'affichent et peuvent être lues après un bip sonore ( <i>particularité de cette balance</i> ) indiquant la stabilité du résultat
5. Tester la limite de la plage de pesée en posant sur le plateau un produit de masse > à la limite	L'écran affiche « Error »
6. Fonction rappel de la valeur de poids	La dernière valeur de poids stable enregistrée s'affiche
7. Réglage automatique de la calibration de la balance avec des poids internes à une heure précise toutes les 24h	La calibration automatique de la balance avec des poids internes fonctionne
8. Sélection des informations puis impression de ces données	Les données de pesée sélectionnées peuvent être imprimées et sont conformes

### 7.2.2 Déroulement des essais

Module par module les tests sont réalisés pour vérifier que l'équipement fonctionne.

À chaque étape, une fiche test sous forme de tableau récapitule les essais à faire, le résultat à trouver et permet également de tracer dessus le résultat trouvé afin de statuer sur la conformité du module. Le tableau 6 représente un exemple de trame.

*Tableau 6 - Trame fiche test QO équipement*

Tests	Résultat attendu	Résultat observé	Conformité	Date / Visa	Remarque

### 7.2.3 Illustration du test n°3

Le tableau 7 ci-dessous explicite comment sont testées les fonctionnalités. En effet, il faut procéder étape par étape et respecter les consignes de la colonne « Tests ». De plus, ce tableau vise aussi à montrer comment remplir la fiche test lors de l'exécution des essais facilitant ainsi la détermination du statut de conformité du module. Il est possible de dire qu'un module est conforme seulement si l'ensemble des résultats observés correspond exactement aux résultats attendus. Enfin, il ne faut pas hésiter à remplir la colonne remarque car tout détail peut être utile à la compréhension de l'équipement.

**Tableau 7 - Illustration du tarage et de l'effacement de la tare lors de la QO de la balance**

Tests	Résultat attendu	Résultat observé	Conformité	Date / Visa	Remarque
Poser le récipient à peser vide sur la balance	Le poids du récipient à peser s'affiche	10.25641g s'affiche	Conforme	30/11/2018 TG	Un bip sonore indique l'affichage stable de la mesure
Appuyer sur la touche « →0/T← »	L'affichage du zéro apparaît « 0.00000g »  La tare est effective	Après appui sur « →0/T← » l'affichage du zéro apparaît « 0.00000g »	Conforme	30/11/2018 TG	-
Décharger la balance et appuyer de nouveau sur « →0/T← »	(après une pesée à x g) L'affichage du zéro apparaît « 0.00000g »  La tare est effacée	Après une pesée de 1.03212g et un appui sur « →0/T← », « 0.00000g » s'affiche	Conforme	30/11/2018 TG	Un bip sonore indique l'affichage stable de la mesure

### 7.3. LA QUALIFICATION DES PERFORMANCES

Pour illustrer la QP, le cas d'une micropipette Eppendorf 500-5000µL utilisée dans le cadre de la validation du dosage des chlorures dans le Ringer Lactate Vetoflex® est choisi.

Les pipettes sont considérées comme des équipements et doivent à ce titre être qualifiées. L'annexe 6 « *Qualification of piston pipettes* » de l'EDQM confirme cette obligation et préconise d'ailleurs une fréquence de qualification [23] :

- À réception de la pipette, sauf si le fournisseur a déjà procédé à l'opération
- Une fois par an durant son utilisation
- Après chaque réparation ou réglage

Cette annexe sert également de guide à la qualification et préconise ainsi les paramètres à vérifier et les tolérances associées (Tableau 8). Une méthode gravimétrique est utilisée pour qualifier la micropipette.

*Tableau 8 - QP d'une micropipette Eppendorf : paramètres à vérifier et tolérances*

<b>Paramètres à vérifier</b>	<b>Tolérances</b>
1. Action du piston	Sans à-coups et complète
2. Porte embout	Pas de marque ou de déformation Pas de résidus liquides
3. Fuite	Pas de fuite à l'extrémité
4. Erreur systématique maximale acceptable	$\pm 40\mu\text{L}$
5. Erreur aléatoire maximale acceptable	$\pm 0,3\%$

Les actions 1 à 3 sont visuellement contrôlées aussi bien avant chaque utilisation au quotidien qu'avant la qualification.

Ensuite pour les actions 4 et 5, comme il s'agit d'une pipette à volume variable (500-5000 $\mu\text{L}$ ), il faut procéder comme suit :

▪ **Partie technique**

- Mesurer la température du liquide à prélever (généralement de l'eau) car cela impacte la masse volumique
- Placer un embout de 5000 $\mu\text{L}$  sur la pipette
- Tremper la pipette dans l'eau et prélever le volume à tester
- Retirer doucement l'embout en dehors de l'eau en essuyant bien la pointe contre la paroi du récipient contenant le liquide
- Sur une balance de pesée, poser un récipient et effectuer la tare
- Verser lentement l'eau contenue dans l'embout dans le récipient de pesée
- Noter le résultat (en masse  $m_i$ ) obtenu
- Répéter 9 fois cette étape
- Mesurer à nouveau la température

▪ **Partie calculs**

- En fonction de la température moyenne (moyenne entre la température avant la première pesée et après la dernière pesée) et de la pression atmosphérique de la salle où s'exercent les manipulations, la masse volumique de l'eau est déterminée (en  $\mu\text{L}/\text{mg}$ ) selon une table fournie dans l'annexe 6 de l'EDQM. On note Z cette masse volumique.
- Calculer le volume  $V_i$  de chaque prélèvement (10 mesures au total) en fonction des masses  $m_i$ .

$$V_i = Z \times m_i \quad \text{(Équation 1)}$$

- Calculer le volume moyen  $\bar{V}$  pour la série de 10 mesures

$$\bar{V} = \frac{\sum V_i}{10} \quad \text{(Équation 2)}$$

- Calculer l'**erreur systématique**, notée **e** (exactitude), qui correspond à la différence entre le volume moyen  $\bar{V}$  et la valeur vraie qui correspond au volume testé  $V_t$ . Le résultat s'exprime en  $\mu\text{L}$

$$e = \bar{V} - V_t \quad \text{(Équation 3)}$$

⇒ Pour que la pipette soit qualifiée l'erreur systématique doit être égale à  $\pm 40\mu\text{L}$ .

- Calculer la répétabilité pour exprimer l'erreur aléatoire grâce à la dispersion des résultats de pesées. Le résultat est un coefficient de variation (CV) en %

$$s = \sqrt{\frac{\sum(V_i - \bar{V})^2}{10-1}} \quad \text{(Équation 4)}$$

$$CV = \frac{100 \times s}{\bar{V}} \quad \text{(Équation 5)}$$

⇒ Pour que la pipette soit qualifiée l'erreur aléatoire doit être égale à  $\pm 0,3\%$ .

Enfin, il est d'usage de tester 3 volumes différents avec 10 mesures par volume, en particulier les capacités extrêmes de la pipette, et une valeur au milieu pour couvrir toute la gamme d'exploitation puisque la pipette est utilisée pour différentes techniques d'analyse, y compris la validation évoquée en partie 2.

Ainsi toutes les étapes techniques et de calculs mentionnées ci-dessus doivent être appliquées sur les volumes  $500\mu\text{L}$ ,  $2500\mu\text{L}$  et  $5000\mu\text{L}$  permettant de qualifier la micropipette Eppendorf  $500-5000\mu\text{L}$  sur toute la gamme d'exploitation.

Plus généralement, pour tout équipement, si à l'issue de la QP les résultats sont hors tolérances, alors ce dernier est mis hors service le temps de la réparation. Avant sa réintroduction en routine, l'équipement doit de nouveau faire des tests de qualification et obtenir des résultats conformes.

## 8. DISCUSSION AUTOUR DE LA QUALIFICATION

La qualification des équipements est un point à ne pas sous-estimer dans l'industrie du médicament puisque cela permet d'assurer la qualité des résultats de contrôle obtenus permettant ainsi de décider de la conformité des produits à l'issue des mesures. C'est pourquoi les équipements doivent être maîtrisés. Quand bien même un produit fini serait conforme ou non, si l'instrument nécessaire à son contrôle n'est pas qualifié, il est possible d'obtenir un résultat erroné susceptible d'entraîner d'importantes conséquences. Par exemple, si à tort un produit est considéré conforme alors qu'il ne l'est pas, cela peut s'avérer dangereux pour les patients, ou à l'inverse refuser un produit alors qu'il est conforme représente une perte d'argent considérable. Par conséquent, tous les équipements d'un laboratoire de contrôle qualité doivent être qualifiés, aussi bien initialement avec la QI, QO et QP que périodiquement pour maintenir la fiabilité de l'instrument et des mesures qu'il fournit. Ces généralités sont également appliquées pour les équipements de production, maintenance...

D'autre part, il est vrai que de nombreux équipements complexes ont besoin de logiciels pour fonctionner ; cela explique que la validation des systèmes informatisés devient une priorité dans l'industrie pharmaceutique d'autant plus que cette activité est obligatoire d'après l'annexe 11 des BPF. On qualifie les équipements et on valide les systèmes informatisés mais les 2 sont étroitement liés. Dans tous les cas, tout résultat, toute donnée obéit à la règle suivante : **ALCOA [24]** :

- A : attribuable → auteur et source identifiés
- L : lisible → les données sont interprétables à long terme
- C : contemporaine → les données sont enregistrées au moment où elles sont collectées
- O : originale (ou copie certifiée)
- A : fiable (*accurate* en anglais)

Valider ces systèmes est essentiel pour assurer la fidélité des résultats et le *data integrity* ; c'est-à-dire que les données critiques électroniques ou enregistrées sous format papier doivent rester complètes, cohérentes et exactes tout au long de leur cycle de vie [25].

Puisque la qualification des équipements, prérequis indispensable à la validation, a été abordée, le chapitre 3 vient chronologiquement compléter la démarche qualité qui vise à

démontrer la satisfaction du produit aux exigences. Cette partie va présenter les notions essentielles de la validation, et plus précisément le cas de la validation d'un dosage.

## CHAPITRE 3 : VALIDATION ANALYTIQUE D'UN DOSAGE

D'après la norme NF EN ISO/CEI 17025, la validation est définie comme étant la « confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » [26].

### 1. GÉNÉRALITES

Dans un premier temps, il s'agit de présenter le médicament qui fait l'objet de la validation avant de présenter le principe de la technique analytique.

#### 1.1. RINGER LACTATE VETOFLEX®

##### 1.1.1 Indication

Le Ringer Lactate Vetoflex® est un médicament vétérinaire dont l'AMM est détenue par le laboratoire Bioluz depuis 1996. Selon son RCP, il s'agit d'une solution pour perfusion administrée à toutes les espèces animales entraînant la modification du bilan électrolytique. De ce fait, ce produit est utilisé dans le traitement des déshydratations, des acidoses métaboliques modérées et dans le traitement et la prévention des hypovolémies périopératoires et des chocs hémorragiques [27].

##### 1.1.2 Composition

L'ensemble des solutions a été préparé selon la composition théorique présentée dans le tableau 9 en utilisant des matières premières (MP) contrôlées et libérées.

Tableau 9 - Composition du Ringer Lactate Vetoflex®

Matières premières	Composition centésimale	Composition ionique (mmol/L)
Chlorure de sodium	0,6 g	130,32
Chlorure de potassium	0,04 g	5,36
Chlorure de calcium, 2H <sub>2</sub> O	0,0268 g	1,82
Lactate de sodium	0,310 g	27,65
EPPI	Qsp 100,0 mL	

Connaître la composition du médicament vétérinaire est utile à la compréhension de la stratégie de validation puisque chaque substance active (SA) dans un produit fini doit faire l'objet d'une validation analytique de son dosage. Parmi les différents composés de cette

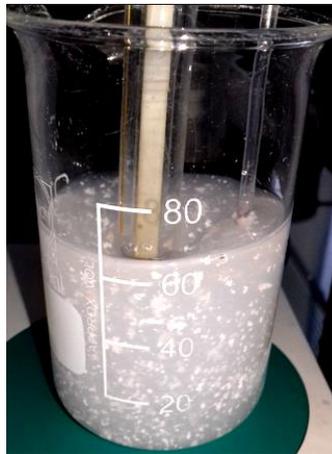
formulation, la méthode de quantification qui a été développée et validée concerne les chlorures : il s'agit d'un dosage par argentimétrie et détermination potentiométrique.

## 1.2. ARGENTIMÉTRIE

Il s'agit d'une méthode de titrage par **précipitation** qui a la particularité d'utiliser les ions argent  $\text{Ag}^+$  (provenant d'une solution titrante de nitrate d'argent,  $\text{AgNO}_3$ ) pour doser les anions dont les halogénures comme les ions chlorures ( $\text{Cl}^-$ ).

La réaction est la suivante :  $\text{Ag}^+_{(\text{aq})} + \text{Cl}^-_{(\text{aq})} \rightarrow \text{AgCl}_{(\text{s})}$  **(Équation 6)**

Elle donne lieu à la formation d'un précipité blanc de chlorure d'argent (Figure 4).



*Figure 4 - Formation du précipité blanc de chlorure d'argent*

En argentimétrie, le point de titrage peut être déterminé :

- Soit de manière visuelle avec l'utilisation d'un indicateur coloré, comme le chromate de potassium très utilisé dans le dosage des chlorures par la méthode de Mohr
- Soit par titrage potentiométrique

Lors de la validation de la méthode de dosage des chlorures dans le Ringer Lactate Vetoflex<sup>®</sup> par argentimétrie, le point de titrage est mis en évidence par un titrage potentiométrique dont le principe est expliqué au paragraphe suivant.

### 1.3. POTENTIOMÉTRIE

Un titrage par potentiométrie consiste en une **mesure du potentiel électrique d'une solution** et ce entre deux électrodes (une indicatrice et l'autre de référence) en fonction du volume de titrant ajouté. Dans notre cas, le titrant est le nitrate d'argent et il est ajouté afin de déterminer la concentration en chlorures des solutions titrées. Il s'agit d'une méthode de dosage précise et automatisable ce qui est très avantageux dans l'industrie pharmaceutique.

L'électrode de référence (métal en argent) correspond à un compartiment électrolytique dont le potentiel est constant quelles que soient les conditions de mesure tandis que l'électrode indicatrice (bague en argent) est sensible à la concentration en analyte [28]. De ce fait, selon la concentration en chlorures dans la préparation pharmaceutique, la différence de potentiel entre les deux électrodes varie en même temps que le volume de réactif titrant ajouté ; cela permettant de déterminer le volume équivalent (V<sub>éq</sub>) du titrage. Dans le cadre de la validation, une électrode combinée est utilisée, c'est-à-dire que les deux types d'électrodes sont comprises dans un seul corps, et elle est immergée dans une solution électrolytique de référence de nitrate de potassium 1M pour son stockage et sa conservation. De plus, le titrateur trace une courbe représentant le potentiel E en fonction du volume de réactif titrant où au point d'inflexion se lit le V<sub>éq</sub> (figure 5). Le potentiel E correspond à une différence de potentiel mesurée par un voltmètre, entre les deux électrodes, due à la présence des couples redox mis en jeu lors du titrage (Ag<sup>+</sup>/Ag et Cl<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup>). Le point de fin de titrage est atteint lorsque la variation de potentiel en fonction du volume de nitrate d'argent est maximale, et il est exprimé par le volume de réactif titrant correspondant [29]. À partir du volume, la concentration en chlorures peut être déterminée selon la relation mathématique suivante :

$$\text{Chlorures totaux (mmol/L)} : \frac{\text{V}_{\text{éq}} (\text{mL}) * \text{Titre de la bouteille (mol/L)}}{\text{Prise d'essai(mL)}} * 1000 \quad (\text{Équation 7})$$

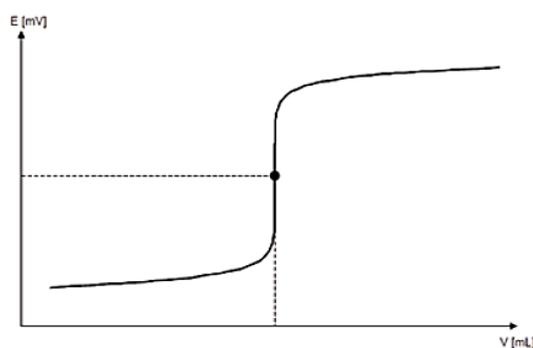


Figure 5 - Titrage potentiométrique à point d'équivalence - Courbe  $E = f(Vol)$  [30]

La validation appliquée au dosage des chlorures s'effectue par **titrage argentimétrique et détermination potentiométrique**. Elle est indispensable à l'utilisation en routine de la méthode analytique dans le but de contrôler les produits finis et permettre leur libération sur le marché. Par conséquent la définition, les objectifs ainsi que le déroulement de la validation sont développés dans la partie suivante.

## 2. DÉFINITION ET DÉROULEMENT DE LA VALIDATION

### 2.1. OBJECTIF DE LA VALIDATION

L'objectif d'une validation analytique est de démontrer l'aptitude et la fiabilité de la méthode vis-à-vis des référentiels opposables. En effet, la validation est une exigence réglementaire clairement évoquée dans la ligne directrice 15 des BPF dont la définition correspond à « l'établissement d'une preuve documentée, en conformité avec les principes des BPF, que la mise en œuvre, ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système, permet réellement d'atteindre les résultats escomptés » selon le glossaire des BPF [17].

Le dosage d'une SA étant une étape obligatoire du contrôle du produit fini, cette étude a pour objectif de valider la méthode de dosage des ions chlorures contenus dans le Ringer Lactate Vetoflex®. Pour cela, il faut établir un protocole qui définit la méthodologie applicable à ce dosage effectué par potentiométrie. À l'issue des expérimentations, les résultats expérimentaux devront prouver que la procédure analytique est **appropriée à l'usage auquel elle est destinée**. De cette façon, elle pourra être utilisée en routine.

### 2.2. LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE VALIDATION

Pour rappel, un plan de validation suit le schéma illustré en figure 6. Il commence en premier lieu par la rédaction d'un protocole de validation (PV) et ensuite les essais sont effectués suivis par le traitement statistique des résultats permettant de rédiger le rapport de validation (RV) et prendre une décision sur le statut de la méthode. Le chapitre 3 s'intéresse au déroulement de la validation.



Figure 6 - Les étapes d'une validation de méthode analytique

À présent que les objectifs de la validation sont énoncés et que le déroulement général est rappelé, il est nécessaire de développer les référentiels encadrant le processus de validation. Par conséquent, il faut en amont expliciter la démarche qui a été appliquée à commencer par la justification du choix des critères de validation.

### 2.3. LES RÉFÉRENTIELS ET CRITÈRES UTILISÉS DANS LE CADRE DE LA VALIDATION DE MÉTHODE

#### 2.3.1 Présentation des différents référentiels

Différents guides et référentiels ont été élaborés durant les dernières décennies afin d'orienter les industriels lors de la validation des procédures analytiques, qui est une étape indispensable à l'obtention d'une AMM par exemple.

Le premier référentiel donnant des directives sur la validation des méthodes analytiques est le **guideline ICH Q2(R1)** « *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* », paru en 2005. C'est un document qui définit des recommandations sur la mise en application de validation de méthodes analytiques. En fonction du type de méthode, différents paramètres sont à étudier. Ce guide explicite leurs définitions et de façon générale, comment mettre en œuvre leur étude. Il s'agit d'un texte opposable. Toute validation doit répondre à ses exigences pour obtenir une AMM puisque ce *guideline* indique les données qui doivent figurer à minima dans un dossier d'enregistrement.

Bien que le guide ICH Q2(R1) définisse les critères de validation à tester, il ne propose pas d'approche expérimentale. Pour répondre à ce besoin, d'autres documents constituent des guides de validation analytique sans pour autant être des exigences réglementaires. Parmi eux, il y a les **guides de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP)** :

- STP Pharma Pratique (1992) « Guide de validation analytique – Rapport d'une commission SFSTP » [31]
- STP Pharma Pratique (1997) « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégies de validation – Rapport d'une commission » [32]
- STP Pharma Pratique (2003 et 2006) « Validation des procédures analytiques quantitatives – Harmonisation des démarches » [33-35]

D'autres supports sont utiles à la validation analytique comme :

- Le rapport technique de l'IUPAC (2002) « *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis* » [36]
- Le guide EURACHEM (2014, 2e édition) « *The Fitness for Purpose of Analytical Method* » [37]

### 2.3.2 Critères de validation

Puisque la méthode à valider est une méthode de dosage d'un composant constitutif de l'échantillon à analyser, le protocole s'intéresse aux paramètres de validation recommandés par l'ICH Q2(R1) qui sont énoncés au tableau 10 [38].

Tableau 10 - Paramètres à valider lors d'un dosage selon l'ICH Q2(R1)

Type d'analyse  Caractéristiques	Identification	Impuretés		Dosage
		Teneur	Limite	-Dissolution (mesure seulement) -Teneur / activité
Exactitude	-	+	-	+
Fidélité				
Répétabilité	-	+	-	+
Fid. Intermédiaire	-	+(1)	-	+(1)
Spécificité (2)	+	+	+	+
Limite de détection	-	-(3)	+	-
Limite de dosage	-	+	-	-
Linéarité	-	+	-	+
Intervalle de mesure	-	+	-	+

- : caractéristique qui n'est normalement pas évaluée

+ : caractéristique normalement étudiée

(1) : Si la reproductibilité (voir le glossaire) est évaluée, il n'est pas nécessaire de déterminer la précision intermédiaire

(2) : Si la méthode est insuffisamment spécifique, cette déficience peut être compensée par la spécificité d'une ou de plusieurs autres épreuves complémentaires auxquelles l'échantillon est soumis

(3) : Parfois nécessaire

Fid. : Fidélité

La validation réalisée dans le cadre du dosage des chlorures dans le Ringer Lactate Vetoflex® s'inspire en grande partie du guide publié en 1992 par la SFSTP. Les critères de validation sont la justesse (autrement appelée l'exactitude), la fidélité et la linéarité. L'avantage de ce *guideline* réside dans le fait que la préparation des échantillons est décrite et

que les formules des calculs statistiques ainsi que leurs conditions de validité sont détaillées pour chaque paramètre. Les définitions et les méthodes de calcul de ces paramètres sont les suivantes [4-31-38] :

#### **2.3.2.1 La spécificité**

- **Définition**

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à évaluer sans équivoque l'analyte (*ici les chlorures*) en présence d'autres composants de la formule susceptibles d'être présents et d'interférer dans la mesure. C'est le cas notamment des impuretés, des produits de dégradation, ou de la matrice. Autrement dit, une méthode est dite spécifique si elle mesure uniquement l'analyte avec la garantie que le signal instrumental ne provient que de lui.

#### **2.3.2.2 La linéarité**

- **Définition**

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité (à l'intérieur de l'intervalle de mesure donné) à obtenir des résultats qui soient directement proportionnels à la concentration (ou quantité) d'analyte dans l'échantillon. En principe, elle s'évalue à la fois sur la SA seule et sur la forme reconstituée (FR).

- **Méthode de calcul**

La linéarité doit être démontrée sur la substance pharmaceutique par dilution de solution titrées et/ou par pesées individuelles et indépendantes de mélanges synthétiques des différents constituants du médicament (matrice d'excipients et SA) [38]. Usuellement lors d'une validation de méthode, une solution mère (SM) par point de gamme est préparée ce qui équivaut aux pesées individuelles. Cela permet d'éviter des erreurs concernant les dilutions et d'utiliser la même verrerie. Parfois, il est préférable de faire une gamme par dilution d'une seule SM, en particulier lorsque peu de matière première est disponible ou que cette dernière coûte très cher. Dans le cadre de cette validation, les MP libérées ont été utilisées. Leur ressource étant limitée, il a été choisi de réaliser les gammes par dilution de SM comme proposé par l'ICH Q2 (R1).

D'autre part, la linéarité se détermine avec au minimum 5 séries de 3 répétitions à la fois sur la FR et sur la forme SA seule. Autrement dit, cela revient à effectuer 3 gammes de

linéarité sur 5 niveaux de concentration (80% à 120%) à raison d'une gamme par jour, soit une SM par jour et par type de forme analysée (analyte seul / forme reconstituée).

Cependant, il est difficile de mesurer exactement les mêmes quantités d'analyte pour un niveau donné en raison de l'étape de pesée. Par conséquent, les différences dans le signal instrumental mesuré s'expliquent par l'erreur expérimentale mais aussi par le fait que la réponse dépend linéairement des concentrations. Pour s'affranchir des écarts qui ne sont pas spécifiquement dus au système analytique, un **changement de variable** est réalisé (*les annexes IV et V illustrent la pratique du changement de variable*).

Pour statuer sur la linéarité de la méthode, la conformité aux 5 critères suivant doit être démontrée :

- Le **coefficient de détermination** ( $R^2$ ) : c'est un indicateur permettant d'évaluer la qualité d'une régression de type linéaire simple. Il renseigne sur l'adéquation entre le modèle et la distribution des données obtenues. Plus  $R^2$  est petit et proche de 0 plus le modèle mathématique est inadéquat c'est-à-dire qu'il n'explique pas la distribution des points, ainsi le nuage de points se disperse autour de la droite de régression. Au contraire, plus l'indicateur est proche de 1 et plus l'équation de la droite de régression est en mesure de déterminer la distribution des points, de ce fait le nuage de point se resserre.

$$R^2 = \frac{SCE_{fac}}{SCE_{tot}} = \frac{SCE_{fac}}{SCE_{fac} + SCE_{res}} = 1 - \frac{SCE_{res}}{SCE_{tot}} \quad (\text{Équation 8})$$

- **Significativité de la régression** : le test de Fisher permet de déterminer s'il existe une régression significative entre deux variables X et Y (dépendance linéaire), si c'est le cas, cela sous-entend qu'il existe une pente significativement différente de zéro [39].
- **Comparaison de la pente avec 0** : l'objectif est de prouver statistiquement que la pente est différente de zéro selon un test de Student.
- **Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0** : à l'inverse, l'objectif est de prouver que l'ordonnée à l'origine n'est pas statistiquement différente de zéro grâce à un test de Student. Si c'est le cas, la méthode est dite spécifique.
- **Validité de la droite de régression** : autrement nommée test du manque d'ajustement, elle est calculée par un test de Fisher. Ce test est uniquement accessible parce qu'il y a

des répétitions à chaque niveau de concentration et que le changement de variable permet d'avoir une concentration unique pour chacun des niveaux. Elle s'évalue en décomposant les sources de variabilité. En effet, la variabilité totale correspond à la somme de 2 sources de variance :

- Une variance systématique ou factorielle : variance attribuée à l'action d'une variable indépendante contrôlée (changement de niveau de concentration)
- Une variance due à l'erreur dite résiduelle : variance due à l'influence de variables non contrôlées. Elle est elle-même constituée de deux autres types de variabilité :
  - La variance due au manque d'ajustement linéaire des mesures obtenues ( $\text{Var}_{\text{Lin}}$ )
  - La variance due à l'erreur pure ( $\text{Var}_{\text{ep}}$ )

C'est en faisant le rapport de ces deux dernières variances que la validité de la droite de régression est évaluée.

Enfin, il convient de comparer les deux droites de régression obtenues (gamme SA seule et gamme FR). Les pentes ainsi que les ordonnées à l'origine sont toutes deux comparées à l'aide d'un test de Student pour déceler un éventuel effet matrice ou bien une erreur systématique. L'objectif est de démontrer que les droites sont comparables.

$$t_{\text{éch}} = \frac{|a_{\text{SA}} - a_{\text{FR}}|}{\sqrt{s^2_{a_{\text{SA}}} + s^2_{a_{\text{FR}}}}} \quad \text{(Équation 9)}$$

$$t_{\text{éch}} = \frac{|b_{\text{SA}} - b_{\text{FR}}|}{\sqrt{s^2_{b_{\text{SA}}} + s^2_{b_{\text{FR}}}}} \quad \text{(Équation 10)}$$

En revanche, avant de conclure sur la linéarité, il faut vérifier que certaines conditions d'application des tests sont remplies parmi lesquelles :

- La vérification de la normalité des données brutes (volumes équivalents)
- La vérification de la normalité des résidus

Les résidus représentent la différence entre les valeurs observées (volume équivalent mesuré) et les valeurs correspondantes calculées par le modèle (volume équivalent théorique), soit la variance non expliquée par le modèle. Des valeurs de résidus faibles suggèrent un ajustement du modèle correct.

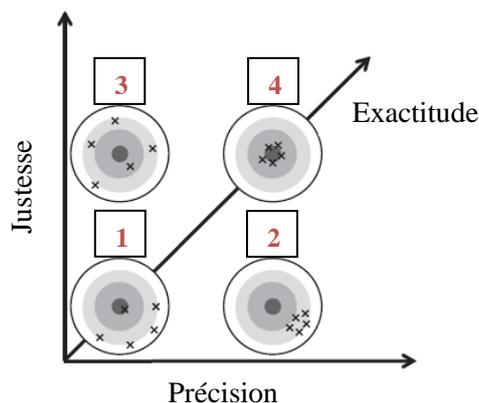
Les résultats des pré-requis sont fournies en annexes (*Annexes IV Linéarité gamme SA p100-107 et V Linéarité gamme FR p108-115*).

### 2.3.2.3 L'exactitude

#### ▪ Définition

Il s'agit de l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est considérée conventionnellement comme la valeur vraie ou la valeur de référence et la valeur trouvée. Elle est parfois appelée justesse.

La norme ISO 3534-2 donne une définition plus complète : « étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai ou résultat de mesure et la valeur vraie. Le terme « exactitude », appliqué à un ensemble de résultats d'essai ou de mesure, implique une combinaison de composantes aléatoires et d'une erreur systématique commune ou d'une composante de biais. L'exactitude fait référence à une combinaison de justesse et de fidélité » [40]. La figure 7 illustre les différentes composantes de l'exactitude.



#### Légende :

- 1 – Ni juste ni fidèle : erreur aléatoire et systématique
- 2 – Pas juste mais fidèle : erreur systématique
- 3 – Juste mais pas fidèle : erreur aléatoire
- 4 – Juste et fidèle (= exact) : erreur faible

Figure 7 - Présentation des deux composantes de l'exactitude : justesse et fidélité [41]

#### ▪ Méthode de calcul

L'exactitude est déterminée avec au minimum 5 séries de trois répétitions, dans notre cas sur la FR. Pour cela, les données de linéarité (gamme FR) sont exploitées puisque les conditions correspondent au protocole minimum recommandé. Ensuite, il faut calculer les recouvrements (équation 11) pour chaque point avant de vérifier l'homogénéité des variances

par un test de Cochran (équation 12). Si les variances sont homogènes, un test de validité des recouvrements moyens (test de Fisher : équation 13) permet de savoir si les variations observées entre les mesures des cinq séries sont dues uniquement aux erreurs expérimentales.

Enfin, il est possible d'estimer l'intervalle de confiance sur le recouvrement moyen total (IRM : équation 14) pour statuer sur l'exactitude de la méthode : si cet intervalle comprend le recouvrement 100% alors la méthode est exacte.

$$R_{xi} = \frac{\text{concentration exacte}}{\text{concentration calculée}} \times 100 \quad \text{(Équation 11)}$$

$$C_{éch} = \frac{s^2_{\max}}{\sum s^2} \quad \text{(Équation 12)}$$

$$F_{\text{obs}} = \frac{\text{Var}_{\text{rés}}}{\text{Var}_{\text{fac}}} \quad \text{(Équation 13)}$$

$$\text{IRM} = \left[ m_R - t_{(0,05;N-1)} \times \sqrt{\frac{\text{Var}_{\text{Tot}}}{N}} ; m_R + t_{(0,05;N-1)} \times \sqrt{\frac{\text{Var}_{\text{Tot}}}{N}} \right] \quad \text{(Équation 14)}$$

#### 2.3.2.4 La fidélité

##### ▪ Définition

La fidélité d'une procédure d'analyse exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures obtenue à partir de plusieurs prélèvements issus d'un même échantillon homogène. Elle fournit une indication à propos des erreurs liées au hasard et s'exprime en termes de variance, écart-type et coefficient de variation.

En effet, dans le cas de conditions opératoires identiques, des essais réalisés sur des produits identiques fournissent la plupart du temps des résultats différents en raison des erreurs aléatoires. Cela s'explique par le fait qu'il existe des facteurs influant les résultats qui ne sont pas toujours contrôlés. L'objectif est donc d'étudier cette variabilité imputable aux facteurs suivants, par exemple :

- L'opérateur
- L'équipement
- L'environnement
- Les réactifs et la verrerie

On s'intéresse à 2 niveaux de fidélité : la répétabilité et la fidélité intermédiaire.

La **répétabilité** est la fidélité obtenue « sous des conditions de répétabilité : conditions où les résultats d'essai / de mesure indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai / de mesure identiques sur la même installation d'essai ou de mesure, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps » [40]. Pour cela, 6 mesures de la concentration cible (100%) sont effectuées sur un jour et sur la FR.

La **fidélité intermédiaire** exprime les variations intra-laboratoires : différents jours, différents opérateurs, différents équipements, etc. Dans la validation proposée en seconde partie, les mesures sont réalisées à des jours différents mais avec le même opérateur et le même équipement selon le schéma suivant : 3 séries de 6 mesures de la concentration cible (100%) sur 3 jours différents et sur la FR.

Tandis que la répétabilité représente le niveau minimal de variabilité, la fidélité intermédiaire mesure une variabilité supérieure des résultats (figure 8). Le seul paramètre variant étant l'effet jour, la variabilité calculée n'est pas maximale contrairement à un essai de reproductibilité où les opérateurs et les équipements varient également. Cela dit, bien qu'un seul titrateur était disponible, il aurait pu être envisageable d'ajouter la variable opérateur.

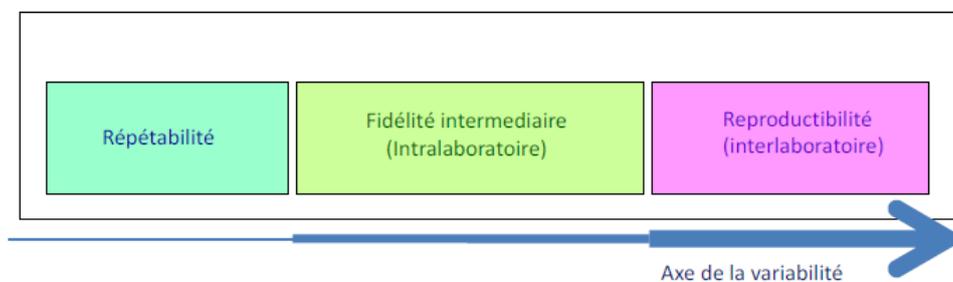


Figure 8 - Composantes croissantes de variabilité lors de l'étude de la fidélité [42]

#### ▪ Méthode de calcul

La fidélité est déterminée en effectuant au minimum 3 séries de 6 répétitions sur un échantillon homogène de la concentration cible 100%. Afin de prendre en considération les variations de pesées, les recouvrements sont calculés. Ils servent de base pour le calcul du CV de répétabilité et le CV de fidélité intermédiaire. Il faut néanmoins s'assurer de l'homogénéité des variances (équation 12) à l'intérieur des 3 groupes par un test de Cochran et si cette condition n'est pas respectée, il est possible de rechercher les mesures aberrantes à supprimer à l'aide d'un test de Dixon ou de Grubbs. Le test de recherche des valeurs aberrantes dans une

série de mesures ne fonctionne vraiment qu'à partir de six répétitions ce qui justifie le protocole choisi : 3 séries de six mesures chacune [43].

#### 2.3.2.5 L'intervalle de mesure

- **Définition**

L'intervalle de mesure représente l'intervalle entre la plus faible et la plus forte concentration du composé d'intérêt dans l'échantillon pour lequel il a été démontré qu'un niveau approprié de linéarité, d'exactitude et de fidélité est atteint. Le référentiel précise que dans le cadre d'un dosage d'une substance médicamenteuse ou d'un produit fini l'intervalle est compris entre **80% et 120% de la concentration cible** (100% en contrôle de routine).

Un critère supplémentaire, non recommandé par le *guideline* lors d'un dosage, est étudié afin d'être le plus exhaustif possible. La détermination de l'incertitude de mesure est très importante lorsqu'un laboratoire doit rendre un résultat quantitatif afin de garantir sa qualité et le respect des spécifications (valeurs limites déposées dans le dossier d'AMM).

#### 2.3.2.6 L'incertitude de mesure

- **Définition**

L'incertitude de mesure est un paramètre associé au résultat de mesure ou au résultat d'essai qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourraient raisonnablement être attribuées à la grandeur particulière soumise à mesurage ou à la caractéristique soumise à essai [40]. Toute mesure obtenue à partir d'une méthode analytique est entachée d'une incertitude dont l'estimation sur le résultat de la mesure peut se faire selon les informations relatives à la performance de la méthode ; ici, les données de validation (en particulier les données de fidélité). L'incertitude représente donc **la plage des valeurs possibles d'un résultat** qui dépend des qualités intrinsèques de la méthode analytique et des variations pouvant intervenir dues à l'environnement ou au choix des équipements, des opérateurs, ...

Selon le STP Pharma Pratique, il existe deux types d'évaluation de l'incertitude : Type A et Type B.

- Type A : Elle s'appuie sur l'application d'une méthode statistique à une ou plusieurs séries de valeurs provenant de mesurages et pouvant être caractérisées par des estimateurs

statistiques. C'est le cas notamment des méthodes indirectes associées à des calculs : méthodes électrochimiques, techniques séparatives, pouvoir rotatoire, ...

⇒ Dans ce cas, l'incertitude est estimée à partir d'estimateurs expérimentaux issus du cycle de vie de la méthode d'analyse.

- **Type B** : L'évaluation se fait par d'autres moyens que l'analyse statistique de séries de mesures. Ce mode d'évaluation fait en général appel à des modèles théoriques de distribution et des lois de probabilité correspondantes, ainsi qu'à la connaissance des paramètres opérationnels et environnementaux de la méthode de mesure. Les méthodes directes sont concernées : point de fusion, granulométrie, ...

⇒ C'est une évaluation très utilisée pour les méthodes physiques mais elle s'emploie également sur des méthodes de mesures physico-chimiques ou biologiques, qui font généralement appel à une évaluation de type A, en particulier lorsque les données de fidélité ou de justesse ne sont pas disponibles.

La détermination de la concentration ionique en chlorures dans le Ringer Lactate Vetoflex® par potentiométrie appartient à la classification des méthodes électrochimiques. Cela explique que cette méthode de mesure se réfère aux méthodes de type A. Cette typologie permet d'orienter la stratégie de calcul applicable à notre cas. Pour déterminer l'incertitude - type composée et l'incertitude élargie, il faudra suivre étape par étape les instructions décrites dans la partie *V estimation de type A à l'aide de données de plans de validation équilibrés*<sup>1</sup> du STP Pharma Pratique [40] → À cette fin, les données issues de l'étude de la fidélité seront exploitées.

#### ▪ **Méthode de calcul**

L'incertitude de mesure s'établit en trois temps. D'abord, l'incertitude type composée est calculée à partir de l'intervalle prévisionnel de tolérance  $\beta$  (= 95%). Déterminé sur le niveau 100% selon l'étude de la fidélité, « il représente l'intervalle pour lequel il existe une probabilité de  $\beta$  % de trouver le prochain résultat produit par la méthode sur l'échantillon de validation au niveau de concentration considéré ». Cet intervalle dépend du biais moyen du niveau en question. Dans un deuxième temps, il s'agit de calculer l'incertitude élargie en multipliant l'incertitude type composée par le quantile de Student déterminé à l'étape

---

<sup>1</sup> *Equilibrés* : Dans notre cas, on effectue 3 séries de 6 mesures soit  $I \times J = 3 \times 6 = 18$ .

précédente. Enfin, la troisième et dernière étape consiste en l'expression et la formalisation de l'incertitude, par exemple elle est habituellement exprimée avec deux chiffres significatifs.

Compte tenu du fait que l'intérêt de la validation analytique est expliqué et que les critères de validation à étudier dans le cadre d'un dosage sont connus, la partie 2 propose une approche expérimentale et statistique appliquée à la quantification des chlorures contenus dans le Ringer Lactate Vetoflex<sup>®</sup>, médicament vétérinaire stérile sous forme de poche pour perfusion.

## Partie 2 : Partie expérimentale

*Validation du dosage des chlorures :  
Application au Ringer Lactate Vetoflex<sup>®</sup>*

### 1. PRÉ-REQUIS À LA VALIDATION

Avant toute validation analytique, il convient de vérifier un certain nombre d'éléments.

En premier lieu, il faut s'assurer que le **personnel** manipulant les équipements soit **formé** à leur utilisation. La formation se déroule généralement en deux temps : lecture des procédures documentaires et formation pratique par compagnonnage.

Ensuite, il faut impérativement constater que les **équipements sont qualifiés**. Dans le cadre de la validation, qui s'est déroulée de mars à avril 2018, 3 équipements ont été utilisés et d'après le tableau 11, les équipements étaient qualifiés lors de leur utilisation.

*Tableau 11 - Statut de qualification des équipements*

<b>Équipement</b>	<b>Date d'étalonnage</b>	<b>Validité de l'étalonnage</b>	<b>Document de preuve</b>
Titrateur Metrohm Titrino Plus 848	22/08/2017	1 an	Rapport de QP
Balance Mettler Toledo MS205MV	20/07/2017	1 an	Rapport de QP
Micropipette Eppendorf 500-5000 $\mu$ L	10/08/2017	1an	Constat de vérification

Enfin, il faut vérifier la **disponibilité et l'état des matières et matériels** nécessaires à la validation (*voir Annexe II p97*). Par exemple, il faut porter attention à la quantité et qualité de la verrerie ou encore à la date de péremption des matières utilisées.

## 2. VALIDATION DU DOSAGE DES CHLORURES

### 2.1. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Le dosage des chlorures totaux s'effectue par un titrage au nitrate d'argent et une détermination du point de fin de titrage par potentiométrie, comme indiqué dans la monographie 0193 du chlorure de sodium de la Ph. Eur. (édition en vigueur) [44]. Cette technique est adaptée au Titrateur Metrohm Titrino Plus 848. Ainsi, chaque échantillon est analysé comme décrit ci-après :

Effectuer une prise d'essai de 5,0 mL des solutions préparées (*le protocole est détaillé au cas par cas au paragraphe 3*) à l'aide d'une pipette jaugée et l'introduire dans un bécher. Ajouter environ 50 mL d'eau purifiée, directement dans le bécher. Le niveau de la solution doit être suffisant pour que l'électrode ainsi que le tuyau de la burette du titrateur soient immergés. Ensuite, sélectionner le programme adapté au dosage des chlorures, pré-enregistré dans l'appareil, et renseigner les informations demandées tels que l'identité des points et le volume de la prise d'essai. À la fin du dosage, le titrateur donne directement la valeur de la concentration en chlorures en mmol/L, avec le détail du calcul (équation 7). D'un point de vue **traçabilité**, une imprimante est reliée à l'équipement, et après chaque titrage, elle édite un ticket qui apporte la preuve de la mesure et récapitule l'ensemble des informations, parmi lesquelles :

- L'équipement utilisé
- La date et l'heure de la mesure
- L'identité de l'échantillon
- Le volume de la prise d'essai
- Les résultats dont le volume équivalent, la concentration en chlorures et le détail du calcul de la concentration

### 2.2. REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES ÉTAPES DE LA VALIDATION

Comme mentionné Partie 1. Chapitre 3, la validation analytique s'appuie sur le guide de validation élaboré par la commission SFSTP 1992 et les paramètres recommandés par l'ICH Q2(R1). Ainsi, 4 tests, en plus de la détermination de l'intervalle de mesure, sont effectués systématiquement selon la figure 9.

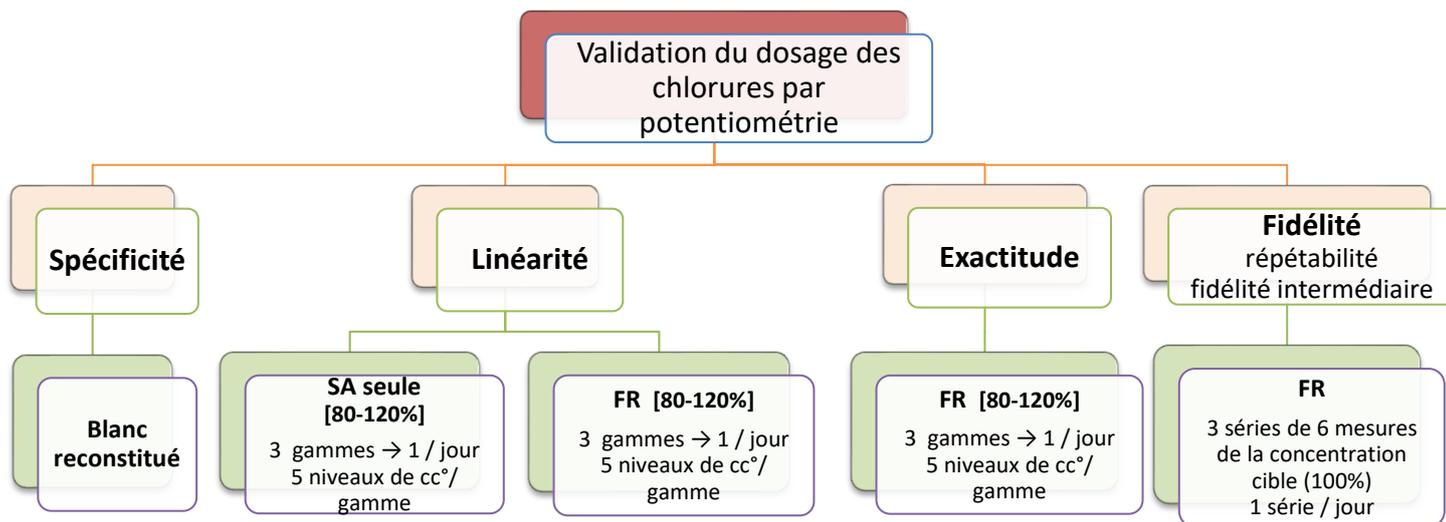


Figure 9 - Représentation synthétique du déroulement des essais systématiques

De plus, comme illustré dans la figure 10, le calcul de l'incertitude de mesure sera réalisé dans le but d'être le plus exhaustif possible. Aucune expérience supplémentaire n'est requise puisque sa détermination exploite les données issues de l'étude de la fidélité.



Figure 10 - Représentation synthétique du déroulement de l'essai supplémentaire

### 3. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL ET PRINCIPAUX RÉSULTATS

#### 3.1. SPÉCIFICITÉ

##### 3.1.1 Protocole

Il s'agit de préparer puis doser une solution reconstituée sans chlorures.

❖ *Préparation de la solution reconstituée sans chlorures*

La solution reconstituée sans chlorures est préparée dans une fiole jaugée de 100,0 mL selon le protocole détaillé dans le tableau 12.

*Tableau 12 - Composition du blanc reconstitué pour l'étude de la spécificité*

Composant	Quantité théorique	Masse pesée
Chlorure de sodium	/	/
Chlorure de potassium	/	/
Chlorure de calcium, 2H <sub>2</sub> O	/	/
Lactate de sodium	0,310 g	0,31322 g
EPPI	Qsp 100,0 mL	Qsp 100,0 mL

❖ *Dosage*

La solution préparée, qui est un **blanc matrice**, est dosée : c'est-à-dire que l'essai est réalisé sur une matrice qui ne contient pas l'analyte, autrement dit un mélange solvant + matrice (sans la SA d'intérêt : les chlorures) [45].

Sachant que le V<sub>éq</sub> pour doser les chlorures totaux est proche de 5,6 mL (pour une concentration cible de 100%) et que la méthode de titration par l'AgNO<sub>3</sub> est très spécifique, le résultat attendu est qu'il n'y ait aucune réaction avec le lactate de sodium. De ce fait, même en ajoutant indéfiniment du nitrate d'argent, le V<sub>éq</sub> ne serait jamais atteint. C'est pourquoi, **si après 17,0 mL** (soit environ 3 x V<sub>éq</sub>) de réactif ajouté à la solution rien ne se passe, alors la méthode est considérée comme spécifique. En effet, dans la situation actuelle, les chlorures ne peuvent pas être isolés de leurs ions respectifs (sodium, potassium et calcium dihydraté) il est donc possible de vérifier uniquement la spécificité des chlorures « associés » par rapport au lactate de sodium.

### 3.1.2 Résultat

Le blanc matrice est analysé au titrateur afin de prouver la spécificité de la méthode. Le résultat recherché et attendu est **l'absence de réaction**. Puisqu'il n'y a pas de chlorures dans la solution, le titrateur ne peut pas déterminer de V<sub>éq</sub> car aucun ion de la solution analysée ne peut réagir avec les ions argent du réactif titrant. À **17,014 mL** aucune réaction n'est observée (aucun V<sub>éq</sub> déterminé), ainsi **C<sub>ccr</sub> = 0 mmol/L**. La méthode est considérée comme spécifique des chlorures puisque le lactate de sodium ne donne aucun signal. Il est de ce fait possible d'étudier les autres paramètres, à commencer par la linéarité.

### 3.2. LINÉARITÉ

Cette étude est réalisée simultanément sur une gamme avec l'analyte seul et sur une gamme obtenue avec la FR, en triplicat, à raison d'une gamme par jour. Pour rappel, l'intervalle de mesure pour le dosage des chlorures dans le produit fini est de 80% à 120% de la concentration cible en chlorures. Dans notre cas, la particularité du protocole est que la SA correspond à un ensemble de couples d'ions car nous ne pouvons pas préparer une solution contenant uniquement des chlorures à partir des MP (les différents chlorures sont indissociables de leurs ions respectifs). Ainsi, la gamme de SA seule équivaut à une solution de 3 chlorures comparée à la gamme de la FR à laquelle on ajoute le lactate de sodium qui n'est pas l'analyte d'intérêt de cette méthode.

**Remarque :** Pour pallier aux différences de pesées, un changement de variable est réalisé sur les données brutes dont le détail des calculs est présenté dans les annexes IV et V concernant la linéarité des gammes SA seule et FR. L'ensemble des résultats sur la linéarité sont tirés des **données transformées**.

#### 3.2.1 Gamme de la substance active seule

##### 3.2.1.1 Protocole

❖ *Préparation de 3 solutions mères de l'analyte seul : SM<sub>chlorures</sub>*

Arbitrairement, les solutions préparées sont 25 fois plus concentrées que le produit fini analysé en routine (concentration cible de 100%). Pour favoriser la dissolution des composés, les fioles sont passées au bain à ultrasons environ 10 minutes. Le protocole de préparation est résumé dans le tableau 13.

*Tableau 13 - Composition des solutions mères (Gamme SA)*

*Voir annexe III – Détails des calculs (p98-99)*

SM <sub>chlorures</sub> – Gamme SA seule				
Composant	Quantité théorique	SM <sub>chlorures</sub> 1	SM <sub>chlorures</sub> 2	SM <sub>chlorures</sub> 3
Chlorure de sodium	15,00 g	14,99926 g	14,99944 g	14,99989 g
Chlorure de potassium	1,00 g	1,00020 g	1,00004 g	1,00023 g
Chlorure de calcium, 2H <sub>2</sub> O	0,670 g	0,67042 g	0,67041 g	0,67011 g
Lactate de sodium	/	/	/	/
Eau purifiée	Qsp 100,0 mL			
Concentration exacte (mmol/L)		2791,90	2791,91	2791,97

❖ *Préparation des 3 gammes de linéarité allant de 80% à 120% en chlorures*

Les 3 gammes de linéarité sont établies par dilutions des solutions mères comme présenté dans le tableau 14.

*Tableau 14 - Préparation des gammes de la SA*

Protocole de préparation des 3 gammes				Concentration exacte (mmol/L)		
Point de gamme	SM chlorures	Eau purifiée	Concentration théorique	Gamme 1	Gamme 2	Gamme 3
80%	0,8 mL	Qsp 25,0 mL	89,344 mmol/L	89,341	89,341	89,343
90%	0,9 mL		100,512 mmol/L	100,508	100,508	100,511
100%	1,0 mL		111,68 mmol/L	111,676	111,676	111,679
110%	1,1 mL		122,848 mmol/L	122,844	122,844	122,847
120%	1,2 mL		134,016 mmol/L	134,011	134,011	134,015

**3.2.1.2 Résultats**

Les 15 solutions, soit 5 points par gamme, sont analysées au titrateur selon la méthode décrite au point 2.1. (*Description de la méthode*). Le résultat obtenu correspond au volume équivalent. Ce volume est dépendant de la concentration puisque la même méthode et la même prise d'essai sont appliquées à chaque mesure. Plus le niveau de concentration est élevé plus le volume équivalent est important. Les résultats sont regroupés dans le tableau 15.

*Tableau 15 - Volumes équivalents (Gammes SA)*

Gamme	Points de gamme	Volume équivalent en mL
1	80%	4,489
	90%	5,093
	100%	5,664
	110%	6,135
	120%	6,712
2	80%	4,462
	90%	5,037
	100%	5,641
	110%	6,179
	120%	6,764
3	80%	4,478
	90%	5,071
	100%	5,669
	110%	6,213
	120%	6,795

### 3.2.1.3 Étude statistique

Voir annexe IV : Linéarité gamme SA seule (p100-107)

La droite de régression obtenue pour l'étude de la linéarité sur la gamme de la SA seule a pour équation :  $y = 0,0508x - 0,0432$ .

- Coefficient de détermination ( $R^2$ )

Pour évaluer la linéarité, il faut s'intéresser au coefficient de détermination  $R^2$ . Il est obtenu en traçant la droite  $f(\text{concentration exacte introduite}) = \text{volume équivalent}$  ou bien selon l'équation 8.

Le critère d'acceptation, défini en interne, est le suivant :  $R^2 \geq 0,990$ . Dans cette étude de la linéarité, le coefficient de détermination est de  $R^2 = 0,9986$  pour la gamme SA seule. Ce dernier étant supérieur au critère d'acceptation, le premier paramètre de linéarité est conforme. En effet, le coefficient de détermination est très proche de 1, le modèle mathématique de type régression linéaire simple ( $y = ax + b$ ) est adapté et les points sont alignés sur la droite de régression.

- Significativité de la régression (test de Fisher)

$H_0$  : il n'y a pas de régression, les variables X et Y sont indépendantes

$$F^{\circ}_{(0,05;1;13)} = 4,67$$

Un test de Fisher est réalisé sur l'ensemble des mesures afin de tester l'hypothèse nulle  $H_0$ . L'objectif est d'être conforme au critère d'acceptation  $F_1 > F^{\circ}$ . Ici,  $F_1 = 9037,53$ , par conséquent l'hypothèse nulle  $H_0$  est rejetée au seuil de significativité  $\alpha$ , les variables X et Y sont corrélées entre elles. Il y a donc une régression significative. Lorsque la concentration change, le signal change de manière significative ce qui met bien en évidence une relation concentration/volume équivalent. Le deuxième paramètre de linéarité est conforme.

- Comparaison de la pente avec zéro (test de Student)

$$H_0 : a = 0$$

$$t^{\circ}_{(0,05;13)} = 2,160$$

Un test de Student est effectué sur les mesures de la gamme SA seule afin de tester l'hypothèse nulle  $H_0$ . L'objectif est d'être conforme au critère d'acceptation  $t_a > t^{\circ}$ . Comme  $t_a$

= **95,066** > 2,160, l'hypothèse nulle  $H_0$  est rejetée au seuil de significativité  $\alpha$ . La pente  $a$  est statistiquement différente de 0. Le troisième paramètre de linéarité est conforme.

- Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro (test de Student)

$$H_0 : b = 0$$

$$t^\circ_{(0,05;13)} = 2,160$$

Le quatrième paramètre pour l'étude de la linéarité consiste à démontrer que l'ordonnée à l'origine  $b$  est égale à 0. Pour cela, un test de Student est effectué, comme pour la comparaison de la pente avec zéro. À l'inverse, le critère d'acceptation est le suivant :  $-t^\circ < t_b < t^\circ$ . Ici,  $t_b = -0,717$ , il est bien compris entre les bornes  $]-2,160 ; 2,160[$ . L'hypothèse nulle  $H_0$  est acceptée au seuil de significativité  $\alpha$ . L'ordonnée à l'origine  $b$  n'est pas statistiquement différente de 0. Cette dernière affirmation confirme le fait que la méthode est spécifique.

- Test du manque d'ajustement linéaire (test de Fisher)

$$H_0 : Var_{Lin} = Var_{ep} ; \text{il n'y a pas d'écart significatif à la linéarité}$$

$$F^\circ_{(0,05;3;10)} = 3,71$$

Enfin, le dernier paramètre à considérer est l'ajustement linéaire. Il s'étudie selon un test de Fisher, l'objectif étant d'être conforme au critère d'acceptation  $F_2 < F^\circ$ . Au vu du résultat du test de Fisher ( $F_2 = 1,83$ ), au seuil de significativité  $\alpha = 5\%$ , il n'y a pas d'écart significatif à la linéarité de la régression et l'ajustement par une droite est valide. En effet, ce test a pour objet de comparer la variation des  $Y$  en fonction de  $X$  à un modèle théorique de nature linéaire, autrement dit de vérifier que la tendance observée entre  $X$  et  $Y$  s'ajuste avec un modèle théorique linéaire.

En définitive, l'ensemble des paramètres sont conformes vis-à-vis de leur critère d'acceptation respectif. Ainsi, on peut conclure que la gamme SA seule est linéaire. Les résultats obtenus sont résumés au tableau 16.

Tableau 16 - Résultats de l'étude statistique de la linéarité sur la gamme SA seule

Paramètre	Tests	Critères d'acceptation	Résultats	Conformité	
				oui	non
Linéarité SA seule	Coefficient de détermination	$R^2 > 0,990$	0,9986	<b>X</b>	
	Significativité de la pente	$F_1 > F^\circ = 4,67$	9037,53	<b>X</b>	
	Pente différente de 0	$t_a > t^\circ = 2,160$	95,066	<b>X</b>	
	Ordonnée à l'origine égale à 0	$-t^\circ < t_b < t^\circ$ avec $t^\circ = 2,160$	- 0,717	<b>X</b>	
	Validité de la droite de régression	$F_2 < F^\circ = 3,71$	1,83	<b>X</b>	

L'approche expérimentale et le traitement statistique déployés sur la gamme SA seule sont appliqués de la même façon sur la gamme FR.

### 3.2.2 Gamme de la forme reconstituée

#### 3.2.2.1 Protocole

❖ *Préparation de la solution mère de la forme reconstituée : Matrice (SM Lactate de sodium 1)*  
Ladite solution est préparée dans une fiole jaugée de 500,0 mL, selon le protocole du tableau 17. Une fiole suffit pour les 3 jours de manipulation et à chaque fin d'utilisation, elle est stockée en chambre froide à 5°C.

Tableau 17 - Composition de la matrice (Gamme FR)

SM Lactate de sodium 1		
Composant	Quantité théorique	Masse pesée
Chlorure de sodium	/	/
Chlorure de potassium	/	/
Chlorure de calcium, 2H <sub>2</sub> O	/	/
Lactate de sodium	1,550 g	1,55048 g
EPPI	Qsp 500,0 mL	/

❖ *Préparation de 3 solutions mères de l'analyte seul (SM chlorures)*

De la même manière que pour la gamme SA seule, des solutions mères sont préparées. Les pesées pour la préparation de ces solutions ainsi que les dilutions pour la préparation des gammes de linéarité de la FR sont respectivement présentées dans les tableaux 18 et 19.

**Tableau 18 - Composition des solutions mères (Gamme FR)**

Voir annexe III – Détails des calculs (p98-99)

<b>SM chlorures – Gamme FR</b>				
<b>Composant</b>	<b>Quantité théorique</b>	<b>SM chlorures 4</b>	<b>SM chlorures 5</b>	<b>SM chlorures 6</b>
Chlorure de sodium	15,00 g	15,00093 g	15,00077 g	15,00040 g
Chlorure de potassium	1,00 g	1,00027 g	1,00045 g	0,99999 g
Chlorure de calcium, 2H <sub>2</sub> O	0,670 g	0,67036 g	0,66988 g	0,67007 g
Lactate de sodium	/	/	/	/
EPPI	Qsp 100,0 mL			
Concentration exacte (mmol/L)		2792,18	2792,12	2792,02

❖ *Préparation des 3 gammes de linéarité allant de 80% à 120% en chlorures*

**Tableau 19 - Préparation des gammes de la FR**

<b>Protocole de préparation des 3 gammes</b>				<b>Concentration exacte (mmol/L)</b>		
<b>Point de gamme</b>	<b>SM chlorures</b>	<b>SM Lactate de sodium 1</b>	<b>Concentration théorique</b>	<b>Gamme 1</b>	<b>Gamme 2</b>	<b>Gamme 3</b>
80%	0,8 mL	Qsp 25,0 mL	89,344 mmol/L	89,350	89,348	89,345
90%	0,9 mL		100,512 mmol/L	100,518	100,517	100,513
100%	1,0 mL		111,68 mmol/L	111,687	111,685	111,681
110%	1,1 mL		122,848 mmol/L	122,856	122,854	122,849
120%	1,2 mL		134,016 mmol/L	134,024	134,022	134,017

### 3.2.2.2 Résultats

De la même façon que précédemment, toutes les solutions ont été analysées au titrateur afin de déterminer le volume équivalent en fonction de la concentration exacte introduite en SA. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 20.

Tableau 20 - Volumes équivalents (Gamme FR)

Gamme	Points de gamme	Volume équivalent en mL
1	80%	4,465
	90%	5,054
	100%	5,629
	110%	6,213
	120%	6,706
2	80%	4,427
	90%	5,078
	100%	5,646
	110%	6,142
	120%	6,757
3	80%	4,454
	90%	5,016
	100%	5,610
	110%	6,190
	120%	6,763

### 3.2.2.3 Étude statistique

Voir annexe V : Linéarité gamme FR (p108-115)

La droite de régression obtenue pour l'étude de la linéarité sur la gamme de la FR a pour équation :  $y = 0,0512x - 0,109$ .

L'approche statistique est identique à celle appliquée à la gamme SA seule. Tous les résultats des essais étant conformes, les conclusions sont les mêmes. De ce fait, seuls les résultats sont présentés dans le tableau 21.

Tableau 21 - Résultats de l'étude statistique de la linéarité sur la gamme FR

Paramètre	Tests	Critères d'acceptation	Résultats	Conformité	
				oui	non
Linéarité FR	Coefficient de détermination	$R^2 > 0,990$	0,9989	<b>X</b>	
	Significativité de la pente	$F_3 > F^\circ = 4,67$	11944,93	<b>X</b>	
	Pente différente de 0	$t_a > t^\circ = 2,160$	109,293	<b>X</b>	
	Ordonnée à l'origine égale à 0	$-t^\circ < t_b < t^\circ$ avec $t^\circ = 2,160$	-2,063	<b>X</b>	
	Validité de la droite de régression	$F_4 < F^\circ = 3,71$	1,14	<b>X</b>	

Les droites de régression aussi bien pour la forme SA seule que pour la forme reconstituée sont conformes au paramètre de linéarité car l'ensemble des paramètres étudiés et des calculs statistiques répondent aux critères d'acceptation. Cela signifie que lorsque l'on modifie la concentration introduite en SA, le volume équivalent mesuré varie proportionnellement et de façon linéaire. Par conséquent, l'étude de comparaison des gammes a été réalisée.

### 3.3. COMPARAISON DES GAMMES

*Voir annexe VI : Comparaison des gammes (p116)*

Comparer les gammes revient à se demander si les deux droites de régression, celle de la gamme SA seule et celle de la gamme FR sont superposables. Pour cela, deux tests statistiques consistent à déterminer si les pentes ainsi que les ordonnées à l'origine sont statistiquement différentes ou non, l'objectif étant de ne trouver aucune différence entre les deux gammes.

- Comparaison des pentes (test de Student)

$$H_0 : a_{SA} = a_{FR}$$

$$t^{\circ}_{(0,05;26)} = 2,056$$

Un test de Student est réalisé pour comparer les deux pentes  $a_{SA}$  et  $a_{FR}$  afin de tester l'hypothèse nulle  $H_0$ . L'objectif est d'être conforme au critère d'acceptation  $t_{éch} < t^{\circ}$ . Puisque  $t_{éch} = \mathbf{0,614}$  ce qui est bien inférieur à la limite  $t^{\circ}$ , l'hypothèse  $H_0$  est acceptée au seuil de significativité  $\alpha$ ,  $a_{SA}$  et  $a_{FR}$  ne sont pas statistiquement différents. Il n'y a pas d'effet matrice.

- Comparaison des ordonnées à l'origine (test de Student)

$$H_0 : b_{SA} = b_{FR}$$

$$t^{\circ}_{(0,05;26)} = 2,056$$

De la même façon, un test de Student est effectué sur les ordonnées à l'origine  $b_{SA}$  et  $b_{FR}$  qui plus est avec un critère d'acceptation identique. Ici  $t_{éch} = \mathbf{0,822}$ , par conséquent l'hypothèse nulle  $H_0$  est acceptée au risque de significativité  $\alpha = 5\%$ ,  $b_{SA}$  et  $b_{FR}$  ne sont pas statistiquement différents. Il n'y a donc pas d'effet systématique.

Au vu des résultats et comme illustré sur la figure 11, les droites sont comparables entre les deux gammes. Comme les deux droites sont validées individuellement et qu'elles

sont statistiquement comparables il est possible de choisir qu'une seule gamme pour la suite de la validation. Habituellement, le choix se porte sur la gamme SA seule pour des raisons pratiques et financières (moins de pesées et de consommation en matières premières). Cependant, il a été choisi de continuer l'étude sur la FR pour deux raisons :

- Le but était de se rapprocher le plus possible de la forme pharmaceutique étudiée en routine. En effet, lorsqu'il faut rendre un résultat avant de libérer les lots sur le marché, les analyses sont faites sur la FR car il s'agit de la formulation qui sera administrée aux animaux.
- L'intervalle de mesure nécessite que la plage de concentrations présente un niveau de linéarité, d'exactitude et de fidélité suffisant. Or l'étude de la fidélité se faisant sur la FR [31], pour remplir la condition il semblait plus judicieux de déterminer l'exactitude à partir de la FR.

Toutefois, travailler sur la FR pour l'étude de l'exactitude n'est pas un choix inédit puisque certains chercheurs exploitent cette pratique [46]. De plus, les référentiels ICH Q2(R1) et VICH GL2 (ICH vétérinaire) proposent ce protocole dans le cadre de l'étude de l'exactitude du produit fini : « application de la procédure analytique aux mélanges synthétiques des composants du produit fini auxquels des quantités connues de la substance à analyser ont été ajoutées » [47].

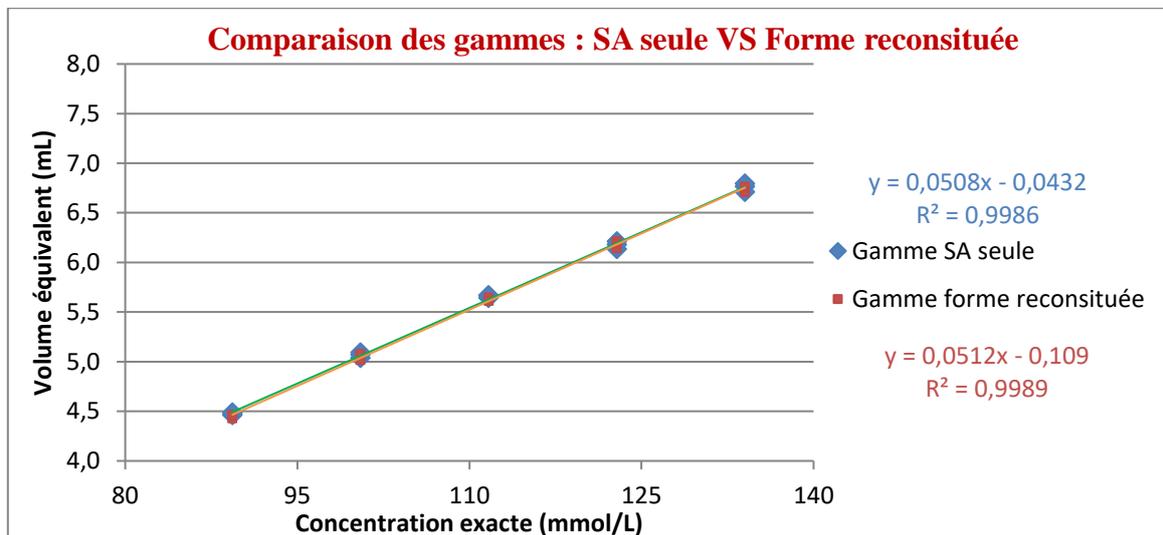


Figure 11- Graphique de comparaison des gammes SA seule VS FR

### 3.4. EXACTITUDE

Les recouvrements moyens ainsi que l'intervalle de confiance sur le recouvrement moyen total sont deux paramètres étudiés lors de l'exactitude. Les résultats obtenus lors de la linéarité sur la FR vont être exploités à ces fins.

#### 3.4.1 Résultats

*Voir annexe VII : Exactitude - gamme FR (p117-118)*

L'exactitude est déterminée par exploitation des données de linéarité sur la FR. À partir des volumes équivalents non transformés, il est possible de calculer, avec l'équation de la droite, la concentration théorique c'est-à-dire la concentration qui aurait dû être trouvée (appelée *concentration calculée*). Ainsi, les recouvrements sont établis selon la formule de l'équation 11. Les résultats des recouvrements exprimés en pourcentage sont regroupés dans le tableau 22.

*Tableau 22 - Recouvrements (Exactitude)*

Niveau de concentration	Gamme	Recouvrement (%)
80%	1	99,97
	2	99,14
	3	99,74
90%	1	100,31
	2	100,77
	3	99,57
100%	1	100,33
	2	100,63
	3	100,00
110%	1	100,49
	2	99,36
	3	100,13
120%	1	99,30
	2	100,04
	3	100,14

Individuellement, les recouvrements sont conformes car la limite acceptée pour chaque mesure est  $\%R = 100 \pm 5\%$  (soit de 95% à 105%).

### 3.4.2 Étude statistique

Voir annexe VII : Exactitude – gamme FR (p117-118)

- Homogénéité des variances (test de Cochran)

$H_0$  : les variances sont homogènes

$$C^\circ_{(0,05;5;3)} = 0,684$$

Pour étudier l'exactitude d'une méthode, il est indispensable en amont de s'assurer de l'homogénéité des variances entre les groupes (ici la notion de groupe correspond au niveau de concentration). De ce fait, un test de Cochran est réalisé, l'objectif étant d'être conforme au critère d'acceptation  $C_{\text{calc}} < C^\circ$  afin d'accepter l'hypothèse nulle. Comme  $C_{\text{calc}} = 0,308$  au risque de significativité de  $\alpha = 5\%$ , les variances intra-groupes sont homogènes (pas de rejet de  $H_0$ ).

Les tests suivants peuvent donc être effectués : test de validité des recouvrements moyens et détermination de l'intervalle de confiance.

- Test de validité des recouvrements moyens (test de Fisher)

$H_0$  : Les recouvrements moyens pour les différents niveaux de concentration sont identiques

$$F^\circ_{(0,05;4;10)} = 3,48$$

Pour déterminer si les variations observées entre les mesures sont dues uniquement aux erreurs expérimentales, un test de Fisher est utilisé pour s'assurer de la validité des recouvrements moyens (il s'agit de la moyenne des trois recouvrements par groupe soit par niveau de concentration). Comme  $F_5 = 1,03 < F^\circ$ , l'hypothèse nulle  $H_0$  est acceptée donc il est admis que les recouvrements moyens pour les différents niveaux sont identiques.

- Intervalle de confiance sur le recouvrement moyen total

Enfin, il est possible d'estimer l'intervalle de confiance sur le recouvrement moyen total (équation 14) pour statuer sur l'exactitude de la méthode. En effet, si cet intervalle comprend le recouvrement 100% ( $IRM_{\text{min}} \leq 100\% \leq IRM_{\text{max}}$ ) alors la méthode est exacte. Après calcul, le résultat est le suivant : [99,72 ; 100,27]. L'intervalle de confiance comprend la valeur 100%, la méthode est considérée comme exacte.

Compte tenu de la conformité de l'ensemble des paramètres aux critères d'acceptation, il est possible de conclure sur l'exactitude de la méthode selon l'étude statistique faite sur les mesures réalisées au cours de l'étude de la linéarité sur la FR (tableau 23).

Tableau 23 - Résultats de l'étude statistique de l'exactitude sur la gamme FR

Paramètre	Tests	Critères d'acceptation	Résultats	Conformité	
				oui	non
Exactitude sur la FR	Homogénéité des variances	$C_{\text{calc}} < C^{\circ} = 0,684$	0,308	<b>X</b>	
	Comparabilité des moyennes des groupes	$F_5 < F^{\circ} = 3,48$	1,03	<b>X</b>	
	Evaluation du biais selon l'intervalle de mesure	$IRM_{\text{min}} < 100\% < IRM_{\text{max}}$	$99,72 < 100\% < 100,27$	<b>X</b>	

### 3.5. FIDÉLITÉ

#### 3.5.1 Protocole

Des solutions correspondant au 100% de la FR sont préparées de la même façon que pour la gamme de linéarité de la FR. En parallèle, une solution de lactate de sodium est préparée et ce à raison d'une pour les 3 jours, soit une fiole jaugée de 200,0 mL puisque 3 x 50,0 mL sont nécessaires.

❖ *Préparation de la solution mère de la forme reconstituée : Matrice (SM<sub>Lactate de sodium 2</sub>)*

Le tableau 24 présente les pesées effectuées pour obtenir la solution matrice.

Tableau 24 - Composition de la matrice (Fidélité)

SM <sub>Lactate de sodium 2</sub>		
Composant	Quantité théorique	Masse pesée
Chlorure de sodium	/	/
Chlorure de potassium	/	/
Chlorure de calcium, 2H <sub>2</sub> O	/	/
Lactate de sodium	0,620 g	0,62053 g
Eau purifiée	Qsp 200,0 mL	/

❖ *Préparation de 3 solutions mères de l'analyte « seul » (SM<sub>chlorures</sub>)*

Le tableau 25 récapitule la préparation des solutions mères de chlorures, semblable à la préparation présentée au point 3.2.1.1.

**Tableau 25 - Composition des solutions mères (Fidélité)**

Voir annexe III – Détails des calculs (p98-99)

SM chlorures				
Composant	Quantité théorique	SM chlorures 7	SM chlorures 8	SM chlorures 9
Chlorure de sodium	15,00 g	14,99999 g	15,00053 g	14,99995 g
Chlorure de potassium	1,00 g	1,00017 g	1,00063 g	1,00054 g
Chlorure de calcium, 2H <sub>2</sub> O	0,670 g	0,67006 g	0,67069 g	0,67017 g
Lactate de sodium	/	/	/	/
Eau purifiée	Qsp 100,0 mL			
Concentration exacte (mmol/L)		2791,97	2792,21	2792,03

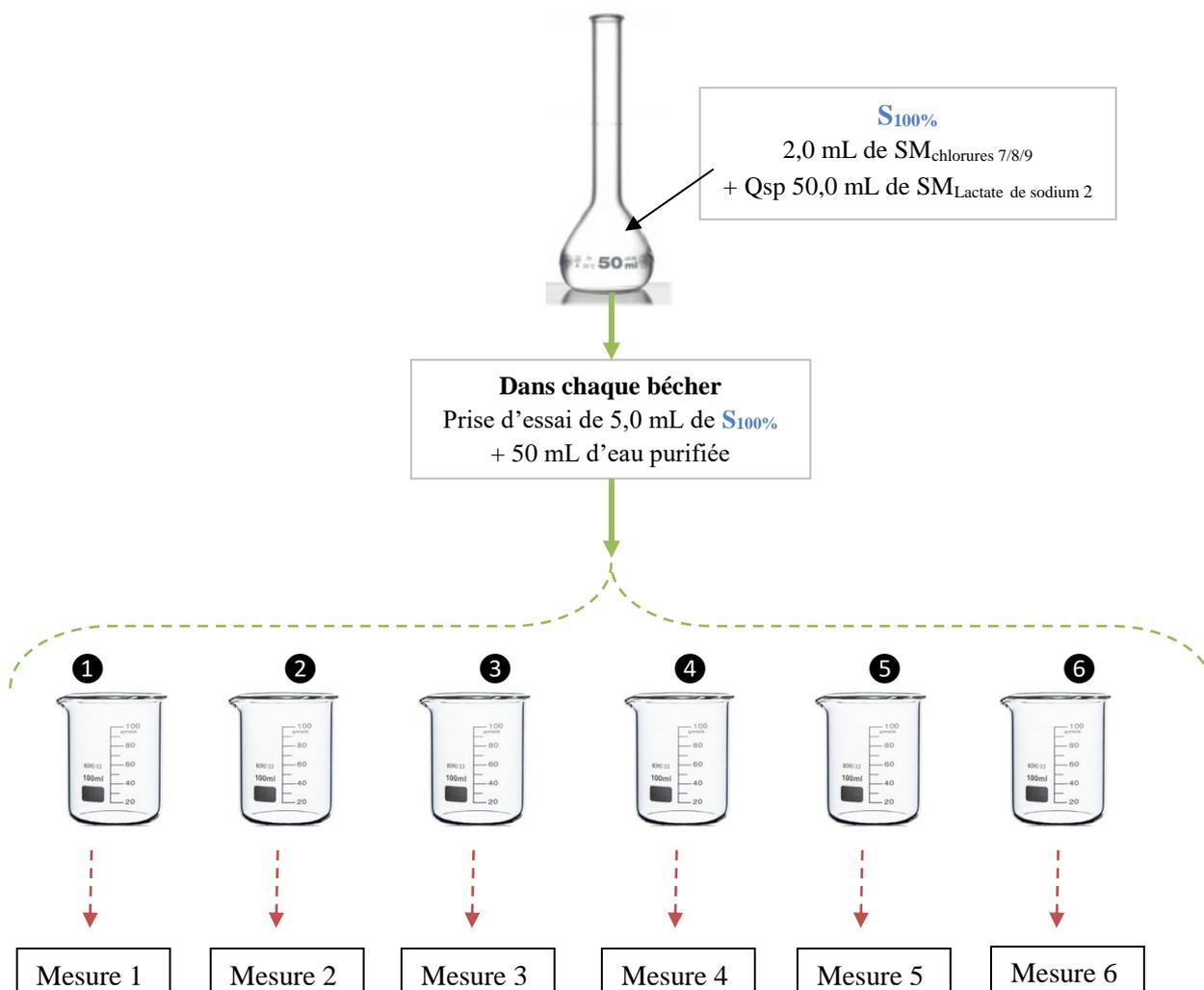
❖ *Préparation des 3 solutions correspondant au 100% de la forme reconstituée*

Pour passer de la solution mère à la solution à analyser une dilution est nécessaire, comme indiqué au tableau 26.

**Tableau 26 - Préparation du point 100% des 3 séries (Fidélité)**

Protocole de préparation des 3 solutions de fidélité				Concentration exacte (mmol/L)		
Point de gamme	SM chlorures	SM Lactate de sodium 2	Concentration théorique	Série 1 S1 <sub>100%</sub>	Série 2 S2 <sub>100%</sub>	Série 3 S3 <sub>100%</sub>
100%	2,0 mL	Qsp 50,0 mL	111,68 mmol/L	111,679	111,688	111,681

La figure 12 ci-dessous schématise le protocole de préparation des solutions nécessaires à l'étude de la fidélité. Chacune des solutions provient d'une dilution des solutions mères en chlorures (forme reconstituée). Puisque la fidélité s'étudie avec au moins 6 répétitions d'un même échantillon homogène et ce sur 3 séries, il fallait un volume suffisant à prélever, d'où des solutions à examiner réalisées dans des fioles jaugées de 50,0 mL. En effet, pour l'analyse au titrateur une prise d'essai de 5,0 mL est nécessaire or 6 prises d'essai devaient être effectuées sur une même solution donc le besoin minimum était de 30,0 mL. Enfin, chacune des prises d'essai est analysée par titrage argentimétrique et détermination potentiométrique, donnant pour chaque série 6 mesures.



*Figure 12 - Schéma du protocole pour l'étude de la fidélité*

### 3.5.2 Résultats

Trois séries de 6 répétitions chacune sont recommandées pour l'étude de la fidélité, ainsi les 18 solutions ont été analysées au titrateur permettant de recueillir les valeurs du signal mesuré nécessaires à l'étude statistique. Les volumes équivalents obtenus sont présentés dans le tableau 27.

**Tableau 27 - Volumes équivalents (Fidélité)**

<b>Volume équivalent en mL</b>			
<b>Échantillon</b>	<b>Série 1</b>	<b>Série 2</b>	<b>Série 3</b>
<b>1</b>	5,638	5,631	5,636
<b>2</b>	5,640	5,634	5,638
<b>3</b>	5,648	5,635	5,644
<b>4</b>	5,608	5,635	5,639
<b>5</b>	5,661	5,634	5,612
<b>6</b>	5,655	5,629	5,621

Pour comparer les données entre les différents groupes, il a été choisi de travailler à partir des recouvrements afin de considérer les différences de pesée. Comme l'illustre le tableau 28, il a fallu partir de la concentration exacte des solutions à analyser, déterminer leur volume équivalent théorique correspondant pour ensuite calculer les recouvrements.

**Tableau 28 - Recouvrements (Fidélité)**

*Voir annexe VIII : Fidélité – forme reconstituée (p119)*

	<b>Série 1</b>	<b>Série 2</b>	<b>Série 3</b>
<b>Concentration exacte (mmol/L)</b>	111,679	111,688	111,681
<b>Volume théorique (mL)</b>	5,595	5,596	5,595
<b>Échantillon</b>	<b>Recouvrement en %</b>		
<b>1</b>	100,769	100,625	100,733
<b>2</b>	100,804	100,679	100,769
<b>3</b>	100,947	100,697	100,876
<b>4</b>	100,232	100,697	100,786
<b>5</b>	101,180	100,679	100,304
<b>6</b>	101,072	100,590	100,465

### 3.5.3 Étude statistique

Voir annexe VIII : Fidélité – forme reconstituée (p119)

- Homogénéité des variances (test de Cochran)

$H_0$  : les variances sont homogènes

$$C^\circ_{(0,05; 3; 6)} = 0,708$$

Avant de calculer les coefficients de variation qui permettent de statuer sur la fidélité d'une méthode, une étape préliminaire est requise. Il s'agit de la vérification de l'homogénéité des variances entre les 3 séries de mesures, évaluée par un test de Cochran. De manière similaire à l'étude de l'exactitude, le critère d'acceptation est  $C_{\text{calc}} < C^\circ$ . Ici,  $C_{\text{calc}} = 0,686$  par conséquent au risque de significativité de  $\alpha = 5\%$ , les variances sont homogènes.

- Calcul des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire

La répétabilité s'évalue grâce au calcul du CV de répétabilité CV<sub>r</sub>. Pour que la méthode soit considérée répétable, CV<sub>r</sub> doit être inférieur ou égal à **1%** (critère interne). Dans le cadre de la validation analytique du Ringer Lactate Vetoflex<sup>®</sup>, **CV<sub>r</sub> = 0,231%** ainsi la méthode est répétable.

La fidélité intermédiaire, de la même façon se détermine en fonction du CV de fidélité intermédiaire CV<sub>R</sub>. Le critère d'acceptation interne est fixé à 5%. Le résultat obtenu est **CV<sub>R</sub> = 0,234 %** c'est pourquoi la méthode est considérée comme fidèle puisque **CV<sub>R</sub> ≤ 5%**.

En définitive, le critère de validation « fidélité » est respecté puisque les trois paramètres statistiques répondent favorablement aux tests, c'est-à-dire que la conformité aux critères d'acceptation est prouvée. Le tableau 29 recense les résultats obtenus.

Tableau 29 - Résultats de l'étude statistique de la fidélité sur la gamme FR

Paramètre	Tests	Critères d'acceptation	Résultats	Conformité	
				oui	non
Fidélité sur la FR	Homogénéité des variances	$C_{\text{calc}} < C^\circ = 0,708$	0,686	<b>X</b>	
	CV <sub>r</sub>	≤ 1 %	0,231 %	<b>X</b>	
	CV <sub>R</sub>	≤ 5 %	0,234 %	<b>X</b>	

### 3.6. INTERVALLE DE MESURE

L'intervalle de mesure est de **[89,348 mmol/L ; 134,021 mmol/L]** et il correspond à l'intervalle entre la plus faible et la plus forte concentration d'analyte dans l'échantillon pour lequel il a été démontré un niveau approprié de linéarité, d'exactitude et de fidélité.

Cet intervalle est déterminé expérimentalement puisque les 2 bornes de concentration correspondent aux concentrations exactes définies selon les pesées de la gamme sur la FR (données transformées pour avoir la même concentration à chaque niveau).

Autrement dit, l'intervalle de mesure équivaut à :

- Niveau de concentration bas 80% (89,348 mmol/L)
- Niveau de concentration haut 120% (134,021 mmol/L)

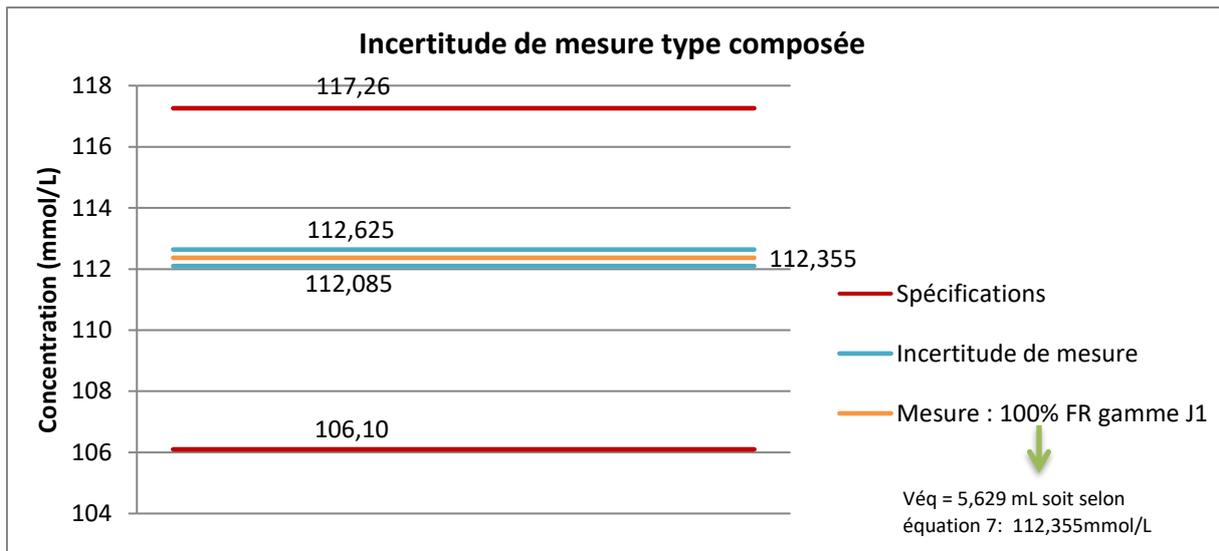
### 3.7. INCERTITUDE DE MESURE

*Voir annexe IX : Incertitude de mesure (p120)*

Après l'étude statistique menée sur les résultats de fidélité, l'incertitude de mesure calculée équivaut à :

- Incertitude type composée : **0,27 mmol/L**
- Incertitude élargie : **0,57 mmol/L**

La prise en compte de l'incertitude du résultat reportable d'une méthode de mesure a pour objectif de s'assurer de la conformité du produit aux spécifications. Dans notre cas, si on obtient un résultat  $x$ , alors selon son **incertitude type composée**, la valeur vraie correspond à  $x \pm 0,27$  mmol/L, comme l'illustre la figure 13.



*Figure 13 - Représentation graphique de l'incertitude de mesure type-composée*

D'autre part, **l'incertitude élargie** signifie autre chose. Il s'agit de donner une mesure de l'incertitude qui définit, autour du résultat de mesure, un intervalle à l'intérieur duquel on puisse espérer voir se situer une large fraction (ici 95% des résultats) de la distribution des valeurs qui pourraient être raisonnablement attribuées à la mesure. Cela veut dire par exemple que si  $x$  est le résultat de la mesure, alors la valeur vraie ou conventionnellement vraie, a 95% de chance de se trouver dans l'intervalle de confiance  $x \pm 0,57$  mmol/L.

#### 4. STATUT DE LA MÉTHODE : VALIDÉE OU NON VALIDÉE ?

Les critères de validation fournissent des résultats conformes aux critères d'acceptation. En effet, « la validation d'une méthode d'analyse correspond à une reconnaissance de son aptitude à satisfaire l'usage attendu en routine ; elle s'effectue en confrontant des valeurs observées de ses caractéristiques de performance avec les valeurs des critères de validation pour les conditions dans lesquelles la méthode est utilisée » [42]. La droite de la FR est linéaire, exacte et fidèle. Ainsi, la méthode de dosage par potentiométrie des ions chlorures contenus dans le Ringer Lactate Vetoflex® est validée, de ce fait, son utilisation en routine est confirmée.

## 5. DISCUSSION AUTOUR DE LA VALIDATION DE MÉTHODE

Lors d'une validation de méthode analytique beaucoup de paramètres sont à considérer.

### 5.1. LES ERREURS DE MANIPULATION

#### 5.1.1 Les erreurs théoriques

L'un des premiers points est l'**accumulation éventuelle des erreurs de manipulation** qui impacte la qualité des résultats. Parmi elles, il existe les erreurs de dilution (pipetage, trait de jauge, ...), les erreurs de volume (prise d'essai de 5,0 mL à la pipette jaugée), ... Ces erreurs, sources d'incertitude, s'expliquent par deux grands facteurs :

- L'imprécision humaine
- L'incertitude matérielle

L'**imprécision humaine** se résume à une mauvaise manipulation. Cependant, ce problème se résout facilement par la formation du personnel, en particulier par la lecture de procédure et la pratique par compagnonnage.

L'**incertitude matérielle** s'explique par le fait que tout type de verrerie dispose d'une incertitude. Par exemple, pour une pipette jaugée de 25,0 mL de la marque BRAND (figure 14) l'incertitude est de  $\pm 0,03$  mL. Cette incertitude est d'autant plus importante que la verrerie utilisée est nombreuse puisque cela est également vrai pour les béchers, fioles jaugées... Pour cette raison, il semblait indispensable de prêter attention à cette notion et de calculer l'incertitude de mesure liée à la méthode.



Figure 14 - Exemple d'incertitude de la verrerie de laboratoire [48]

### 5.1.2 Les erreurs pratiques

La validation du dosage des chlorures présente une erreur dans son protocole de réalisation et plus spécifiquement au niveau de l'étape de pesée. En effet, le Ringer Lactate Vetoflex<sup>®</sup> contient dans sa formule du **lactate de sodium pur** à raison de 0,310g pour 100,0 mL de solution. Cependant, la MP utilisée est du **lactate de sodium 60%** ce qui signifie que pour une même pesée il y a moins de SA que pour du lactate de sodium pur. Pourtant, lors des pesées, ce critère n'a pas été pris en compte pour compenser l'hydratation de la MP et 0,310g a été pesé au lieu de 0,517g. L'impact de cette erreur est amoindri dans la mesure où l'erreur de pesée touche non pas la SA qui fait l'objet de la validation mais un composant de la matrice qui selon l'étude de la spécificité n'interfère pas dans la mesure.

Afin de s'assurer que cette différence de pesée n'a pas d'impact, une nouvelle étude de la spécificité a été réalisée, cette fois-ci en prenant en compte le degré de pureté de la MP. Le même protocole a été utilisé si ce n'est qu'au lieu de peser 0,310g, 0,51749g de lactate de sodium 60% a été pesé. À 17,3120 mL de réactif titrant ajouté à la solution à examiner, aucune réaction n'a eu lieu, aucun volume équivalent n'a été déterminé ce qui confirme qu'il n'y a pas de chlorures susceptibles de fournir un signal dans la solution, par conséquent la spécificité est de nouveau démontrée.

## 5.2. LE CHOIX DU GUIDE DE VALIDATION

Le deuxième élément qui mérite réflexion est le choix du type de validation : **comment choisir une validation selon le guide SFSTP 1992 ou selon le profil d'exactitude ?** Dans le cadre de cette étude, la validation selon le guide SFSTP 1992 a été

choisie puisque c'est le *guideline* de référence déployé sur l'ensemble des validations du laboratoire de contrôle qualité. En 1992, il s'agissait du premier guide visant à harmoniser la démarche de validation des procédures analytiques quantitatives ce qui explique que cette méthode soit connue de tous et largement répandue. À l'inverse, le profil d'exactitude est apparu entre 2003 et 2006 et même si cela fait plus de dix ans aujourd'hui, cette seconde méthode reste moins utilisée car encore trop méconnue. Pourtant, elle aurait peut-être permis de valider la méthode de dosage des ions chlorures du premier coup. En effet, les essais ont été réalisés à deux reprises concernant la gamme sur la FR et la fidélité. Dans le premier cas, le test sur l'ordonné à l'origine n'était pas conforme ( $t_b = -3,09 < -t^\circ = -2,16$ ). Dans le second cas, avec des variances très faibles de l'ordre de  $10^{-6}$  à  $10^{-4}$ , le test d'homogénéité des variances de Cochran ne passait pas ( $C_{éch} = 0,895 > C^\circ = 0,708$ ) pourtant les calculs des CV étaient très satisfaisants.

Ces deux problèmes n'ont pas été considérés comme une faiblesse de la méthode mais plutôt comme une limite de la validation selon le guide SFSTP 1992. En effet, le STP PHARMA PRATIQUES – volume 13 n°3 mai/juin 2003 donne un nouveau sens à l'objectif d'une procédure analytique qui consiste non pas à démontrer qu'un paramètre est inférieur ou supérieur à une limite x % mais que la différence entre un résultat et la valeur vraie doit être inférieure à une limite d'acceptation [33]. Ce guide souligne des inconvénients de la démarche de 1992 « Il ressort des commentaires reçus que le premier guide (SFSTP 92), exclusivement dédié aux spécialités pharmaceutiques, présente des faiblesses par rapport à l'objectif visé. Par exemple, l'analyste peut être pénalisé s'il a développé une procédure trop fidèle, en d'autres termes si la dispersion de ses résultats est trop faible ». De même, plus loin dans le texte, il y a « La procédure 4 présente pour sa part un biais égal à celui de la procédure 1 (7%) et une dispersion des mesures environ quatre fois supérieure à celle-ci, mais est par contre considérée comme valide. Ces deux dernières contradictions peuvent s'expliquer comme suit : plus la variance de la procédure est grande, c'est-à-dire plus la fidélité est mauvaise, plus l'intervalle des valeurs attendues est large et, par conséquent, plus il y a de chances que cet intervalle recouvre le 100% » et l'inverse est vrai. Il est également dit dans ce guide que le recours à l'hypothèse nulle notamment dans le test de l'ordonnée à l'origine est utilisé à mauvais escient et que de manière générale moins la méthode est fidèle plus les tests statistiques ont de chance d'être valides.

Cette comparaison des deux guides est souvent étudiée. Par exemple, Siavelis souligne dans sa thèse le fait que, bien que le guide de 1992 soit très complet, les tests statistiques sont

complexes et en cas de conditions de calcul non remplies aucune alternative n'est proposée hormis de recommencer intégralement la procédure de validation puisqu'il suffit d'une seule condition non remplie pour invalider la méthode [49].

Pour toutes ces raisons, il aurait été judicieux d'effectuer une validation selon le profil d'exactitude pour voir si les tests bloquant au départ selon le guide SFSTP 1992 l'étaient aussi avec cette seconde méthode. Malheureusement, pour réaliser ce type de validation il faut, dans le cadre d'une méthode de dosage direct par potentiométrie, au minimum 3 niveaux de standards de validation avec la matrice (niveaux bas - 80%, médian - 100%, haut - 120%) avec 3 séries de 3 répétitions par niveau (soit au total  $3 \times 3 \times 3 = 27$  essais), comme le montre le tableau 30.

*Tableau 30 - Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi (selon STP PHARMA PRATIQUES - volume 13 - N°3 - mai/juin 2003)*

Standards	Niveau de concentration	Protocole				
		V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	V <sub>3</sub>	V <sub>4</sub>	V <sub>5</sub>
SE. Etalonnage sans la matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	2	2	2	-
	Haut	2	2	2	2	
SE. Etalonnage avec la matrice	Bas				2	2
	Médian			2	2	2
	Haut	-	-	2	2	2
	Addit.					2
SV. Validation avec la matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nombre minimum de séries	3	3	3	3	3	3
Nombre total essais (min.)	33	33	45	39	63	45

Or dans le cadre d'une validation selon le guide SFSTP 1992, sur la gamme reconstituée 3 séries de mesures sont réalisées à raison d'une par jour sur 5 niveaux (80% à 120%) sans répétition (soit au total  $3 \times 5 = 15$  essais et  $3 \times 3 = 9$  essais si on considère uniquement les

niveaux bas, médian et haut). Ainsi les résultats obtenus sont insuffisants pour envisager une validation par profil d'exactitude. Par conséquent, les essais non concluants ont été effectués une seconde fois selon le guide SFSTP 1992 puisqu'une partie des tests était conforme et qu'il s'agit de la méthode communément employée dans les laboratoires ; ces tests ont permis de démontrer la spécificité de la méthode et sa fidélité.

### 5.3. LA REVALIDATION

D'autre part, bien que la méthode soit à présent validée, il convient de mentionner la nécessité de prévoir dans le PDV la **revalidation** de cette dernière car c'est une exigence réglementaire mentionnée dans la ligne directrice 15 des BPF et l'ICH Q2(R1). De manière générale, tout procédé doit être maintenu sous contrôle par sa vérification continue. Pour cette raison, le PDV doit définir dans son planning une échéance de revalidation de la méthode d'analyse à minima. En cas de changements (perturbation de l'environnement, changement d'équipement, ...) cette fréquence de revalidation peut être diminuée. Pour bien comprendre le cheminement d'une méthode d'analyse, son **cycle de vie** est présenté en figure 15 :

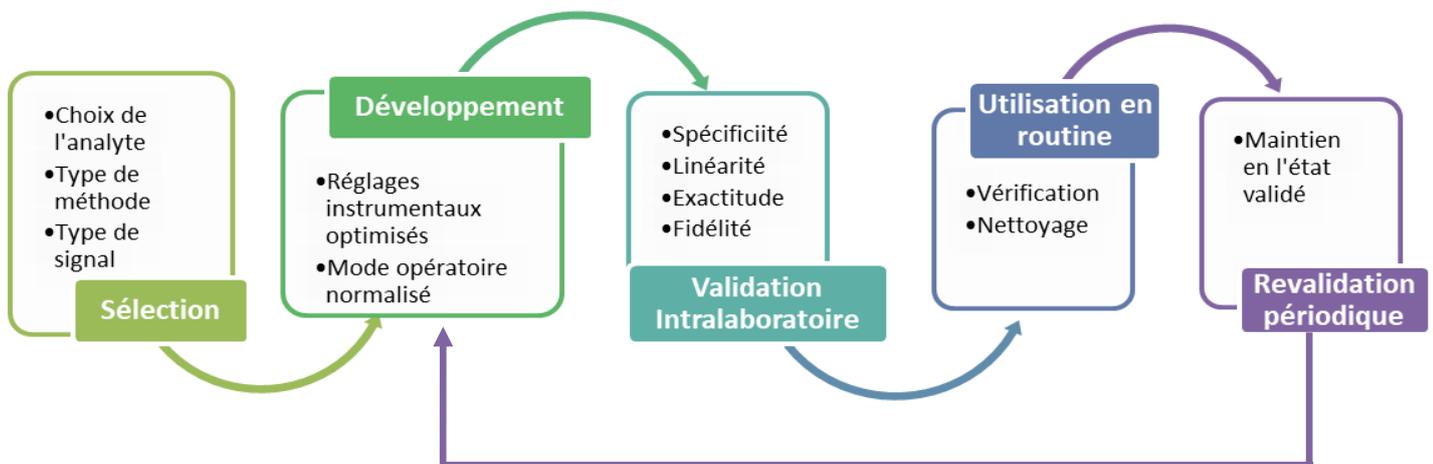


Figure 15 - Cycle de vie d'une méthode d'analyse

Le cycle de vie d'une méthode est composé de 5 étapes :

- **Sélection** : suite à un besoin client, un problème analytique est posé avec une matrice définie et des spécifications techniques propres. Ainsi, il faut s'interroger sur des questions de type : choix de la méthode ? du signal mesuré ?
- **Développement** : cette étape correspond aux moyens et procédures mis en place avant la réalisation des essais, autrement dit c'est la fixation des paramètres d'étude. Cela

passé également par une phase d'optimisation afin de trouver les réglages instrumentaux favorables à la méthode.

- **Validation intra-laboratoire** : il s'agit de l'étude statistique suite aux expérimentations permettant de répondre à la problématique.
- **Utilisation en routine** : si les résultats de validation sont conformes aux spécifications alors la méthode peut être utilisée en routine, sans oublier les vérifications et nettoyages périodiques des équipements par exemple.
- **Revalidation périodique** : si une modification significative survient, si un paramètre de la méthode est changé, il faut procéder à une revalidation de la méthode pour s'assurer du maintien de son efficacité, à savoir fournir des résultats utiles, fiables, interprétables permettant de répondre au problème analytique demandé par le client.

Par conséquent, l'utilisation en routine d'une méthode marque la fin de sa validation analytique bien que celle-ci doit être perpétuellement vérifiée et potentiellement renouvelée pour assurer le maintien de son aptitude à répondre aux besoins auxquels la méthode est destinée en cas de changements ou problèmes rencontrés (*voir Chapitre I : Mise en place d'un plan directeur de validation*).

Enfin, il ne faut pas oublier, comme l'évoque une commission SFSTP, qu'il existe de nombreux référentiels relatifs à la validation analytique et que parfois un même terme peut cacher des définitions relativement différentes (exemple : exactitude / justesse) et qu'il serait plus judicieux d'adopter une terminologie commune ou au minimum de définir clairement les termes employés au cours des validations pour qu'il n'y ait aucune interprétation subjective [42].

## Conclusion

---

Pour conclure, cette thèse démontre l'importance du contrôle et de l'assurance qualité au sein de l'industrie pharmaceutique et leur rôle majeur dans la mise sur le marché du Ringer Lactate Vetoflex®.

L'exercice de la qualité est indispensable au bon déroulement du cycle de vie d'un médicament et fait intervenir de nombreuses activités ayant toutes pour objectif de garantir aussi bien la qualité (conformité) du produit fini que la sécurité des animaux. Parmi ces activités, la qualification des équipements d'un laboratoire et la validation des méthodes utilisées pour contrôler la qualité des éléments constitutifs d'un médicament (MP, ADC primaire, SF, PF) représentent deux moyens d'assurer des résultats de mesures fiables, exactes permettant de statuer sur la conformité des médicaments vis-à-vis de spécifications.

De nombreux documents (référentiel, guide, norme) aident les industriels dans ces domaines. Le guide des BPF, d'application obligatoire pour un fabricant pharmaceutique, expose dans son annexe 15 la nécessité d'élaborer un plan directeur de validation. Un tel document a pour but d'établir un état des lieux et une planification de toutes les activités de qualification et de validation. Sa construction reste très libre puisque seules les BPF mentionnent les points à aborder mais en aucun cas ne propose une pratique commune. Grâce au PDV, il est plus facile pour un laboratoire de gérer ses activités de qualification et de validation.

La qualification des équipements est réglementairement obligatoire. Elle se déroule en 4 étapes : QC, QI, QO et QP. Chacune vise à prouver que l'équipement module par module puis dans son ensemble fonctionne correctement et permet de fournir des résultats fiables et reproductibles. Pour qualifier les équipements, plusieurs supports sont utiles : les recommandations du fabricant, les annexes de l'EDQM, des guides techniques... Il faut prouver de manière documentée qu'un équipement répond aux exigences du cahier des charges et cela passe par une vérification visuelle, documentaire et technique de l'instrument. De plus, cette étape est un prérequis à la validation.

Enfin, la validation des méthodes de contrôle en CQ est essentielle pour démontrer l'aptitude et la fiabilité des méthodes à obtenir les résultats escomptés et donc prouver que la procédure analytique est appropriée à l'usage auquel elle est destinée.

Dans cette thèse, la validation analytique d'un dosage est proposée : il s'agit de la quantification des chlorures par argentimétrie et détection potentiométrique. Les critères de validation qui ont été étudiés sont ceux exigés par l'ICH Q2(R1) à savoir, à minima : la spécificité, la linéarité, l'exactitude et la fidélité. Le choix de la stratégie de mise en œuvre des essais et de traitement statistique des données s'est porté sur les recommandations établies par la SFSTP dans le *guideline* 1992.

La spécificité s'étudie par la réalisation d'un blanc matrice et l'objectif est de montrer l'absence de réaction, c'est-à-dire que l'instrument ne fournit aucun signal. La linéarité s'évalue sur 2 gammes (SA seule et FR), chacune avec 3 séries de 5 mesures, couvrant un intervalle de concentration allant de 80% à 120% de la valeur cible, et ce à raison d'une gamme par jour, grâce à des dilutions de solutions mères. Pour définir si une méthode est linéaire ou non, il faut répondre à 5 critères statistiques. Si c'est le cas, alors les gammes peuvent être comparées entre elles pour déterminer un potentiel effet matrice ou systématique. Puis l'exactitude est calculée au moyen de recouvrements grâce aux résultats issus de l'étude de la linéarité sur la FR. Enfin, la fidélité s'évalue également sur la FR en effectuant 3 séries de 6 mesures d'échantillons homogènes avec une série par jour.

À l'issue des essais, la méthode de dosage des chlorures est considérée comme validée car le traitement statistique démontre qu'elle est spécifique, linéaire, exacte et fidèle. Cela signifie que cette quantification peut être réalisée en routine par les techniciens du laboratoire.

En revanche, plusieurs difficultés sont survenues au cours de la validation statistique et cela peut s'expliquer par le choix du *guideline* 1992 comme référence à ces expériences. En effet, 2 critères de validation ont dû être évalués et testés à deux reprises : la linéarité de la FR (test de l'ordonnée à l'origine non conforme) et la fidélité (homogénéité des variances non conforme). Ce *guideline* est de plus en plus remis en question car il présente des limites : plus une procédure analytique est fidèle, plus il est difficile pour un analyste de valider la méthode ; le recours aux hypothèses nulles ne devrait pas servir de moyen de décision quant à la validité d'une méthode mais d'outil de diagnostic ; les calculs statistiques sont complexes et sans alternative en cas de résultat non conforme. C'est pourquoi, depuis 2003, un nouveau *guideline* existe et propose la validation des méthodes quantitatives selon le profil d'exactitude. Pour l'avenir, il serait intéressant de faire la validation de la méthode de dosage des chlorures dans le Ringer Lactate Vetoflex<sup>®</sup> selon ce deuxième *guideline* pour comparer les résultats et définir quelle stratégie fonctionne le mieux.

## Bibliographie

---

- [1] Ordre National des Pharmaciens, le Médicament, <http://www.ordre.pharmacien.fr/Le-pharmacien/Champs-d-activites/Le-medicament>
- [2] Gaganpreet Kaur et al, An overview: the role of process validation in pharmaceutical industry, International Research Journal of Pharmacy, 2012, 25-27
- [3] Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme (PIC/S): recommandations on validation master plan, installation and operational qualification, non-sterile process validation, cleaning validation, 2007
- [4] M. Raynaud, Validation du procédé de fabrication dans l'industrie pharmaceutique, appliquée aux formes solides orales (150 pages), Thèse d'exercice pour le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie, Limoges, 2011,
- [5] NF EN ISO 9001, Systèmes de management de la qualité – Exigences, 2015
- [6] C. Tinsson, Validation des procédés de fabrication : nouvelles réglementations FDA-EMA et application industrielle de la vérification en continu des procédés (113 pages), Thèse d'exercice pour le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie, Nantes, 2014, N°082
- [7] Kaur Harpreet et al, Pharmaceutical process validation: a review, Journal of Drug Delivery & Therapeutics, 2013, 189-194
- [8] Pharmacopée Européenne, édition 9.7, Prescriptions générales - Généralités
- [9] EDQM, Élaboration & Révision, (consultation Octobre 2018)  
<https://www.edqm.eu/fr/Elaboration-pharmacopee-europeenne-606.html>
- [10] Sur le site de l'ANSM - Fiche 1 : identification des matières premières à réception par proche infra-rouge, 16/04/2008, (consultation Octobre 2018)  
[https://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/e2afbe3487c713cc8a8fde41f28332a0.pdf](https://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/e2afbe3487c713cc8a8fde41f28332a0.pdf)
- [11] Complémentarités de la spectroscopie Infrarouge et Raman, Mathieu Jourdain Metrohm France, (consultation Octobre 2018)  
<https://www.lhybride.info/media/files/Compl%C3%A9mentarit%C3%A9s%20de%20la%20spectroscopie%20Infrarouge%20et%20Raman.pdf>

[12] ICH Harmonised Tripartite Guideline: Quality Risk Management Q9, Current Step 4 version, 2005

[13] Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, Guidance for Industry, 2015, Pharmaceutical Quality/CMC

[14] Méthodologie d'évaluation des risques professionnels, Centre de gestion de la fonction publique territoriale de la Sarthe, 2016  
[https://www.cdg72.fr/file\\_manager\\_download.php?id=862](https://www.cdg72.fr/file_manager_download.php?id=862)

[15] C. Emaillé, Qualification d'une ligne de conditionnement (148 pages), Thèse d'exercice pour le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie, Nantes, 2003,

[16] Livre blanc BINDER, Validation et qualification dans un environnement régulé, 2016

[17] Guides des Bonnes Pratiques de Fabrication (glossaire), 2017, disponible sur le site de l'ANSM  
[https://www.ansm.sante.fr/Activites/Elaboration-de-bonnes-pratiques/Bonnes-pratiques-de-fabrication-de-medicaments-a-usage-humain/\(offset\)/3](https://www.ansm.sante.fr/Activites/Elaboration-de-bonnes-pratiques/Bonnes-pratiques-de-fabrication-de-medicaments-a-usage-humain/(offset)/3)

[18] U.S. Pharmacopeia National Formulary – USP 39 NF 34, volume 1, 2016 : (1058) Analytical Instrument Qualification / General Information

[19] Annexe 15 : Qualification et Validation, guide des Bonnes Pratiques de Fabrication 2017 (voir référence 17)

[20] A. Daunizeau, Recommandations sur la métrologie et la maîtrise de la qualité des équipements critiques, Qualité et accréditation en biologie médicale - Ann Biol Clin 2013, volume 71 (Hors série n°1) : 235-256

[21] M. Dumontet et al, Recommandations pour la maîtrise métrologique des équipements de mesure au laboratoire d'analyses de biologie médicament (Document D), Culture qualité - Ann Biol Clin 2009, volume 67 (n°4) : 465-76,

[22] OMCL Network of Council of Europe, Quality Management Document PA/PH/OMLC (12) 77 7R, Qualification of equipment – ANNEX 8: Qualification of Balances

[23] OMCL Network of Council of Europe, Quality Assurance Document PA/PH/OMLC (09) 64 2R, Qualification of equipment – ANNEX 6: Qualification of Piston Pipettes

- [24] FDA Guidance for Industry Data Integrity and Compliance with cGMP, 2016
- [25] General European OMCL Network (GEON), Quality Management Document PA/PH/OMLC (08) 69 R7, Validation of Computerised Systems Core Document
- [26] NF EN ISO/CEI 17025, Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais, 2005
- [27] RCP du Ringer lactate Vetoflex<sup>®</sup>, site de l'ANSES, (consultation Mai 2018)  
<http://www.ircp.anmv.anses.fr/rcp.aspx?NomMedicament=RINGER+LACTATE+VETOFLEX>
- [28] Monographie Metrohm : électrodes en potentiométrie (8.015.5013), (consultation Juillet 2018), téléchargeable sur <https://www.metrohm.com/fr-ch/documents/80155013>,
- [29] Pharmacopée Européenne, édition 9.5 (consultation Mars 2018), Chapitres Généraux - Méthodes analytiques - Méthodes physiques et physico-chimiques : 2.2.20 Titrage potentiométrique
- [30] J. Caporal-Gautier et al, Guide de validation analytique : Rapport d'une commission de la SFSTP I. Méthodologie, STP PHARMA PRATIQUES – volume 2 – N°4 – 205:226 – 1992
- [31] E. Chapuzet et al, Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégies de validation – Rapport d'une commission, STP PHARMA PRATIQUES – volume 7 – N°3 – 169:194 – 1997
- [32] PH. Hubert et al, Validation des procédures analytiques quantitatives – Harmonisation des démarches, STP PHARMA PRATIQUES – volume 13 – N°3 – 101 :138– 2003
- [33] PH. Hubert et al, Validation des procédures analytiques quantitatives – Harmonisation des démarches Partie II Statistiques, STP PHARMA PRATIQUES – volume 16 – N°1 – 30:60– 2006
- [34] PH. Hubert et al, Validation des procédures analytiques quantitatives – Harmonisation des démarches Partie III Exemples d'application, STP PHARMA PRATIQUES – volume 16 – N°2 – 87:121– 2006
- [35] Source figure 5, (consultation Juillet 2018) :  
[https://www.mt.com/dam/Analytical/EasyPlus/pdf/Guide\\_ABC\\_of%20Easy\\_Titration\\_FR\\_low-res.pdf](https://www.mt.com/dam/Analytical/EasyPlus/pdf/Guide_ABC_of%20Easy_Titration_FR_low-res.pdf)
- [36] Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, rapport technique de l'IUPAC, 2002
- [37] The Fitness for Purpose of Analytical Method, guide EURACHEM, 2014 – 2<sup>e</sup> édition

[38] ICH Harmonised Tripartite Guideline : Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology Q2(R1), Current Step 4 version, 2005

[39] Wafa Bouaissi et al, Optimisation et validation d'une méthode de dosage par HPLC/DAD d'un antihypertenseur le zofenopril, Journal de la société chimique de Tunisie, 2013, 15, 39-50

[40] J.M. Roussel et al, Incertitude de mesure des méthodes analytiques dans le contrôle du médicament, STP PHARMA PRATIQUES – volume 27 – N°4 – 169-248 – 2017,.

[41] Source figure 7, Francesco Caruso et al, ICP-OES method for the characterization of cement pore solutions and their modification by polycarboxylate-based superplasticizers, Cement and Concrete Research 91 (2017) 52-60

[42] Source figure 8, ANSES/PR3/7/01, Guide de validation des méthodes d'analyse – version a, Octobre 2015, groupe de travail « GT Val 2 » coordonné par M. Laurentie

[43] J.M. Roussel, Existe-t-il un guide universel pour la validation des méthodes d'analyse ? STP PHARMA PRATIQUES – volume 15 – N°4 – 295:312 – 2005

[44] Pharmacopée Européenne, édition 9.5 (consultation Mars 2018), Monographie 0193 Sodium (Chlorure de)

[45] Groupe de travail « Accréditation » de la Société Française de Toxicologie Analytique, Aide à la validation des méthodes en Toxicologie et Suivi Thérapeutique Pharmacologique, Annales de Toxicologie Analytique, vol XVII, n°3, supplément 1, 2005

[46] O. Nicolas, Stratégie de validation de méthodes de dosage en bioanalyse en vue d'études pharmacocinétiques et toxicologiques, Annexe de toxicologie analytique, vol XVI, n°2, 2004

[47] VICH GL2, International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products, Validation of analytical procedures: methodology, implementation step 7, 1998

[48] Source figure 14, consultation Mai 2018 :  
<http://www.laboandco.com/pipette-jaugee-1-trait-10-ml-brand.html>

[49] A. Siavelis, Analyse des différentes approches de validation de méthode de dosage et proposition d'un guide de validation de méthode de dosage en pharmacie hospitalière (109 pages), Thèse d'exercice pour le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie, Angers, 2014

## Liste des annexes

---

Annexe I : Exemple de fiche de vie d'un équipement	p96
Annexe II : Matériels et matières premières nécessaires	p97
Annexe III : Détails des calculs	p98-99
Annexe IV : Linéarité – gamme SA seule	p100-107
Annexe V : Linéarité – gamme FR	p108-115
Annexe VI : Comparaison des gammes	p116
Annexe VII : Exactitude – gamme FR	p117-118
Annexe VIII : Fidélité – forme reconstituée	p119
Annexe IX : Incertitude de mesure	p120

*Annexe I : Exemple de fiche de vie d'un équipement*

**TYPE DE MATERIEL :** .....

<p><b>MATERIEL</b></p> <p>Fabricant : .....</p> <p>Modèle : .....</p> <p>Référence : .....</p> <p>Taille : .....</p> <p>Longueur : .....</p> <p>Diamètre : .....</p> <p>Signes distinctifs : .....</p> <p>.....</p>	<p><b>MARQUAGE</b></p> <p>Référence du marquage : .....</p> <p>.....</p> <p>Emplacement du marquage : .....</p> <p>.....</p> <p><b>DUREE DE VIE</b></p> <p>Date d'achat : .....</p> <p>Date de vie théorique : .....</p> <p>Date de mise au rebut : .....</p>
---	---

Référence classement de la notice du fabricant : .....

<b>CONTROLES COMPLETS</b>			
Date	Observations et résultats du contrôle : Maintenance, réparation, rebut	Nom du contrôleur	Signature

[https://club-montagne.net/fichier/DOCUMENT\\_62.pdf](https://club-montagne.net/fichier/DOCUMENT_62.pdf) (consultation Août 2018)

## Annexe II : Matériels et matières premières nécessaires

Equipement	Référence Interne
Titrateur Metrohm Titrino Plus 848	C557
Balance Mettler Toledo MS205MV	C569
Micropipette automatique Eppendorf 500-5000 µL	C476
Bain à ultrasons	C519

Verrerie	Volume (mL)
Fiole jaugée	25 ; 50 ; 100 ; 200 ; 500
Pipette jaugée	5
Bécher	100

### Petit matériel

Poire à pipeter	Aimant
Spatule	Cône Eppendorf
Papier ou nacelle de pesée	Pipette pasteur

Matières premières	Fournisseur	N° lot	Péremption
Chlorure de sodium	Gaches Chimie	507103	13/12/2020
Lactate de sodium 60%	Arnaud Azelis	1708003267	28/08/2022
Chlorure de calcium 2H <sub>2</sub> O	Gaches Chimie	C2562	19/02/2019
Chlorure de potassium	MERCK Chimie	K46837835	31/07/2020
Eau purifiée	<i>Composant Bioluz réf 13ZEAUPPI0</i>	NA	NA
Nitrate d'argent (AgNO <sub>3</sub> )	VWR	18B154115	13/02/2020

**Annexe III - Détails des calculs**

**1) Concentrations exactes lors de la préparation des solutions mères**

$$C \times V = n \text{ avec } n = \frac{m}{M} \rightarrow C \times V = \frac{m}{M} \rightarrow C = \frac{m}{M} \times \frac{1}{V}$$

Dans des fioles jaugées de 100,0 mL  $\rightarrow \frac{1}{V} = \frac{1}{100 \times 10^{-3}} = \frac{1}{0,1} = 10$

Au final :  $C = \frac{m}{M} \times 10$

SM Chlorures	Masse molaire de la Pharmacopée Européenne (g.mol <sup>-1</sup> )	Pesée (g)	Concentration (mmol/L)
1	CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O = 147,0	0,67042	91,2136 *
	KCl = 74,6	1,00020	134,0751
	NaCl = 58,44	14,99926	2566,6085
	Cc exacte SMchlorures1= 2791,90		
2	CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O = 147,0	0,67041	91,2122 *
	KCl = 74,6	1,00004	134,0536
	NaCl = 58,44	14,99944	2566,6393
	Cc exacte SMchlorures2= 2791,91		
3	CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O = 147,0	0,67011	91,1714 *
	KCl = 74,6	1,00023	134,0791
	NaCl = 58,44	14,99989	2566,7163
	Cc exacte SMchlorures3= 2791,97		
4	CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O = 147,0	0,67036	91,2054 *
	KCl = 74,6	1,00027	134,0845
	NaCl = 58,44	15,00093	2566,8943
	Cc exacte SMchlorures4= 2792,18		
5	CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O = 147,0	0,66988	91,1401 *
	KCl = 74,6	1,00045	134,1086
	NaCl = 58,44	15,00077	2566,8669

	Cc exacte <b>SMchlorures5</b> = 2792,12		
6	CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O = 147,0	0,67007	91,1660 *
	KCl = 74,6	0,99999	134,0469
	NaCl = 58,44	15,00040	2566,8036
	Cc exacte <b>SMchlorures6</b> = 2792,02		
7	CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O = 147,0	0,670006	91,1646 *
	KCl = 74,6	1,00017	134,0710
	NaCl = 58,44	14,99999	2566,7334
	Cc exacte <b>SMchlorures7</b> = 2791,97		
8	CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O = 147,0	0,67069	91,2503 *
	KCl = 74,6	1,00063	134,1327
	NaCl = 58,44	15,00053	2566,8258
	Cc exacte <b>SMchlorures8</b> = 2792,21		
9	CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O = 147,0	0,67017	91,1796 *
	KCl = 74,6	1,00054	134,1206
	NaCl = 58,44	14,99995	2566,7266
	Cc exacte <b>SMchlorures9</b> = 2792,03		

\* La concentration est multipliée par 2 car il y a deux chlores pour un calcium

## 2) Volume équivalent théorique

La concentration théorique du produit fini (équivalent à une concentration cible 100%) est de 111,680 mmol/L

$$\text{Chlorures totaux en mmol/L} : \frac{\text{Volume équivalent (mL)} * \text{Titre de la bouteille (mol/L)}}{\text{Prise d'essai(mL)}} * 1000$$

$$V_{\text{éq}} = \frac{\text{Chlorures totaux (mmol/L)} \times \text{Prise d'essai(mL)}}{\text{Titre de la bouteille} \left(\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right) \times 1000}$$

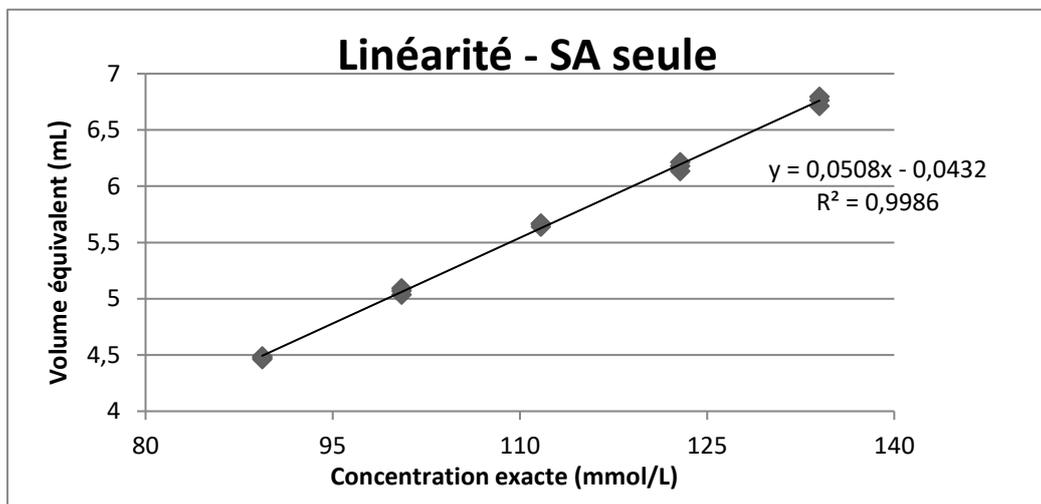
$$V_{\text{éq}} = \frac{111,680 \times 5,0}{0,09980 \times 1000} = 5,595 \text{ mL}$$

Ce calcul s'applique également à des concentrations autres que la concentration cible 100% théorique

*Annexe IV (1/5) – Linéarité gamme SA seule, données brutes*

Gamme	Points de gamme	Concentration exacte (mmol/L)	Volume éq (mL)
1	80%	89,341	4,489
	90%	100,508	5,093
	100%	111,676	5,664
	110%	122,844	6,135
	120%	134,011	6,712
2	80%	89,341	4,462
	90%	100,508	5,037
	100%	111,676	5,641
	110%	122,844	6,179
	120%	134,011	6,764
3	80%	89,343	4,478
	90%	100,511	5,071
	100%	111,679	5,669
	110%	122,847	6,213
	120%	134,015	6,795

Gamme	a	b	R <sup>2</sup>
1	0,0491	0,1306	0,9984
2	0,0515	-0,1294	0,9998
3	0,0517	-0,1307	0,9997



## RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Statistiques de la régression</i>	
Coefficient de détermination multiple	0,999281554
Coefficient de détermination R <sup>2</sup>	<b>0,998563624</b>
Coefficient de détermination R <sup>2</sup>	0,998453134
Erreur-type	0,03266772
Observations	15

## ANALYSE DE VARIANCE

	<i>Degré de liberté</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>
Régression	1	9,644699061	9,644699061	<b>9037,556428</b>
Résidus	13	0,013873339	0,00106718	
Total	14	9,6585724		

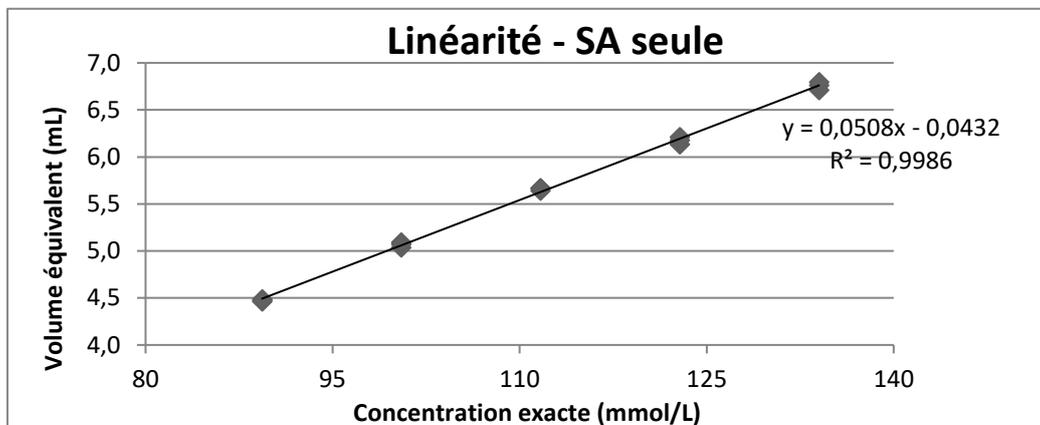
	<i>Coefficients</i>	<i>Erreur-type</i>	<i>Statistique t</i>	<i>Probabilité</i>
Constante	<b>-0,043191594</b>	0,060236124	<b>-0,717038078</b>	0,486034908
Variable X 1	<b>0,050771346</b>	0,000534064	<b>95,06606349</b>	7,22999E-20

Annexe IV (2/5) – Linéarité gamme SA seule, changement de variable

a= 0,050771346

		x	Xi	y	Yi
Niveau	Gamme	Concentration exacte (mmol/L)	concentration moyenne par niveau (mmol/L)	Volume éq (mL)	Changement de variable
80%	1	89,341	89,342	4,489	4,489
	2	89,341		4,462	4,462
	3	89,343		4,478	4,478
90%	1	100,508	100,509	5,093	5,093
	2	100,508		5,037	5,037
	3	100,511		5,071	5,071
100%	1	111,676	111,677	5,664	5,664
	2	111,676		5,641	5,641
	3	111,679		5,669	5,669
110%	1	122,844	122,845	6,135	6,135
	2	122,844		6,179	6,179
	3	122,847		6,213	6,213
120%	1	134,011	134,012	6,712	6,712
	2	134,011		6,764	6,764
	3	134,015		6,795	6,795

$$Y_i = y + \text{pente} \times (X_i - x)$$



RAPPORT DÉTAILLÉ

Statistiques de la régression	
Coefficient de détermination multiple	0,999281552
Coefficient de détermination R <sup>2</sup>	<b>0,99856362</b>
Coefficient de détermination R <sup>2</sup>	0,998453129
Erreur-type	0,03266772
Observations	15

ANALYSE DE VARIANCE

	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F
Régression	1	9,644667426	9,644667426	<b>9037,5268</b>
Résidus	13	0,013873339	0,00106718	
Total	14	9,658540766		

	Coefficients	Erreur-type	Statistique t	Probabilité
Constante	<b>-0,043182319</b>	0,060236124	<b>-0,716884099</b>	0,4861268
Variable X 1	<b>0,050771263</b>	0,000534064	<b>95,06590767</b>	7,23E-20

**Annexe IV (3/5) – Linéarité gamme SA seule – Validité droite de régression, données transformées**

	Concentration exacte (mmol/L)	Volume éq (mL)	Moyenne	SCE <sub>yij</sub>	a = 0,0508 b = -0,0432	
Niveau	Xi	Yi	Y	(Yi - Y) <sup>2</sup>	Yi*	(Yi - Yi*) <sup>2</sup>
80%	89,342	4,489	4,476	1,613E-04	4,493	1,436E-05
		4,462		2,045E-04	4,493	9,480E-04
		4,478		2,557E-06	4,493	2,218E-04
90%	100,509	5,093	5,067	6,786E-04	5,060	1,107E-03
		5,037		8,970E-04	5,060	5,169E-04
		5,071		1,520E-05	5,060	1,235E-04
100%	111,677	5,664	5,658	3,661E-05	5,627	1,388E-03
		5,641		2,873E-04	5,627	2,031E-04
		5,669		1,188E-04	5,627	1,772E-03
110%	122,845	6,135	6,176	1,650E-03	6,194	3,453E-03
		6,179		1,145E-05	6,194	2,179E-04
		6,213		1,386E-03	6,194	3,642E-04
120%	134,012	6,712	6,757	2,019E-03	6,761	2,373E-03
		6,764		4,995E-05	6,761	1,083E-05
		6,795		1,434E-03	6,761	1,162E-03
SCE <sub>erreur pure</sub> =				8,952E-03	SCE <sub>résiduelle</sub> =	1,387E-02

Origine de la fluctuation	SCE	Ddl	Var	Fobs (F2)
Résiduelle (rés) *	1,387E-02	N - 2 = 13	1,067E-03	
Erreur pure (ep)	8,952E-03	N - k = 10	8,952E-04	
Ecart à la linéarité (lin)	4,923E-03	k - 2 = 3	1,641E-03	<b>1,833</b>

**ANALYSE DE VARIANCE**

	Ddl	SCE	Var
Régression	1	9,6446674	9,6446674
Résidus	13	0,0138733	0,0010672

\* on aurait pu se servir de la valeur obtenue avec l'utilitaire d'analyse

N = 15 observations  
k = 5 niveaux

$$SCE_{résiduelle} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{ni=3} (y_{ij} - y_{ij}^*)^2$$

$$Var = \frac{SCE}{Ddl}$$

$$SCE_{err\ pure} = \sum_{i=1}^k (SCE_{y_{ij}}) = \sum_{i=1}^k (y_{ij} - Y)^2$$

$$F_{obs} = \frac{Var_{Lin}}{Var_{ep}}$$

$$SCE_{Lin} = SCE_{rés} - SCE_{ep}$$

*Annexe IV (4/5) – Linéarité gamme SA seule – Normalité des données, données transformées*

Niveaux	Gamme	Yi (Véq transformé)
80%	1	4,489
	2	4,462
	3	4,478
90%	1	5,093
	2	5,037
	3	5,071
100%	1	5,664
	2	5,641
	3	5,669
110%	1	6,135
	2	6,179
	3	6,213
120%	1	6,712
	2	6,764
	3	6,795

SCE <sub>yi</sub> = 9,659
b= 2,976

$$b = \sum d_i \times a_i \quad W_{obs} = \frac{b^2}{SCE_{yi}}$$

<b>Shapiro-wilk</b>					
	<b>Yi ordre décroissant</b>	<b>Yi ordre croissant</b>	<b>di</b>	<b>ai</b>	<b>di*ai</b>
1	6,795	4,462	2,333	0,515	1,201
2	6,764	4,478	2,286	0,331	0,756
3	6,712	4,489	2,223	0,250	0,555
4	6,213	5,037	1,176	0,188	0,221
5	6,179	5,071	1,108	0,135	0,150
6	6,135	5,093	1,042	0,088	0,092
7	5,669	5,641	0,028	0,043	0,001
8	5,664	5,664			
9	5,641	5,669			
10	5,093	6,135			
11	5,071	6,179			
12	5,037	6,213			
13	4,489	6,712			
14	4,478	6,764			
15	4,462	6,795			

n =	15
Asymétrie de Yule et Kendall (ou de Bowley)	-0,0684
Skewness $g_1$ (Asymétrie Pearson) =	-0,0328
Skewness $G_1$ (Asymétrie Fisher) =	-0,0366
sG1 =	0,580
$z(G_1)$	-0,063
$-2 < z(G_1) < 2$	Non rejet de $H_0$
Kurtosis $g_2$ (Applatissement pearson) =	-1,271
Kurtosis $G_2$ (Applatissement Fisher) =	-1,2860
sG2 =	1,121
$z(G_2)$	-1,1473
$-2 < z(G_2) < 2$	Non rejet de $H_0$

<b>Shapiro-Wilk :</b>	
$\alpha =$	5%
Wobs Shapiro-Wilk =	0,917
Wcrit Shapiro-wilk =	0,881
$W_{obs} > W_{crit}$	Non rejet de $H_0$

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>H_0: X \rightarrow \mathcal{N}(\mu; \sigma)</math> possible</li> <li>• <math>H_1: X \not\rightarrow \mathcal{N}(\mu; \sigma)</math></li> </ul> |
|---|

*Annexe IV (5/5) – Linéarité gamme SA seule – Normalité des résidus, données transformées*

Observation	Yi (Vég transformé)	Prévisions pour Yi	Résidus
1	4,489	4,493	-0,00377122
2	4,462	4,493	-0,03077122
3	4,478	4,493	-0,01487276
4	5,093	5,060	0,03326516
5	5,037	5,060	-0,02273484
6	5,071	5,060	0,01111285
7	5,664	5,627	0,03752077
8	5,641	5,627	0,01425077
9	5,669	5,627	0,04209846
10	6,135	6,194	-0,05876362
11	6,179	6,194	-0,01476362
12	6,213	6,194	0,01908407
13	6,712	6,761	-0,04872724
14	6,764	6,761	0,00327276
15	6,795	6,761	0,03406968

SCE <sub>yi</sub> = 0,014
b= 0,115

$$b = \sum d_i \times a_i \quad W_{obs} = \frac{b^2}{SCE_{yi}}$$

<b>Shapiro-wilk</b>					
	<b>Yi ordre décroissant</b>	<b>Yi ordre croissant</b>	<b>di</b>	<b>ai</b>	<b>di*ai</b>
1	0,04210	-0,05876	0,10086	0,51500	0,05194
2	0,03752	-0,04873	0,08625	0,33060	0,02851
3	0,03407	-0,03077	0,06484	0,24950	0,01618
4	0,03327	-0,02273	0,05600	0,18780	0,01052
5	0,01908	-0,01487	0,03396	0,13530	0,00459
6	0,01425	-0,01476	0,02901	0,08800	0,00255
7	0,01111	-0,00377	0,01488	0,04330	0,00064
8	0,00327	0,00327			
9	-0,00377	0,01111			
10	-0,01476	0,01425			
11	-0,01487	0,01908			
12	-0,02273	0,03327			
13	-0,03077	0,03407			
14	-0,04873	0,03752			
15	-0,05876	0,04210			

n =	15
<b>Asymétrie de Yule et Kendall (ou de Bowley)</b>	0,0183
Skewness $g_1$ (Asymétrie Pearson) =	-0,3589
Skewness $G_1$ (Asymétrie Fisher) =	-0,4001
sG1 =	0,580
$z(G_1)$	-0,690
<b><math>-2 &lt; z(G_1) &lt; 2</math></b>	<b>Non rejet de H0</b>
Kurtosis $g_2$ (Applatissement pearson) =	-0,924
Kurtosis $G_2$ (Applatissement Fisher) =	-0,7881
sG2 =	1,121
$z(G_2)$	-0,7031
<b><math>-2 &lt; z(G_2) &lt; 2</math></b>	<b>Non rejet de H0</b>

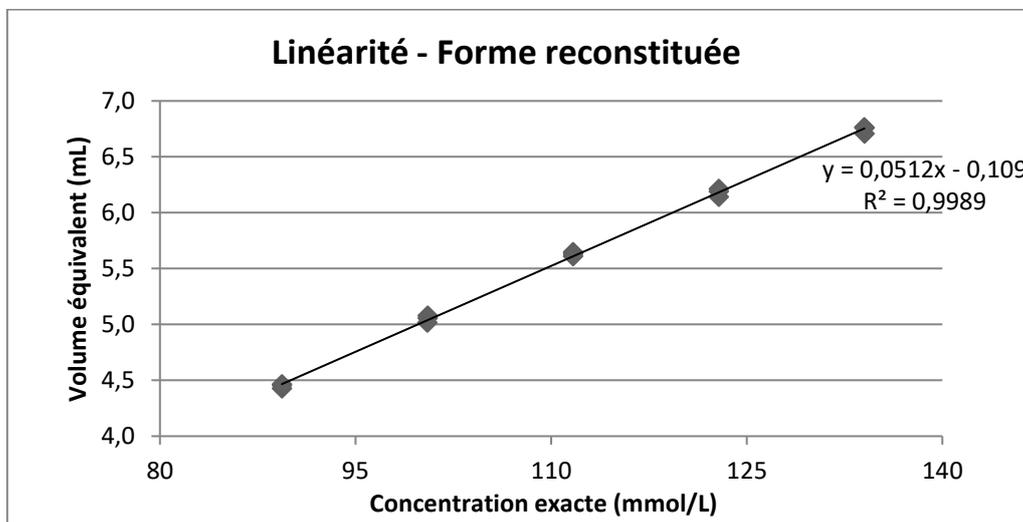
<b>Shapiro-Wilk :</b>	
a=	5%
Wobs Shapiro-Wilk =	0,951
Wcrit Shapiro-wilk =	0,881
<b><math>W_{obs} &gt; W_{crit}</math></b>	<b>Non rejet de H0</b>

- $H_0: X \rightarrow \mathcal{N}(\mu; \sigma)$  possible
- $H_1: X \not\rightarrow \mathcal{N}(\mu; \sigma)$

*Annexe V (1/5) – Linéarité gamme FR, données brutes*

Gamme	Points de gamme	Concentration exacte (mmol/L)	Volume éq (mL)
1	80%	89,350	4,465
	90%	100,518	5,054
	100%	111,687	5,629
	110%	122,856	6,213
	120%	134,024	6,706
2	80%	89,348	4,427
	90%	100,517	5,078
	100%	111,685	5,646
	110%	122,854	6,142
	120%	134,022	6,757
3	80%	89,345	4,454
	90%	100,513	5,016
	100%	111,681	5,610
	110%	122,849	6,190
	120%	134,017	6,763

Gamme	a	b	R <sup>2</sup>
1	0,0505	-0,0277	0,999
2	0,0513	-0,114	0,9982
3	0,0519	-0,1855	0,9999



## RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Statistiques de la régression</i>	
Coefficient de détermination multiple	0,99945628
Coefficient de détermination R <sup>2</sup>	<b>0,998912856</b>
Coefficient de détermination R <sup>2</sup>	0,998829229
Erreur-type	0,028660837
Observations	15

## ANALYSE DE VARIANCE

	<i>Degré de liberté</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>
Régression	1	9,812091234	9,812091234	<b>11944,93664</b>
Résidus	13	0,010678766	0,000821444	
Total	14	9,82277		

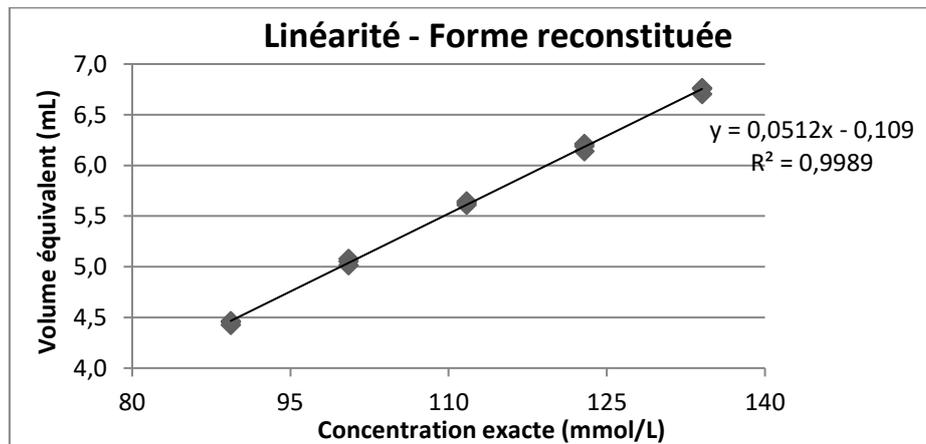
	<i>Coefficients</i>	<i>Erreur-type</i>	<i>Statistique t</i>	<i>Probabilité</i>
Constante	<b>-0,109021235</b>	0,052848156	<b>-2,062914636</b>	0,05968911
Variable X 1	<b>0,051207136</b>	0,000468531	<b>109,2928938</b>	1,18221E-20

Annexe V (2/5) – Linéarité gamme FR, changement de variable

a= 0,051207136

		x	Xi	y	Yi
Niveau	Gamme	Concentration exacte (mmol/L)	concentration moyenne par niveau (mmol/L)	Volume éq (mL)	Changement de variable
80%	1	89,350	89,348	4,465	4,465
	2	89,348		4,427	4,427
	3	89,345		4,454	4,454
90%	1	100,518	100,516	5,054	5,054
	2	100,517		5,078	5,078
	3	100,513		5,016	5,016
100%	1	111,687	111,684	5,629	5,629
	2	111,685		5,646	5,646
	3	111,681		5,610	5,610
110%	1	122,856	122,853	6,213	6,213
	2	122,854		6,142	6,142
	3	122,849		6,190	6,190
120%	1	134,024	134,021	6,706	6,706
	2	134,022		6,757	6,757
	3	134,017		6,763	6,763

$$Y_i = y + \text{pente} \times (X_i - x)$$



RAPPORT DÉTAILLÉ

Statistiques de la régression	
Coefficient de détermination multiple	0,99945628
Coefficient de détermination R <sup>2</sup>	<b>0,998912856</b>
Coefficient de détermination R <sup>2</sup>	0,998829229
Erreur-type	0,028660837
Observations	15

ANALYSE DE VARIANCE

	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F
Régression	1	9,812088275	9,812088275	<b>11944,933</b>
Résidus	13	0,010678766	0,000821444	
Total	14	9,822767042		

	Coefficients	Erreur-type	Statistique t	Probabilité
Constante	<b>-0,109020476</b>	0,052848157	<b>-2,062900233</b>	0,05969066
Variable X 1	<b>0,05120713</b>	0,000468531	<b>109,2928773</b>	1,1822E-20

Annexe V (3/5) – Linéarité gamme FR – Validité droite de régression, données transformées

a = 0,0512

b = -0,1090

	Concentration exacte (mmol/L)	Volume éq (mL)	Moyenne	SCE <sub>yij</sub>		
Niveau	Xi	Yi	Y	(Yi - Y) <sup>2</sup>	Yi*	(Yi - Yi*) <sup>2</sup>
80%	89,348	4,465	4,449	2,629E-04	4,466	1,786E-06
		4,427		4,702E-04	4,466	1,539E-03
		4,454		2,992E-05	4,466	1,459E-04
90%	100,516	5,054	5,049	2,083E-05	5,038	2,491E-04
		5,078		8,188E-04	5,038	1,587E-03
		5,016		1,101E-03	5,038	4,823E-04
100%	111,684	5,629	5,628	2,810E-07	5,610	3,553E-04
		5,646		3,109E-04	5,610	1,293E-03
		5,610		3,299E-04	5,610	2,466E-08
110%	122,853	6,213	6,182	9,722E-04	6,182	9,559E-04
		6,142		1,578E-03	6,182	1,598E-03
		6,190		7,290E-05	6,182	6,849E-05
120%	134,021	6,706	6,742	1,307E-03	6,754	2,301E-03
		6,757		2,235E-04	6,754	9,851E-06
		6,763		4,496E-04	6,754	8,826E-05
SCE <sub>erreur pure</sub> =				7,947E-03	SCE <sub>résiduelle</sub> =	1,067E-02

Origine de la fluctuation	SCE	Ddl	Var	Fobs (F4)
Résiduelle (rés) *	1,067E-02	N - 2 = 13	8,211E-04	
Erreur pure (ep)	7,947E-03	N - k = 10	7,947E-04	
Ecart à la linéarité (lin)	2,727E-03	k - 2 = 3	9,090E-04	1,144

ANALYSE DE VARIANCE

	Ddl	SCE	Var
Régression	1	9,8120883	9,8120883
Résidus	13	0,0106788	0,0008214

\* on aurait pu se servir de la valeur obtenue avec l'utilitaire d'analyse

N = 15 observations  
k = 5 niveaux

$$SCE_{résiduelle} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{ni=3} (y_{ij} - y_{ij}^*)^2$$

$$Var = \frac{SCE}{Ddl}$$

$$SCE_{err\ pure} = \sum_{i=1}^k (SCE_{y_{ij}}) = \sum_{i=1}^k (y_{ij} - Y)^2$$

$$F_{obs} = \frac{Var_{Lin}}{Var_{ep}}$$

$$SCE_{Lin} = SCE_{rés} - SCE_{ep}$$

*Annexe V (4/5) – Linéarité gamme FR – Normalité des données, données transformées*

Niveaux	Gamme	Yi (Véq transformé)
80%	1	4,465
	2	4,427
	3	4,454
90%	1	5,054
	2	5,078
	3	5,016
100%	1	5,629
	2	5,646
	3	5,610
110%	1	6,213
	2	6,142
	3	6,190
120%	1	6,706
	2	6,757
	3	6,763

SCE <sub>yi</sub> = 9,823
b = 2,997

$$b = \sum d_i \times a_i \quad W_{obs} = \frac{b^2}{SCE_{yi}}$$

	Shapiro-wilk				
	Yi ordre décroissant	Yi ordre croissant	di	ai	di*ai
1	6,763	4,427	2,336	0,515	1,203
2	6,757	4,454	2,303	0,331	0,761
3	6,706	4,465	2,241	0,250	0,559
4	6,213	5,016	1,197	0,188	0,225
5	6,190	5,054	1,136	0,135	0,154
6	6,142	5,078	1,064	0,088	0,094
7	5,646	5,610	0,036	0,043	0,002
8	5,629	5,629			
9	5,610	5,646			
10	5,078	6,142			
11	5,054	6,190			
12	5,016	6,213			
13	4,465	6,706			
14	4,454	6,757			
15	4,427	6,763			

n =	15
Asymétrie de Yule et Kendall (ou de Bowley)	-0,0182
Skewness $g_1$ (Asymétrie Pearson) =	-0,0390
Skewness $G_1$ (Asymétrie Fisher) =	-0,0435
sG1 =	0,580
$z(G_1)$	-0,075
$-2 < z(G_1) < 2$	Non rejet de H0
Kurtosis $g_2$ (Applatissement pearson) =	-1,285
Kurtosis $G_2$ (Applatissement Fisher) =	-1,3070
sG2 =	1,121
$z(G_2)$	-1,1661
$-2 < z(G_2) < 2$	Non rejet de H0

<b>Shapiro-Wilk :</b>	
a=	5%
Wobs Shapiro-Wilk =	0,915
Wcrit Shapiro-wilk =	0,881
$W_{obs} > W_{crit}$	Non rejet de H0

- $H_0: X \rightarrow \mathcal{N}(\mu; \sigma)$  possible
- $H_1: X \nrightarrow \mathcal{N}(\mu; \sigma)$

Annexe V (5/5) – Linéarité gamme FR – Normalité des résidus, données transformées

Observation	Yi (Vég transformé)	Prévisions pour Yi	Résidus
1	4,465	4,467	-0,00123414
2	4,427	4,467	-0,039336554
3	4,454	4,467	-0,012029311
4	5,054	5,039	0,01583343
5	5,078	5,039	0,039782223
6	5,016	5,039	-0,021910534
7	5,629	5,611	0,018952207
8	5,646	5,611	0,035849792
9	5,610	5,611	0,000208242
10	6,213	6,183	0,031019776
11	6,142	6,183	-0,040082638
12	6,190	6,183	0,008327019
13	6,706	6,754	-0,047861447
14	6,757	6,754	0,003036139
15	6,763	6,754	0,009445796

SCE<sub>yi</sub>= 0,011  
b= 0,101

$$b = \sum d_i \times a_i \quad W_{obs} = \frac{b^2}{SCE_{yi}}$$

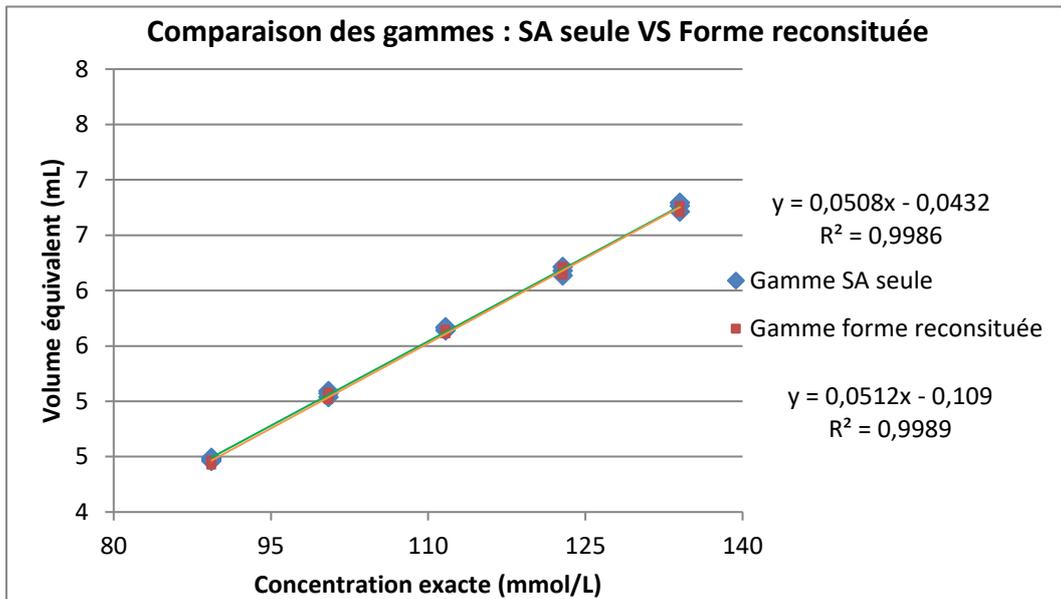
<b>Shapiro-wilk</b>					
	<b>Yi ordre décroissant</b>	<b>Yi ordre croissant</b>	<b>di</b>	<b>ai</b>	<b>di*ai</b>
1	0,039782223	-0,047861447	0,08764367	0,5150	0,04513649
2	0,035849792	-0,040082638	0,07593243	0,3306	0,02510326
3	0,031019776	-0,039336554	0,07035633	0,2495	0,0175539
4	0,018952207	-0,021910534	0,04086274	0,1878	0,00767402
5	0,01583343	-0,012029311	0,02786274	0,1353	0,00376983
6	0,009445796	-0,00123414	0,01067994	0,0880	0,00093983
7	0,008327019	0,000208242	0,00811878	0,0433	0,00035154
8	0,003036139	0,003036139			
9	0,000208242	0,008327019			
10	-0,00123414	0,009445796			
11	-0,012029311	0,01583343			
12	-0,021910534	0,018952207			
13	-0,039336554	0,031019776			
14	-0,040082638	0,035849792			
15	-0,047861447	0,039782223			

n =	15
Asymétrie de Yule et Kendall (ou de Bowley)	-0,1644
Skewness $g_1$ (Asymétrie Pearson) =	-0,3371
Skewness $G_1$ (Asymétrie Fisher) =	-0,3758
sG1 =	0,580
$z(G_1)$	-0,648
$-2 < z(G_1) < 2$	Non rejet de H0
Kurtosis $g_2$ (Applatissement pearson) =	-0,927
Kurtosis $G_2$ (Applatissement Fisher) =	-0,7923
sG2 =	1,121
$z(G_2)$	-0,7069
$-2 < z(G_2) < 2$	Non rejet de H0

<b>Shapiro-Wilk :</b>	
a=	5%
Wobs Shapiro-Wilk =	0,946
Wcrit Shapiro-wilk =	0,881
$W_{obs} > W_{crit}$	Non rejet de H0

- $H_0: X \rightarrow \mathcal{N}(\mu; \sigma)$  possible
- $H_1: X \not\rightarrow \mathcal{N}(\mu; \sigma)$

Annexe VI – Comparaison des gammes, données transformées



Gamme SA seule		
	coefficient	erreur type
pente a =	0,05077126	0,000534064
ordonnée à l'origine b =	-0,04318232	0,060236124

Test de comparaison des pentes  $t_{\text{éch}} = \frac{|a_{SA} - a_{FR}|}{\sqrt{s^2_{aSA} + s^2_{aFR}}}$

$t_{\text{éch}} \quad \mathbf{0,614}$

$t^\circ(0,05;26) \quad 2,056$

Gamme Forme reconstituée		
	coefficient	erreur type
pente a =	0,05120713	0,00046853
ordonnée à l'origine b =	-0,109020476	0,05284816

Test de comparaison des ordonnées  $t_{\text{éch}} = \frac{|b_{SA} - b_{FR}|}{\sqrt{s^2_{bSA} + s^2_{bFR}}}$

$t_{\text{éch}} \quad \mathbf{0,822}$

$t^\circ(0,05;26) \quad 2,056$

\* erreur type donnée par l'utilitaire d'analyse équivaut à l'écart-type

**Annexe VII – Exactitude, gamme FR**

Pente a = **0,051207136**

Ord à l'origine b = **-0,109021235**

Niveau	Gamme	Concentration exacte (mmol/L)	Veq mesuré (mL)	Concentration calculée (mmol/L)	R <sub>xi</sub>	m <sub>xi</sub>	S <sup>2</sup>	(R <sub>xi</sub> -m <sub>R</sub> ) <sup>2</sup>	(R <sub>xi</sub> -m <sub>xi</sub> ) <sup>2</sup>
80%	1	89,350	4,465	89,324	99,97	99,616	0,18225	0,00062	0,12559
	2	89,348	4,427	88,582	99,14			0,72796	0,22461
	3	89,345	4,454	89,109	99,74			0,06746	0,01429
90%	1	100,518	5,054	100,826	100,31	100,218	0,36625	0,09668	0,00786
	2	100,517	5,078	101,295	100,77			0,60561	0,30908
	3	100,513	5,016	100,084	99,57			0,17840	0,41555
100%	1	111,687	5,629	112,055	100,33	100,320	0,09800	0,11149	0,00009
	2	111,685	5,646	112,387	100,63			0,40063	0,09506
	3	111,681	5,610	111,684	100,00			0,00005	0,10086
110%	1	122,856	6,213	123,460	100,49	99,996	0,33133	0,24578	0,24564
	2	122,854	6,142	122,073	99,36			0,39841	0,39859
	3	122,849	6,190	123,011	100,13			0,01846	0,01842
120%	1	134,024	6,706	133,087	99,30	99,828	0,21021	0,48242	0,27751
	2	134,022	6,757	134,083	100,05			0,00250	0,04744
	3	134,017	6,763	134,200	100,14			0,01994	0,09547
					m <sub>R</sub> =	<b>100,00</b>		<b>3,35642</b>	<b>2,37606</b>
								<b>= SCE tot</b>	<b>= SCE rés</b>

Origine de la fluctuation	SCE	Ddl	Var	Fobs (F5)
Résiduelle (rés)	2,37606	N-k = 10	0,23761	
Totale (tot)	3,35642	N-1 = 14	0,23974	
Factorielle (fac)	0,98036	k-1 = 4	0,24509	<b>1,031</b>

Recouvrement moyen		
t <sub>0</sub> (0,05 ; N-1 =14)	<b>2,145</b>	
<b>99,72</b>	< Ir moy <	<b>100,27</b>

Test de Cochran : homogénéité des variances	
$\sum S^2$	1,188
$C_{\text{Coch}} = S^2_{\text{max}} / \sum S^2$	0,308
$C_{\alpha}(0,05 ; 5 ; 3)$	0,684

$$R_{xi} = \frac{\text{concentration exacte}}{\text{concentration calculée}} \times 100$$

$$SCE_{rés} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{ni} (R_{xi} - m_{xi})^2$$

$$SCE_{Tot} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{ni} (R_{xi} - m_R)^2$$

$$SCE_{Fac} = SCE_{Tot} - SCE_{rés}$$

$$Var = \frac{SCE}{Ddl}$$

$$F_{Fac} = \frac{Var_{Fac}}{Var_{rés}}$$

$$IC = \left[ m_R - t_{(0,05 ; N-1)} \times \sqrt{\frac{Var_{Tot}}{N}} ; m_R + t_{(0,05 ; N-1)} \times \sqrt{\frac{Var_{Tot}}{N}} \right]$$

**Annexe VIII – Fidélité, forme reconstituée**

	Série 1	Série 2	Série 3
Concentration exacte (mmol/L)	111,679	111,688	111,681
Volume théorique (mL)	5,595	5,596	5,595
n° répétition	Recouvrement en %		
1	100,769	100,625	100,733
2	100,804	100,679	100,769
3	100,947	100,697	100,876
4	100,232	100,697	100,786
5	101,180	100,679	100,304
6	101,072	100,590	100,465
moyenne	100,834	100,661	100,655
moyenne globale	100,717		
variance	1,1125E-01	1,9160E-03	4,8897E-02

I = 3 nombre de séries  
 J = 6 nombre de répétitions

	Volume équivalent en mL		
n° répétition	Série 1	Série 2	Série 3
1	5,638	5,631	5,636
2	5,640	5,634	5,638
3	5,648	5,635	5,644
4	5,608	5,635	5,639
5	5,661	5,634	5,612
6	5,655	5,629	5,621

Variance répétabilité s <sup>2</sup> r	0,054
écart-type répétabilité sr	0,232
<b>CV répétabilité</b>	<b>0,231%</b>

Variance des moyennes des I séries s <sup>2</sup> s	0,010
Variance inter-séries s <sup>2</sup> g	0,001
écart-type inter-séries sg	0,036

Variance fidélité intermédiaire s <sup>2</sup> R	0,055
écart-type fidélité intermédiaire sR	0,235
<b>CV fidélité intermédiaire</b>	<b>0,234%</b>

Test de Cochran : homogénéité des variances	
Σ S <sup>2</sup>	1,6207E-01
C <sub>ech</sub> = S <sup>2</sup> <sub>max</sub> / Σ S <sup>2</sup>	<b>0,686</b>
C <sub>0</sub> (0,05 ; 6 ; 3)	0,708

$$s^2_r = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (y_{ij} - m_i)^2}{I \times (J - 1)} = \frac{\sum_{i=1}^I s^2_i}{I}$$

$$s^2_s = \frac{\sum_{i=1}^I (m_i - \bar{m})^2}{I - 1}$$

$$s^2_g = s^2_s - \frac{s^2_r}{J}$$

$$s^2_R = s^2_r + s^2_g$$

## Annexe IX – Incertitude de mesure

Méthode STP Pharma Pratiques (juillet-août 2017) - Titration potentiométrique : Méthode de type A

Détermination de l'intervalle prévisionnel de tolérance  $\beta$  (95%)

Données				Justesse		Fidélité				Intervalle de tolérance (IT)					
% Recouvrement théorique	J	I	moyenne observée (%)	biais absolu (%)	biais relatif (%)	ecart-type répétabilité sr	ecart-type intersérie sg	ecart-type de fidélité intermédiaire sR	CV fidélité intermédiaire (%)	R	B	ddl	t ( $\alpha$ ;ddl)	Tolérance inférieure (%)	Tolérance supérieure (%)
100	6	3	100,717	0,717	0,717	0,232	0,036	0,235	0,234	0,024	0,946	16,260	2,120	0,203	1,231
												$\alpha = 0,05$			

Estimation de l'incertitude-type composée à partir de l'intervalle prévisionnel de tolérance  $\beta$

$$\begin{aligned}
 u &= 0,24 \quad \% \quad \text{sachant que } 100\% > 5,595 \text{ mL} \\
 u &= 0,01 \quad \text{mL} \\
 u &= 0,27 \quad \text{mmol/L}
 \end{aligned}$$

$$\text{chlorures totaux en } \text{mmol.L}^{-1} = \frac{V_{\text{eq}} (\text{mL}) \times \text{titre de la bouteille } (\text{mmol.L}^{-1})}{\text{Prise d'essai} (\text{mL})} \times 1000$$

Estimation de l'incertitude élargie

$$U = 0,57 \quad \text{mmol/L}$$

$$R = \frac{s^2 g}{s^2 r}$$

$$B = \sqrt{\frac{R + 1}{J \cdot R + 1}}$$

$$ddl = \frac{(R + 1)^2}{\frac{(R + \frac{1}{J})^2}{I - 1} + \frac{1 - \frac{1}{J}}{I \cdot J}}$$

$$u = \sqrt{1 + \frac{1}{I \cdot J \cdot B^2}} \times sR$$

$$U = t_{\alpha; ddl} \times u$$

$$IT = \text{biais absolu} \pm t_{\alpha; ddl} \times \sqrt{1 + \frac{1}{I \cdot J \cdot B^2}} \times sR$$

## 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.

## Titre

---

# Plan directeur et validation d'une méthode de dosage : Application au Ringer Lactate Vetoflex®

## Résumé

---

Le contrôle qualité joue un rôle important dans la libération des médicaments sur le marché. Son objectif est de prouver la conformité des produits vis-à-vis de spécifications définies dans le dossier d'AMM. Ainsi, les exigences réglementaires dictées dans la ligne directrice 15 des BPF doivent être respectées. Pour maîtriser la qualité, ce référentiel préconise la mise en place d'un plan directeur de validation (PDV). Il s'agit d'un document nécessaire pour planifier les activités de qualification et de validation, deux éléments essentiels à l'analyse des médicaments : les méthodes doivent être validées sur des équipements qualifiés.

L'élaboration d'un PDV a souligné la nécessité de valider la méthode de quantification des chlorures, substance active du Ringer Lactate Vetoflex®. Le statut de qualification des équipements a dû être vérifié avant de débiter l'étape de validation. Cette dernière s'est déroulée selon les recommandations établies par la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) dans le *guideline* 1992. Ce guide présente une démarche technique et statistique permettant de répondre aux exigences de l'ICH Q2(R1) en ce qui concerne la validation de méthode. En effet, différents critères doivent être validés pour être conforme : spécificité, linéarité, exactitude et fidélité. La démarche mise en place a été appliquée au dosage des chlorures par argentimétrie et détection potentiométrique. Les résultats obtenus ont permis la validation de la méthode de quantification mais les limites de ce *guideline* SFSTP 1992 ont été mises en évidence.

L'approche proposée dans cette thèse a permis la construction d'un PDV, le développement et la validation d'une méthode de dosage de l'ion chlorure dans un produit pharmaceutique ainsi que la rédaction de la documentation associée (protocole et rapport de validation). Un système complet de contrôle et d'assurance qualité développé pour le Ringer Lactate Vetoflex® autorise son analyse en routine.

## Discipline

---

Pharmacie

## Mots clés

---

Contrôle qualité – Assurance qualité - Plan Directeur de Validation - Qualification - Validation - ICH Q2(R1) - Argentimétrie – Potentiométrie

## Adresse du laboratoire

---

Laboratoire de Chimie Analytique  
Université de Bordeaux - U.F.R des Sciences Pharmaceutiques  
146 rue Léo Saignat  
33076 Bordeaux CEDEX