

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD
FACULTE DE MEDECINE
DR. B. BENZERDJEB - TLEMEN



وزارة التعليم العالي
والبحث العلمي
جامعة أبو بكر بلقايد
كلية الطب
د. ب. بن زرجب - تلمسان

DEPARTEMENT DE PHARMACIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES POUR
L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR EN PHARMACIE.

THÈME :

VALIDATION D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE DES ÉLECTROLYTES
PAR ÉLECTROCHIMIE DANS LE SERUM SALÉ.

Présenté par :

MECHERNENE Redouane.

MATHUBE Fredrick.

Soutenu le : 22/10/2020.

Le Jury :

Président : Pr. SELKA Adil.

Professeur

U.A.B.B-Tlemcen.

Membres : Dr.GHENEMI Fatima Zohra.

Docteur

U.A.B.B-Tlemcen.

Dr. HADJILA Amina.

Docteur

U.A.B.B- Tlemcen.

Encadreur : Dr. Nordine Zakaria Ibrahim.

Docteur

U.A.B.B-Tlemcen.

Remerciement

Tout d'abord, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir permis d'atteindre ce jour car nous l'attendons depuis environ six ans et de nous permettre de terminer ce travail.

Nous tenons à remercier nos parents et notre famille d'avoir été patients avec nous pendant toutes ces années, de nous soutenir de toutes les manières possibles sans nous fatiguer, de nous montrer le bon chemin pour atteindre notre réussite académique.

Nous ne serions pas ici sans les efforts intensifs de nos chers professeurs de la première année à la sixième année, ils ont été là pour nous, et pour nous former et nous bien diriger, ils ont joué un grand rôle en faisant de nous ce que nous sommes aujourd'hui, nous ne pouvons pas les payer mais Dieu va les payer à travers nos prières.

Le rôle majeur joué par notre encadreur Dr. Nordine Ibrahim Zakaria est plus qu'essentiel dans la réalisation de ce projet, il nous a apporté un soutien moral et matériel chaque fois que nécessaire et il a été avec nous tout le temps à chaque étape, sa contribution est si particulière.

On ne peut oublier le rôle important joué par l'Université de Tlemcen, département de pharmacie en particulier le chef de département Dr. Nesrine Abouejal, les techniciens de laboratoire de chimie minérale et analytique, pour nous avoir laissé participer librement au sein des laboratoires du département, afin de réaliser ce projet.

Enfin, nous tenons à remercier tous ceux qui ont participé à ce projet, sans oublier nos chers collègues de notre Promo Tlemcen 2014 et tous les autres dont leurs noms ne sont pas mentionnés, nous vous remercions tous.



Sommaire

Introduction	1
Première partie : étude bibliographique	2
Chapitre I : électrochimie	3
I. Les généralités.....	4
I.1. Notion d'oxydoréduction	4
I.2. Potentiel d'oxydoréduction	5
I.3. Cellule électrochimique	5
I.4. Les électrodes.....	9
II. Technique électrochimique d'analyse.....	11
2.1. Introduction.....	11
2.2. Deux modes d'exploitation analytique	11
2.2.1. Méthodes quantitatives – macro électrolyses	12
2.2.2. Méthode indicatrice-microélectrolyses	12
2.3. Potentiométrie	13
2.4. Coulométrie	13
2.5. Conductimétrie	14
2.5.1. Généralités.....	15
2.5.2. Définition	16
□ Résistance et conductance d'une solution d'électrolytique	16
□ Conductivité spécifique (χ).....	16
□ Conductivité équivalente λ	16
□ Etalonnage.....	17
□ Température de référence.....	17
2.5.3. Les facteurs affectant la conductivité	17
2.5.4. L'importance de la conductivité.....	18
2.5.5. La mesure de la conductivité	19
2.5.6. La solution conductrice	20
2.5.7. Les paramètres qui influencent la mesure	20
1. Polarisation.....	21
2. Contamination de la surface des électrodes	21
3. Les erreurs dues à la géométrie – effets de champ.....	21
4. Changement de fréquence	21
5. La résistance du câble.....	21

6.	La capacitance du câble.....	22
7.	Influence de la température	22
8.	Règles pour des mesures fiables	25
Chapitre II : sérum salé		27
Sérum salé		28
1.	Introduction	28
2.	Composition	28
3.	Propriétés physicochimiques du chlorure de sodium	28
4.	Structures cristallines usuelles	29
5.	Monographie du chlorure de sodium	30
5.1.	Définition	30
5.2.	Identification	30
5.3.	Essai	30
5.4.	Dosage	32
5.5.	Étiquetage.....	32
6.	Chlorure de sodium 0,9 %, solution pour perfusion	32
6.1.	Formes et présentations.....	32
6.2.	Composition	32
6.3.	Indications	32
6.4.	Contre-indications	33
6.5.	Les effets indésirables	33
6.6.	Pharmacodynamie	33
6.7.	Pharmacocinétique	34
6.8.	Durée de conservation.....	34
6.9.	Précaution particulière de conservation	34
Chapitre III : la validation analytique.....		35
1.	Méthode d'analyse.....	36
2.	Cycle de vie d'une méthode analytique :.....	36
3.	Pourquoi devrais-je valider les méthodes d'analyse que j'utilise ?	38
4.	L'objectif de la validation	38
5.	Définition	39
6.	Le contexte réglementaire de la validation des méthodes analytiques	41
6.1.	Bpf : bonne pratiques de fabrication	41
6.2.	Usp et fad	42

6.3.	Ich : conférence internationale d'harmonisation.....	42
6.4.	Iso : organisation internationale de normalisation	44
6.5.	Le guide de la société française des sciences techniques et pharmaceutiques.....	44
7.	Type de validation	45
7.1.	La validation inter-laboratoires	45
7.2.	La validation intra-laboratoire ou interne (in house –validation)	46
8.	Critères de validation	46
8.1.	Spécificité	46
8.2.	Sélectivité	46
8.3.	Sensibilité.....	46
8.4.	Linéarité	47
8.5.	Justesse.....	47
8.6.	Fidélité.....	47
8.6.1.	Différentes conditions d'étude de la fidélité	48
8.7.	Exactitude.....	50
8.8.	Limite de détection ldm	50
8.9.	Limite de quantification	51
8.10.	Robustesse.....	51
9.	Types de procédures analytiques à valider	51
10.	Règles de décision.....	52
10.1.	L'approche descriptive.....	52
10.2.	L'approche de différence	52
10.3.	L'approche d'équivalence.....	53
10.4.	L'approche de l'erreur totale ou profil d'exactitude	54
11.	Validation d'une méthode par le profil d'exactitude.....	56
11.1.	Définition	56
11.2.	Le concept du profil d'exactitude	57
11.3.	Avantage du profil d'exactitude.....	58
11.4.	Organiser la validation d'une méthode	58
11.5.	Mise en œuvre du profil d'exactitude	60
11.5.1.	Protocoles de validation	60
11.5.2.	Méthodologie statistique	61
11.5.3.	Protocole et évaluation statistique des critères de validation selon le guide sfstp (2003 – 2006).....	64

12. Interprétation du profil d'exactitude pour la validation	70
Deuxième partie : partie pratique	73
I. Matériel et méthodes.....	75
I.1. Type d'étude.....	75
I.2. Choix de la technique.....	75
I.3. Lieu de l'étude.....	75
I.4. Critère de jugement.....	75
I.5. Matériels.....	75
I.5.1. Appareillage	75
I.5.2. Réactifs.....	76
I.6. Methodes.....	76
I.6.1. Mode opératoire	76
I.6.2. Préparation des échantillons.....	77
II. Résultats.....	79
II.1. Le plan d'étalonnage	79
II.2. Le plan de validation	79
II.3. Les calculs.....	80
II.3.1. Estimation des paramètres de la droite	80
II.3.2. Prédiction inverse	81
II.3.3. Calculer les critères de validation.....	83
II.3.4. Construction du profil d'exactitude.....	84
□ Modèle $y=bx+a$	84
□ Modèle $y=bx$	85
III. Discussion	86
Conclusion.....	88
Bibliographie.....	89
Annexe I.....	93
Annexe II.....	94
Annexe III	95

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : L'équation-bilan de la demi-réaction redox	5
Figure 2 : La réaction redox qui se produit entre Zn et Cu^{2+}	6
Figure 3 : Représentation d'une cellule électrochimique.	6
Figure 4 : Fonctionnement d'une cellule électrochimique.	7
Figure 5 : L'électrode standard d'hydrogène.	10
Figure 6 : La cellule potentiométrique électrochimique.	13
Figure 7 : La migration des ions en solution.	20
Figure 8 : position de Na et Cl dans le tableau périodique.	29
Figure 9 : Structure cristallines du NaCl.	29
Figure 10 : Cycle de vie d'une méthode d'analyse.	38
Figure 11 : La validation d'une méthode d'analyse.	40
Figure 12: Image des notions de justesse et de fidélité.	50
Figure 13: Les règles de décisions de validité des méthodes analytiques pour 5 situations différentes (1 à 5) selon le biais relatif de la méthode ;(a) l'approche de différence du biais relatif ;(b) l'approche d'équivalence du biais relatif avec les limites de décision fixées à + ou - 5 %.....	53
Figure 14: Illustration du profil d'exactitude comme outil de décision.	55
Figure 15 : Exemple d'un profil d'exactitude.	69
Figure 16 : exemple d'un profil d'exactitude pour une méthode présentant un biais systématique important, caractérisé par un taux de recouvrement d'environ 70 %.	72
Figure 17: exemple d'un profil d'exactitude pour une méthode présentant un biais systématique important, caractérisé par un taux de recouvrement d'environ 70 %.....	73
Figure 18 : Protocole de validation.	77
Figure 19 : conductivité=f (concentrations)-jour1-	80
Figure 20 : conductivité=f (concentrations)-jour2-	80
Figure 21 : conductivité=f (concentrations)-jour3-	81
Figure 22 : profil d'exactitude pour le modèle $y=bx+a$	84
Figure 23 : profil d'exactitude pour le modèle $y=bx$	85

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Les domaines d'application de l'ICH.	43
Tableau 2 Différentes conditions d'étude de la fidélité.	49
Tableau 3 : Les différents critères de validation selon le type de procédures analytiques.	51
Tableau 4 :Exemple de fonction de réponse.	62
Tableau 5 :Les prédictions inverses pour les différents modèles de régression.	63
Tableau 6 :plan d'étalonnage (mesures exprimées en ms/cm à 25 °C).	79
Tableau 7 :plan de validation (mesures exprimées en ms/cm à 25 °c).	79
Tableau 8 : coefficients de modèles d'étalonnage $Y=bx+a$	81
Tableau 9 : coefficients de modèles d'étalonnage $Y=bx$	81
Tableau 10 :Concentrations retrouvées par prédiction inverse à partir des données du plan de validation (exprimées en mg/l).	82
Tableau 11 : Estimation de la justesse.	83
Tableau 12 :Estimation de l'exactitude.....	83
Tableau 13 :Intervalle de tolérance du modèle $Y=bx+a$	83
Tableau 14 :Intervalle de tolérance du modèle $Y=bx$	84

LISTE DES ABREVIATIONS

- ATC** : Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) Classification System.
- BPF** : Bonne pratique de fabrication.
- BPL** : Bonne pratique de laboratoire.
- C** : Concentration.
- Cm** : Centimètre.
- CRD** : Centre de recherche de recherche et développement.
- CV** : Coefficient de variation.
- CVFI** : Coefficient de variabilité de fidélité intermédiaire.
- Ech**: Echantillon.
- FDA**: Food and drug administration.
- Fig** : Figure.
- g** : *Gramme*.
- ICH** : Conseil international d'harmonisation.
- IEC** : Commission électrotechnique internationale.
- ISO** : International Organization for Standardization.
- LD** : Limite de détection.
- LQ** : Limite de quantification.
- LAI** : Limite d'acceptation inférieure
- LAS** : Limite d'acceptation supérieure.
- MAX** : Maximum.
- Mg** : Milligramme.
- MIN** : Minimum.
- ml** : Millilitre.
- mm** : Millimètre.
- Mr** : Masse molaire.
- N** : Normale.
- NaCl** : Chlorure de sodium
- PF** : Produit finit
- SE** : standard d'étalonnage.
- SFSTP** : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques.
- SV** : standard de validation.

INTRODUCTION

Le produit pharmaceutique n'est pas un produit comme les autres, non seulement pour le développer il faut passer par plusieurs étapes : découverte de la molécule active, les essais in-vitro, les études sur l'animal, les essais cliniques et les enregistrements réglementaires, mais aussi le produit fini doit subir beaucoup de tests exigés par les agences réglementaires sur son identité, son dosage, sa qualité, sa pureté et sa stabilité...

Les fabricants de médicaments sont donc dans l'obligation de démontrer qu'ils contrôlent les aspects critiques de leurs opérations spécifiques. Pour cette raison les méthodes utilisées pour le contrôle de la qualité des médicaments, doivent être validées. En effet la validation constitue la preuve formelle que la méthode correspond bien à l'usage pour lequel elle a été prévue.

Le sérum salé 0.9% largement utilisé dans le domaine médical sous différentes formes galéniques : doses uniques, flacons, sprays... est un produit pharmaceutique qui doit être contrôlé. La méthode du dosage de référence est la précipitation qui est une technique ancienne, peu précise, laborieuse et possède un intervalle d'erreur important par rapport aux nouvelles méthodes.

L'objectif de ce travail est de développer et valider une autre méthode pour le dosage des électrolytes du sérum salé : « la conductimétrie », une technique rapide, simple et sensible qui peut remplacer la précipitation et offre une alternative pour l'utilisation en routine au niveau des laboratoires de contrôle.

Dans un premier temps, Nous avons rappelé, les différentes méthodes électrochimiques d'analyse notamment la conductimétrie et leurs principes, ensuite nous avons entamé le chapitre de validation.

Dans un second temps, nous avons rentré dans le vif du sujet, à savoir la validation de la méthode d'analyse, nous avons détaillé les démarches à suivre, on a présenté les résultats et on a répondu à la question : est-ce que la méthode choisie est valide d'un point de vue analytique ?

PREMIERE PARTIE :

**PARTIE
THEORIQUE**

CHAPITRE I :

ELECTROCHIMIE

I. Les généralités

L'électrochimie est une discipline qui étudie la relation entre transformations chimiques et passage de courant électrique. Son domaine d'application est extrêmement vaste : production d'énergie électrique à partir de réactions chimiques (piles et accumulateurs), réalisation de réactions chimiques à partir d'énergie électrique (électrolyses), détection et dosage d'espèces chimiques (électrochimie analytique), détermination de mécanismes et de cinétique réactionnels (électrochimie organique, corrosion), réalisation de dispositifs (batteries, capteurs), etc.

L'étude des réactions électrochimiques fait appel à des connaissances dans des domaines également très variés de la chimie et de la physique, thermodynamique, cinétique, phénomènes de transport, électricité, hydrodynamique. [1]

1.1. Notion d'oxydoréduction

- **Généralités**

Une réaction d'oxydo-réduction (ou redox) est une réaction qui implique un transfert d'électrons d'un élément chimique à un autre.

- **Oxydation**

L'oxydation est la perte d'électrons lors d'une réaction d'une molécule, d'un atome ou d'un ion. L'oxydation se produit lorsque l'état d'oxydation d'une molécule, d'un atome ou d'un ion est augmenté.

- **Réduction**

Réduction est une réaction chimique qui consiste à gagner des électrons par l'un des atomes participant à la réaction entre deux produits chimiques. Le terme se réfère à l'élément qui accepte les électrons, car l'état d'oxydation de l'élément qui gagne les électrons est abaissé.

- **Oxydant**

C'est une substance susceptible de fixer des électrons

- **Réducteur**

Un agent réducteur est un élément qui perd (ou "donne") un électron à une autre espèce chimique [2]

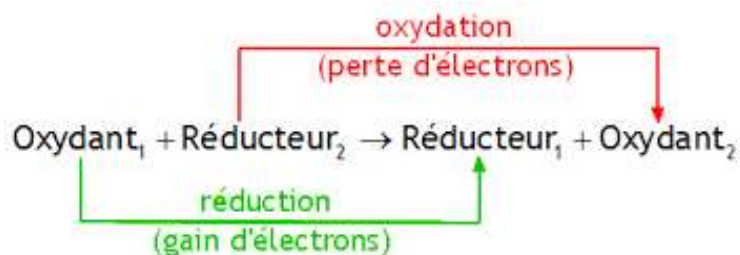


Figure 1 : L'équation-bilan de la réaction redox [20]

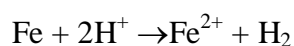
I.2. Potentiel d'oxydoréduction :

Que se passe-t-il si un expérimentateur trempe une barre de fer de masse connue dans l'eau ?

On observe un dégagement de gaz qui correspond à la formation d'hydrogène moléculaire. Après une semaine, l'expérimentateur détermine la masse de la barre de fer et constate une perte de masse.

Ces deux observations suggèrent que le fer métallique réagit avec des protons pour former de l'hydrogène moléculaire et du fer dissout à l'état Fe (II).

L'équation globale donne donc :



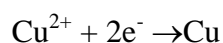
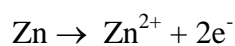
Par conséquent, on définit une « demi-cellule de référence » à laquelle on attribue arbitrairement la valeur 0.0V. Ce système est l'électrode standard à hydrogène ESH (NHE en anglais). [2]

I.3. Cellule électrochimique :

Une réaction redox peut se dérouler de façon réversible ou irréversible.

➤ Réversible :

S'il l'on plonge une tôle en zinc métallique dans une solution aqueuse de sulfate de cuivre, une réaction redox se produit entre Zn et Cu²⁺



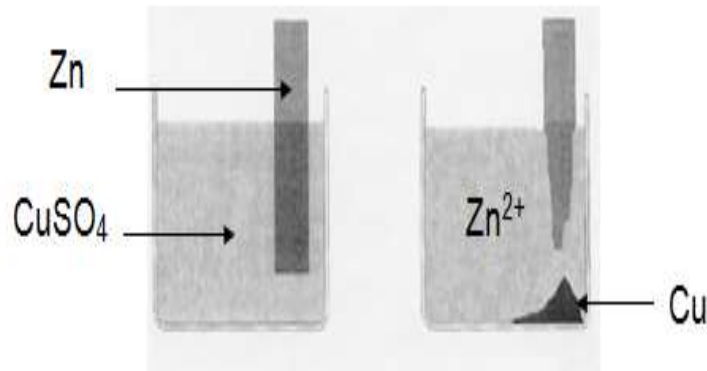


Figure 2 : La réaction redox qui se produit entre Zn et Cu^{2+} . [8]

➤ Irréversible :

Il est possible de séparer les deux demi-réactions dans l'espace. Ceci se fait dans **une cellule électrochimique.**

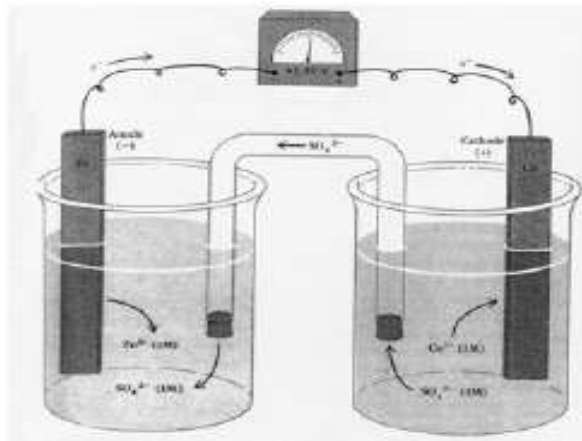


Figure 3 : Représentation d'une cellule électrochimique. [8]

Une cellule électrochimique est constituée de deux chambres qui s'appellent **demi-cellule** et qui sont équipées chacune d'une électrode plongeant dans une solution.

- 1) L'oxydation réside dans l'une des chambres ⇒ **chambre anodique.**
- 2) La réduction se situe dans l'autre ⇒ **chambre cathodique.**

Il faut que les deux chambres soient en double contact pour former un circuit fermé. Les deux électrodes sont liées par un fil métallique qui assure le transfert des électrons et les deux solutions par un pont salin (ou jonction ionique) qui assure l'équilibrage des anions. Le pont salin peut-être remplacé par une paroi semi-perméable (ou diaphragme) entre les deux solutions. [3]

Une cellule électrochimique peut fonctionner de 3 manières différentes :

- 1) à courant nul (ce qui permet de déterminer le potentiel redox d'une des demi-cellules). (S-A)
- 2) en mode pile. (S-B)
- 3) en mode électrolyse. (S-C)

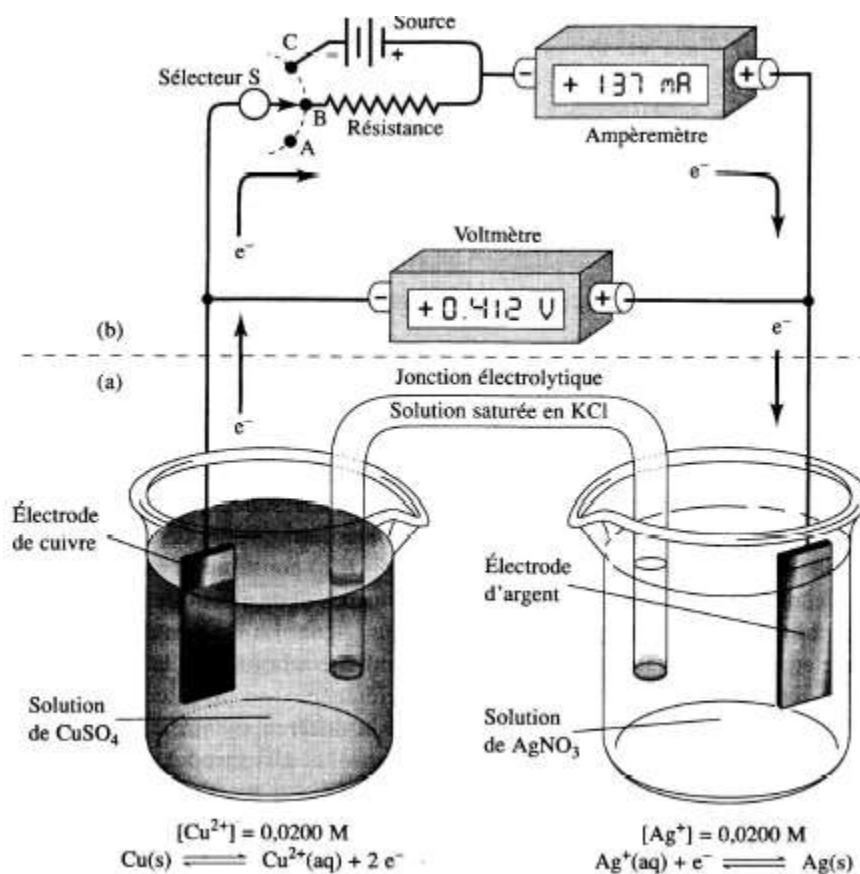


Figure 4 : Fonctionnement d'une cellule électrochimique.[8]

Un voltmètre possède une résistance infinie et ne consomme pas de courant. La valeur affichée sur le voltmètre est POSITIVE si le potentiel appliqué à la borne + est le plus positif : les électrons circulent du - vers le +. Un ampèremètre mesure l'intensité du courant sans le perturber car sa résistance est quasi nulle. Lorsque le signe est positif, les électrons circulent du - vers le +. [4]

Convention. ON PLACE TOUJOURS LA BORNE POSITIVE À DROITE (POUR UN VOLTMETRE ET/OU UN AMPEREMETRE).

- **Définition d'une pile :** c'est une cellule chimique qui transforme l'énergie chimique en énergie électrique récupérable à l'extérieur

Différents types de piles :

Piles galvaniques : exemple pile Daniell.

Piles à combustible.

A chaque pile correspond une tension électrique appelée force électromotrice ou f.e.m qui correspond à la différence de potentiel des deux électrodes qui la constitue :

$$f.e.m = E_1 - E_2 = \Delta E$$

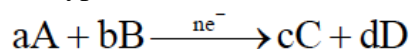
Cependant le potentiel d'une électrode n'est pas mesurable. Mais il est rendu possible quand une des électrodes est une électrode de référence standard. [5]

- **Définition de potentiel d'électrode :** ou potentiel d'oxydo-réduction est celui qu'affiche le voltmètre si l'on accroche une demi-cellule (dont le potentiel est à déterminer) à sa borne positive et une électrode ESH à sa borne négative.

Le potentiel standard d'électrode E° d'une demi-réaction est défini comme celui qui s'établit lorsque les activités de tous les réactifs et produits sont unitaires (solutés, gaz et corps purs). On parle de condition normale lorsque la température est fixée à 25°C.

- **L'équation de Nernst.**

Elle relie le potentiel d'électrode à la concentration d'ions. Ainsi, le potentiel de réduction augmente avec l'augmentation dans la concentration des ions. Pour une électrochimie générale réaction du type.



L'équation est exprimée par :

$$E_{\text{cell}} = E_{\text{cell}}^\circ - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}$$

E° = le potentiel standard d'électrode, ou potentiel redox standard qui est une constante caractéristique de la réaction.

R = la constante des gaz, soit 8,314 JK⁻¹mol⁻¹.

T=la température absolue en kelvins.

n=le nombre de moles d'électrons qui apparaissent dans la demi-réaction d'électrode.

F=la constant de faraday, soit 96485 C (coulombs).

ln=le logarithme naturel, soit $2,303 \times \log_{10}$. [5]

I.4. Les électrodes

Les électrodes utilisées dans les montages électrochimiques peuvent être classées en deux catégories :

a. Les électrodes de référence

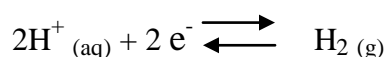
❖ L'électrode standard d'hydrogène :

C'est une électrode à gaz typique.

Composée d'un conducteur métallique : plaque de platine platinée c'est-à-dire recouverte de platine finement divisé (noir de platine) pour augmenter la surface active (catalyseur de réaction). Ce platine ne participe pas à la réaction et sert de transfert d'électrons.

Elle est immergée dans une solution aqueuse acide dont le pH est connu et constant.

La saturation de la solution se fait par du H₂ qu'on fait barboter à pression connue et constante à la surface de l'électrode :



Cette réaction est à l'origine du potentiel qui dépend de la température et des activités de H⁺ et de H₂ en solution qui est elle-même liée à la pression du gaz saturant.

Cette électrode est réversible : elle se comporte comme anode (le H₂ est oxydé) ou comme cathode (H⁺ est réduit) selon la demi-cellule à laquelle elle est couplée.

Le potentiel de cette électrode est 0 V à toute température et le potentiel de la cellule couplée est le potentiel de la pile en valeur et en signe. [3]

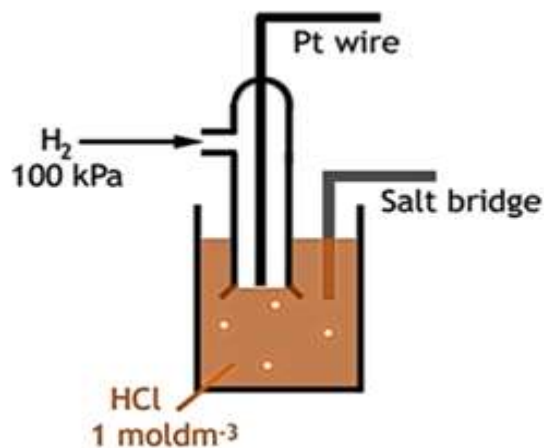
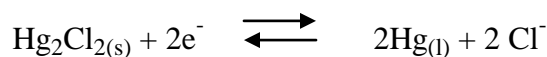


Figure 5 : L'électrode standard d'hydrogène.

❖ Electrode au calomel saturée (ECS) :



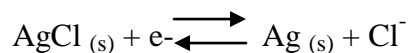
Elle est composée d'un tube intérieur qui contient une pâte aqueuse d'Hg, Hg₂Cl₂ et KCl saturé qui est en contact avec une solution saturée de KCl par un petit orifice.

Une électrode métallique inerte est plongée dans la pâte et le contact avec l'analyte se fait par disque en verre fritté.

Son potentiel est égal à +0,244V (vs ESH) à 25°C. [3]

❖ Electrode argent-chlorure d'argent :

Constituée d'une électrode d'argent plongée dans une solution saturée d'AgCl et KCl :



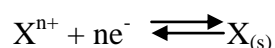
Son potentiel est égal à +0,199V (vs ESH) à 25° C

b. Les électrodes indicatrices :

Elles répondent rapidement de manière reproductible aux variations de l'analyte.

❖ Les électrodes indicatrices métalliques :

Composée de métal pur qui est en équilibre avec son cation en solution, une seule réaction est impliquée :



Elles sont rarement utilisées :

-elles ne sont pas très sélectives et pas très reproductibles

Exemple :

-On ne peut pas utiliser une électrode de cuivre pour doser les ions cuivre en présence d'ions argent qui se réduiront sur la surface de l'électrode.

- Le Zn et Pt se dissolvent dans une solution acide et donc on utilise une solution neutre ou basique.

- on utilise des solutions désoxygénées pour des métaux qui s'oxydent facilement.

-pour les métaux lourds (Fe, Cr, Co, Ni) ne donnent pas de potentiel reproductible.

❖ Electrodes métalliques inertes :

Tel que le platine, l'or, le palladium ou le carbone répond au potentiel du système redox.

Exemple :

Une électrode de platine plongeant dans une solution de cérium (III) et cérium (IV) [4]

II. Technique électrochimique d'analyse

2.1. Introduction :

Nous nous intéresserons ici aux méthodes qui visent à utiliser des électrodes afin d'effectuer, soit la détermination extensive de la composition d'une solution, soit un suivi de l'évolution de la composition au cours d'une réaction (telle qu'une réaction de titrage par exemple). La réponse électrochimique visera à caractériser les points critiques, par exemple le point équivalent du titrage, afin d'en déduire la concentration de l'analyte. Plusieurs possibilités sont offertes suivant la grandeur dont on suit la variation : potentiel (Potentiomètre), courant (ampèremètre), quantité d'électricité (coulométrie). [6]

2.2. Deux modes d'exploitation analytique :

On peut tout d'abord faire la distinction entre deux modes d'exploitation analytique : les méthodes quantitatives et les méthodes indicatrices.

2.2.1. Méthodes quantitatives – Macro électrolyses :

Les réactions électrochimiques sont utilisables pour réaliser la transformation quantitative d'une substance en solution en vue d'une séparation ou d'un dosage. Ces méthodes permettent de déterminer la quantité de substance présente dans un échantillon donné.

Les applications quantitatives de l'électrochimie analytique revêtent deux aspects : La transformation exhaustive est réalisée par électrolyse et la détermination de la quantité de substance préparée est effectuée indépendamment et ultérieurement. C'est le mode d'exploitation le plus simple et le plus anciennement utilisé, lorsque la quantité de substance est déterminée par une mesure de masse, on parle d'électro gravimétrie.

La détermination de la quantité de substance est effectuée simultanément à formation électrochimique, par la mesure de la quantité d'électricité consommée. Durant cette transformation. Cette technique dénommée Coulométrie utilise la loi de Faraday.

2.2.2. Méthode indicatrice-microélectrolyses

Les réactions électrochimiques sont également utilisables en chimie pour obtenir un renseignement sur la composition de la solution, sans modification analytique importante. Ces méthodes permettent de déterminer la concentration d'une substance présente dans une solution. On dispose de deux grandeurs mesurables : le potentiel d'électrode (plus exactement la différence de potentiel entre deux électrodes, dont l'une peut être de référence et avoir un potentiel constant et connu), et l'intensité du courant. Il y a donc deux types de déterminations à considérer.

- ✓ Les déterminations potentiométriques, qui sont effectuées généralement à intensité imposée, nulle ou constant.
- ✓ Les déterminations ampérométriques, qui sont effectuées généralement à différence de potentiel imposée.

Les indications potentiométriques sont reliées aux logarithmes des concentrations, tandis que les indications ampérométriques sont proportionnelles aux concentrations. Dans tous les cas, il est nécessaire de réaliser une microélectrolyse. En effet si l'on veut que la mesure n'apporte pratiquement pas de modification à la composition de la solution, il faut, pendant qu'elle s'effectue, ne consommer qu'une fraction négligeable de la substance à déterminer. [6]

2.3. Potentiométrie :

Le principe est basé sur la mesure du potentiel d'une cellule électrochimique sans courant appréciable, cela implique l'utilisation d'électrodes pour mesurer la tension de la réaction chimique. L'origine du potentiel mesuré au niveau d'une électrode indicatrice est le plus généralement la séparation de charge à travers une interface entre des solutions de forces ioniques différentes (une solution interne à l'activité de l'analyte fixe et une solution externe avec variable activité de l'analyte). [7]

La cellule potentiométrique est composée de :

- L'électrode de référence (calomel électrode, standard hydrogène électrode).
- Jonction électrolytique.
- Analyte.
- L'électrode indicatrice (en métaux, en membrane, pH glass électrode). [8]

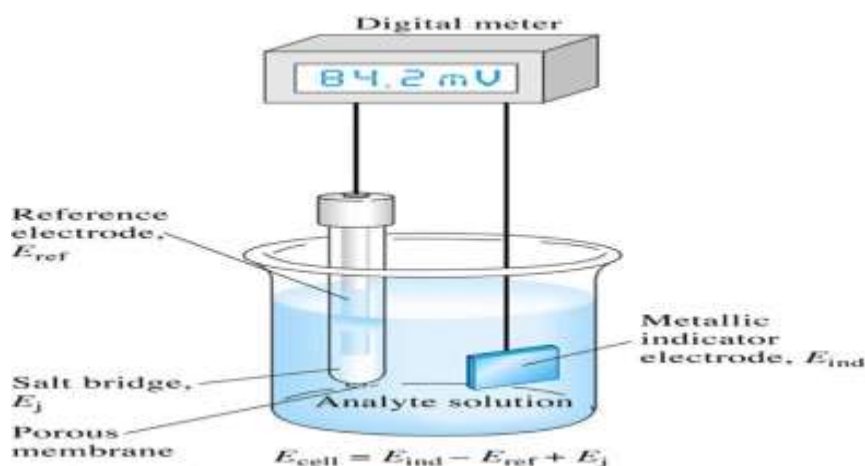


Figure 6 : La cellule potentiométrique électrochimique.[7]

2.4. Coulométrie :

Les méthodes d'analyse coulométrique sont basées sur la mesure de la quantité de charge électrique qui passe à travers une solution lors d'une réaction électrochimique nécessaire pour modifier quantitativement l'état d'oxydation de l'analyte. La quantité de matière mise en jeu pour une quantité Q , est donc égale à Q/nF .

En coulométrie, l'électrolyse est le plus souvent réalisée soit à potentiel constant, soit à intensité constante. Les conditions requises pour la mise en œuvre de cette méthode sont les mêmes, qu'il s'agisse de coulométrie directe, de la détermination de n , ou de titrages coulométrique. [7]

En coulométrie, L'électrolyse est le plus souvent réalisée soit à potentiel constant, soit à intensité constante. Les conditions requises pour la mise en œuvre de cette méthode sont les mêmes, qu'il s'agisse de coulométrie directe, de la détermination de n , ou de titrages coulométriques. Il s'agit de :

Définir les conditions d'électrolyse de telle sorte qu'une seule réaction électrochimique soit mise en jeu (rendement en courant de 100 %). La connaissance des courbes $i = f(E)$ relatives à toutes les substances présentes permet en général de choisir convenablement ces conditions. En effet, la quantité d'électricité mesurée ne doit correspondre qu'à une seule réaction électrochimique (celle étudiée) et à aucune autre réaction parasite, de façon à avoir une efficacité de 100 % de courant pour la consommation de la substance à doser, pendant toute la durée de l'opération.

Mettre en évidence la fin de la réaction électrochimique, dans le cas de la coulométrie directe, ou de la réaction chimique dans le cas d'un titrage coulométrique.

Déterminer la quantité d'électricité mise en jeu et en déduire la quantité de substance ayant réagi. On utilise la relation de Faraday : Faraday ($F = 96\,487 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$) correspond à $1/n$ mole de R consommé ou de O produit. La quantité de matière mise en jeu pour une quantité d'électricité Q , est donc égale : [7]

$$Q/nF.$$

2.5. Conductimétrie :

Il s'agit d'une méthode d'analyse électrochimique utilisée pour la détermination ou la mesure de la conductance électrique d'une solution d'électrolyte au moyen d'un conductimètre. La conductivité électrique d'une solution d'électrolyte dépend du ;

- Type d'ions (cations. Anions, chargés individuellement ou doublement)
- Concentration d'ions
- Température
- Mobilité des ions

Le principe principal impliqué dans cette méthode est que le mouvement des ions crée la conductivité électrique. Le mouvement des ions dépend principalement de la concentration des ions. La conductance électrique conformément à la loi d'ohms qui stipule que la force du **courant (i)** traversant le conducteur est directement proportionnelle au potentiel et inversement à **la résistance (R)** [8]

$$i=V/R$$

2.5.1. Généralités

Un certain nombre d'enquêteurs ont appliqué par le passé de nombreuses mesures de conductivité sur divers fluides et sérums biologiques provenant de sources normales et malades d'origine humaine et animale.

La majorité des chercheurs ont utilisé des méthodes à courant alternatif à haute fréquence pour déterminer la conductivité, seuls quelques-uns ont utilisé des méthodes à courant continu. Alors que la plupart des autres enquêteurs préféraient les électrodes platinées.

La conductivité d'une solution est la mesure de la capacité des ions à transporter le courant électrique. Ce passage du courant électrique s'effectue par la migration des ions dans un champ électrique produit par un courant alternatif.

Un courant alternatif est utilisé pour atténuer la perturbation causée par la polarisation des électrodes résultant du passage d'un courant électrique. Les électrolytes peuvent être considérés comme des conducteurs métalliques et ils obéissent à la loi d'Ohm. En appliquant une force électromotrice constante entre les électrodes, la variation de l'intensité du courant est inversement proportionnelle à la résistance de la solution. La conductivité d'une solution dépend de la concentration des ions présents et de leur vitesse de migration sous l'influence de la force électromotrice appliquée. Plus l'électrolyte est dilué, plus la conductivité diminue, car il y a moins d'ions par volume de solution pour assurer le transport du courant.

La conductivité d'une solution est définie comme l'inverse de la résistance d'un volume de $1,0 \text{ cm}^3$ de solution. Sa mesure s'effectue par l'utilisation d'une cellule de conductivité couplée à un conductivimètre, et la conductivité s'exprime en $\mu\text{S/cm}$.

La conductivité d'une solution traduit son aptitude à conduire le courant électrique : plus la conductivité d'une solution est grande, moins sa résistance sera élevée

Dans la cellule développée, la possibilité de modifier la constante de la cellule d'une valeur mesurée avec la précision requise est implémentée, ce qui permet de contrôler les effets se produisant à la frontière de l'électrode et de la solution et affectant la mesure de la conductivité. Puisque lors du changement de la distance entre les électrodes, seule la résistance intrinsèque du volume de liquide change, et l'influence des processus de la quasi-électrode reste inchangée. [9]

2.5.2. Définition :**❖ Résistance et conductance d'une solution d'électrolytique :**

Dans un bain d'électrolyse, on met une solution d'électrolytes et on y trempe 2 électrodes :

La résistance (R) : est définie comme suit :

$$R = \rho L / S \text{ (exprimée en } \Omega \text{)}$$

L = distance entre les 2 électrodes.

S = surface des électrodes.

ρ = résistance spécifique (résistivité), Constante = « ρ » (exprimée en $\Omega \cdot \text{cm}$)

La conductance :

La conductance (G) est définie comme étant l'inverse de la résistance (R) observée :

$$G = S/\rho L \text{ (unité : Siemens } S = \Omega^{-1} \text{)}$$

❖ Conductivité spécifique (χ)

C'est la quantité de courant électrique que laisse passer la solution entre deux électrodes.

Elle représente la conductance d'un volume de solution entre deux électrodes.

La conductivité spécifique par définition est l'inverse de la résistivité :

$$\chi = 1/\rho \text{ (unité } \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ ou Siemens(S)} \cdot \text{cm}^{-1} \text{)}$$

Cette faculté se mesure avec un conductimètre à électrodes de platine, On peut également exprimer la conductivité spécifique par la relation suivante :

$$\chi = i / E \cdot L/S$$

E : différence de potentiel appliquée entre les 2 électrodes.

i : intensité du courant.

L: distance entre les 2 électrodes.

S: surface des électrodes.

❖ Conductivité équivalente λ :

Caractéristique de chaque ion donné.

Exprimer par la relation :

$$\lambda = \chi/C$$

C : Est la concentration du soluté

χ : Conductivité spécifique. $\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [9]

❖ Etalonnage

L'étalonnage sert à déterminer la constante de cellule, qui est nécessaire pour convertir la valeur de conductance d'un échantillon en conductivité.

Etalon de conductivité :

Une solution de conductivité connue est utilisée pour étalonner la chaîne de mesure de conductivité. [10]

❖ Température de référence

Pour être comparables entre elles, les mesures de conductivité sont souvent ramenées à une température spécifique, en général 20 °C ou 25 °C.

Correction automatique de la température :

Il s'agit d'un algorithme qui va automatiquement calculer la conductivité d'un échantillon à une température de référence. [9]

2.5.3. Les facteurs affectant la conductivité :

❖ La température :

La conductance d'une solution électrolytique augmente avec l'augmentation de la température en raison de l'augmentation du degré d'ionisation.

❖ Nature de l'électrolyte :

Les électrolytes puissants subissent une ionisation complète et présentent donc des conductivités plus élevées car ils fournissent plus d'ions. Alors que les électrolytes faibles subissent une ionisation partielle et présentent donc des conductivités relativement faibles dans leurs solutions.

❖ Taille ionique et mobilité : La mobilité ionique diminue avec l'augmentation de sa taille et donc la conductivité diminue également. Par exemple. A l'état fondu, les conductivités des sels de lithium sont supérieures à celles des sels de césium car la taille de l'ion Li^+ est inférieure à celle de l'ion Cs^+ .

Cependant, dans les solutions aqueuses, le degré d'hydratation affecte la mobilité de l'ion, qui à son tour affecte la conductivité. Les ions fortement hydratés présentent de faibles valeurs de conductance en raison d'une plus grande taille.

Par exemple. Dans les solutions aqueuses, l'ion Li^+ à haute densité de charge est fortement hydraté que l'ion Cs^+ à faible densité de charge. D'où Li^+ hydraté plus grand que Cs^+ hydraté. En conséquence, les sels de lithium présentent des conductivités inférieures à celles des sels de césium dans l'eau. La mobilité ionique est réduite dans les solvants plus visqueux. Par conséquent, la conductivité diminue.

❖ Concentration :

La conductance spécifique (κ) augmente avec l'augmentation de la concentration de la solution à mesure que le nombre d'ions par unité de volume augmente.

Tandis que la conductivité équivalente et la conductance molaire augmentent à la fois avec la concentration diminuée (c'est-à-dire lors de la dilution), car l'étendue de l'ionisation augmente.

Puisque la concentration diminue, on peut s'attendre à une diminution de la conductivité équivalente en raison de la diminution du nombre d'ions disponibles par unité de volume. Cependant, l'augmentation du facteur de volume (V) compense largement cet effet. Le volume doit être augmenté pour obtenir un équivalent d'électrolyte puisque la concentration est diminuée. Par conséquent, l'effet net est l'augmentation de la conductivité équivalente. [8]

2.5.4. L'importance de la conductivité

La mesure de la conductivité est une méthode extrêmement répandue et utile, tout particulièrement dans des applications de contrôle de la qualité.

Voici quelques exemples de ce qu'offre la mesure de la conductivité : surveillance de la pureté des eaux, contrôle des eaux potables et des eaux utilisées dans la fabrication de produits, estimation du nombre total d'ions dans une solution ou encore mesure directe des composants.

De par sa grande fiabilité, sa sensibilité et son faible coût, la conductivité est une technique potentielle de premier ordre pour toute application de surveillance.

Pour certaines applications, on préférera exprimer le résultat en résistivité (inverse de la conductivité). D'autres applications nécessitent la mesure du TDS (Le TDS (Total Dissolved Solids) correspond à la masse de la totalité des cations, anions et toutes autres espèces non dissociées présentes dans un litre de solution aqueuse.), laquelle est reliée à la conductivité par un facteur qui, lui-même, dépend du niveau et du type d'ions présents en solution.

La conductivité peut être mesurée sur un intervalle très large puisqu'il s'étend de 1×10^{-7} S/cm pour la conductivité de l'eau pure jusqu'à 1 S/cm pour des solutions très concentrées.

D'une manière générale, on peut dire que la conductivité constitue un moyen rapide et peu coûteux de déterminer la force ionique d'une solution. Attention cependant à ne pas oublier que c'est une méthode non spécifique, c'est-à-dire qu'elle n'est pas capable de distinguer les différents types d'ions et ne peut fournir qu'un résultat proportionnel à tous les ions présents. [4]

2.5.5. La mesure de la conductivité :

La conductivité se mesure en appliquant un courant électrique alternatif (I) à deux électrodes immergées dans une solution et en mesurant la tension (V) qui en résulte. Lors de cette expérience, les cations migrent en direction de l'électrode négative, les anions se dirigent vers l'électrode positive et la solution se comporte comme un conducteur électrique.

Il existe un certain nombre d'appareils différents sur le marché que vous pouvez utiliser pour mesurer la conductivité de l'eau, notamment :

- ✓ Les testeurs portables : sont des compteurs qui peuvent être jetés dans l'eau pour mesurer plusieurs caractéristiques, notamment la conductivité, la salinité, la température et le pH.
- ✓ Les appareils portables : sont des compteurs de mesure de la qualité de l'eau qui sont parfaits pour les applications de recherche sur le terrain. Les chercheurs du secteur de l'environnement utilisent ces appareils car ils sont faciles à lire en extérieur.
- ✓ Les compteurs de paillasse : peuvent être utilisés pour mesurer la conductivité en laboratoire. Ils sont généralement plus gros que les testeurs portables et sont capables d'obtenir des lectures plus précises.
- ✓ Des compteurs en ligne sont installés en permanence à certains endroits d'une ligne de production pour mesurer en temps réel les caractéristiques de la qualité de l'eau, y compris la conductivité.
- ✓ Les électrodes sont utilisées pour conduire des courants électriques afin de tester certaines propriétés des liquides (par exemple, leur conductivité). [10]

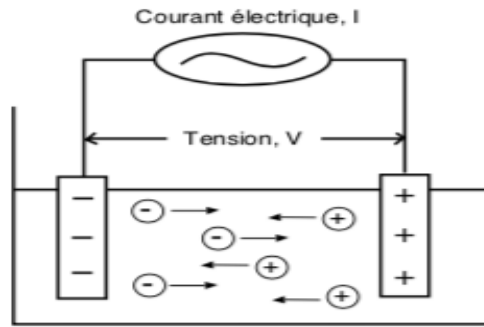


Figure 7 : La migration des ions en solution.

2.5.6. La solution conductrice :

La conductivité est typiquement mesurée dans des solutions aqueuses d'électrolytes.

Les électrolytes sont des substances qui contiennent des ions, c'est-à-dire des solutions de sels ioniques ou de composés qui s'ionisent en solution. Ce sont les ions formés dans la solution qui vont transporter le courant électrique. Les électrolytes, acides, bases et sels, peuvent être soit forts soit faibles. Les solutions les plus conductrices sont les solutions aqueuses puisque l'eau a la capacité de stabiliser les ions formés par un procédé appelé solvation. [9]

a. Electrolytes forts

Les électrolytes forts sont des substances qui sont entièrement ionisées en solution. Il en résulte que la concentration des ions en solution est proportionnelle à la concentration de l'électrolyte ajouté. Ils comprennent les solides ioniques et les acides forts, par exemple HCl.

Les solutions d'électrolytes forts sont conductrices car les ions positifs et négatifs peuvent migrer de manière très indépendante sous l'influence d'un champ électrique.

b. Electrolytes faibles

Les électrolytes faibles sont des substances qui ne sont pas entièrement ionisées en solution. Par exemple, l'acide acétique se dissocie partiellement en ions acétate et en ions hydrogène. Une solution d'acide acétique va donc contenir à la fois la molécule et les ions. Une solution d'électrolyte faible ne va pas aussi bien conduire l'électricité qu'un électrolyte fort. Ceci s'explique par le fait qu'il y a moins d'ions présents dans la solution pour transporter les charges d'une électrode à l'autre. [9]

2.5.7. Les paramètres qui influencent la mesure :

L'exactitude d'une mesure de conductivité peut être influencée par les paramètres ci-dessous :

a) Polarisation

Imposer un courant électrique à des électrodes en solution risque de provoquer une accumulation d'espèces ioniques à proximité de la surface de l'électrode et d'entraîner des réactions à la surface. Ceci va augmenter la résistance de polarisation à la surface de l'électrode, laquelle peut être considérée comme un élément parasite puisque l'on cherche à mesurer uniquement la résistance de la solution. Cette résistance de polarisation est responsable d'une erreur sur les résultats.

b) Contamination de la surface des électrodes

Un dépôt à la surface des électrodes d'une cellule à 2 pôles aura le même effet qu'une erreur de polarisation, soit une lecture de conductivité plus faible que la normale. Ces effets peuvent aussi être évités lorsqu'on travaille avec une cellule à 4 pôles.

c) Les erreurs dues à la géométrie – Effets de champ

Certaines erreurs sont dues aux effets de champ, c'est la partie du champ qui se trouve en dehors de l'espace géométrique défini par les 2 pôles de la cellule. Ces lignes de champ peuvent affecter la mesure si elles rencontrent un élément avec lequel elles vont interférer, par exemple les parois du bécher. Les cellules à 3 et 4 pôles ont une construction qui minimise cet effet. Lorsque l'intégralité du champ est contenue à l'intérieur du corps de la cellule, il n'y a plus de risque d'interférence avec les parois du bécher.

d) Changement de fréquence

On travaille à basse fréquence pour des conductivités faibles où la résistance de polarisation est négligeable comparée à la résistance de la solution. Ceci contribue également à réduire l'effet de capacitance du câble, lequel est plus important lorsque les conductivités sont faibles (solutions très résistives).

De hautes fréquences sont appliquées pour des conductivités fortes où la résistance de la solution est petite.

Dans la plupart des conductimètres, la fréquence est automatiquement augmentée lorsque la conductance de l'échantillon augmente elle-même, afin d'éviter les erreurs de polarisation pour les fortes conductivités.

e) La résistance du câble

Un câble d'une longueur donnée a une certaine résistance. La résistance du câble induit une erreur sur le résultat, il faut donc la prendre en compte.

Il faut compenser la résistance du câble dans les cas suivants :

- Solution de faible résistance (en dessous de 50 ohms), c'est-à-dire pour les mesures de forte conductivité,
- Mesures réalisées avec des cellules à 2 ou 3 pôles.

Note :

- La valeur de la résistance du câble est généralement indiquée par le fabricant.
- Avec les cellules à 4 pôles, la résistance du câble n'a aucune influence. Si, lors de la programmation du conductimètre, une valeur doit être indiquée, entrez zéro.

f) La capacitance du câble

Un câble blindé d'une longueur donnée a une certaine capacité. Lorsqu'on mesure des conductances faibles (inférieures à 4 μS), la capacitance du câble n'est pas négligeable et doit être prise en considération.

Il faut compenser la capacitance du câble dans les cas suivants :

- Utilisation d'une cellule à 4 pôles.
- Mesures de faibles conductivités.
- Si la capacitance du câble de la cellule de conductivité est supérieure à 350 pF.

Note : La capacité du câble est normalement indiquée par le fabricant. [8]

g) Influence de la température

La conductivité est dépendante de la température ; si la température augmente, la conductivité augmente aussi. Par exemple, pour une solution de KCl 0,01N la conductivité est de 1,273 mS/cm à 20 °C et elle augmente à 1,409 mS/cm à 25 °C.

Pour pouvoir comparer des résultats obtenus à différentes températures, on a introduit le concept de température de référence. La température de référence généralement utilisée est soit 20 °C soit 25 °C.

Le conductimètre mesure la conductivité et la température réelles puis, en utilisant un facteur de correction de température, il va convertir la valeur de la conductivité pour la ramener à la température de référence désirée et afficher le résultat obtenu.

Un résultat de conductivité doit toujours être associé à une température, sinon il n'est pas exploitable. La température pourra être la température de mesure ou la température de référence. [7]

Il existe différentes options pour effectuer une correction de température :

- La fonction linéaire.

- La fonction non linéaire applicable aux eaux naturelles d'après la norme ISO/DIN7888.
- Aucune correction.

Toute mesure de conductivité correcte nécessite l'utilisation d'une sonde de température séparée ou d'une cellule de conductivité avec une sonde de température intégrée.

Pour réaliser des mesures de conductivité de grande exactitude, il faut thermostatier l'échantillon afin d'avoir la même température lors de l'étalonnage et lors des mesures.

➤ **Correction linéaire de la température**

Pour les solutions de conductivité moyenne ou forte, il est possible de faire une correction de température basée sur une équation linéaire qui introduit le coefficient de température (θ). Ce coefficient est généralement exprimé comme une variation de la conductivité en %/°C.

On utilisera la correction de température linéaire par exemple pour les solutions salines, les acides et les solutions de percolation.

$$\kappa_{T_{ref}} = \frac{100}{100 + \theta \cdot (T - T_{ref})} \cdot \kappa_T$$

Où :

$\kappa_{T_{ref}}$: Conductivité à T_{ref} .

κ_T : Conductivité à T .

T_{ref} : Température de référence.

T : Température de l'échantillon.

θ : Coefficient de température.

Notez cependant que la correction ne reste utilisable que dans un intervalle de température limité entre T_1 et T_2 .

➤ **Détermination du coefficient de température (θ)**

On mesure la conductivité d'un échantillon à différentes températures ; à T_2 (proche de T_1) et à T_1 , en utilisant la formule suivante, on va déterminer le coefficient de température :

$$\theta = \frac{(\kappa_{T_2} - \kappa_{T_1}) \cdot 100}{(T_2 - T_1) \cdot \kappa_{T_1}}$$

Il faut choisir une température T_2 distante d'environ 10°C par rapport à T_1 et représentative de la température des échantillons.

Les coefficients de température peuvent être classés dans des intervalles selon la nature des électrolytes :

- Acides : $1,0 - 1,6 \text{ \%}/^\circ\text{C}$.
- Bases : $1,8 - 2,2 \text{ \%}/^\circ\text{C}$.
- Sels : $2,2 - 3,0 \text{ \%}/^\circ\text{C}$.
- Eau potable : $2,0 \text{ \%}/^\circ\text{C}$.
- Eau ultra pure : $5,2 \text{ \%}/^\circ\text{C}$.

Note : on a utilisé le coefficient de la température (θ) d'eau potable = $2,0\%/^\circ\text{C}$.

➤ **Correction non linéaire de la température**

Pour de nombreuses solutions, la correction linéaire de température n'est pas adaptée. Seule une formule non linéaire décrit de manière satisfaisante la variation de conductivité avec la température. C'est le cas pour les eaux naturelles (eaux souterraines, eaux de surface, eaux potables et eaux usées).

La conductivité $\kappa(T)$ mesurée à la température de l'échantillon T est ramenée à 25°C (nouvelle valeur de κ_{25}) à l'aide de l'équation suivante :

$$\kappa_{25} = f_{25}(T) \cdot \kappa_T$$

$f_{25}(T)$ est le facteur de correction de température utilisé pour convertir la conductivité de l'eau naturelle de la température T à la température de 25°C .

Ce facteur est calculé par le conductimètre à partir d'une équation décrite par la norme ISO/DIN7888 (WAGNER, R. Temperaturkorrekturfaktoren für die elektrische Leitfähigkeit von Wässern. Z. Wasser - Abwasser- forsch. (2) 1980")

La norme ISO/DIN7888 définit le domaine de validité dans lequel s'applique la correction non linéaire pour des mesures faites entre 0 et $35,9^\circ\text{C}$. [7]

h) Règles pour des mesures fiables :

En suivant ces règles très simples, vous réaliserez des mesures fiables :

✓ Etalonnez fréquemment

La valeur de la constante de cellule est un paramètre essentiel lors de mesures de conductivité. Il faut être absolument sûr de la valeur de la constante avant de démarrer les mesures.

La fréquence d'étalonnage va dépendre de l'application, des échantillons et des conditions de travail. Il est donc impossible de recommander un intervalle d'étalonnage. Celui-ci doit être déterminé au cas par cas.

Nous vous conseillons de vérifier régulièrement la constante de cellule. Ceci est encore plus vrai lorsque vous utilisez une cellule platinée, qui présente un risque plus important de contamination ou de modifications physico-chimiques du fait de la couche de platine.

✓ La température et les conditions d'agitation

Pour des mesures exactes, il est fortement recommandé de thermostatier.

Lors de l'étalonnage, assurez-vous pour que les conditions (température et agitation) sont aussi proches que possible des conditions de mesures.

Note : les mesures de conductivité sont données soit à la température de mesure, soit à une température de référence en utilisant un facteur de correction en température.

✓ Position de la cellule de conductivité

Assurez-vous que tous les pôles de la cellule sont bien immergés dans l'échantillon. Placez toujours les cellules à 2 pôles au centre du bécher de mesure.

✓ Mesures de faible conductivité

- Utilisez une cellule à circulation pour éviter toute contamination due au dioxyde de carbone présent dans l'air,
- Utilisez des cellules ayant une constante faible, 1 cm^{-1} ou inférieure,
- Utilisez des cellules non platinées, elles sont plus faciles à nettoyer et leur réponse est plus rapide,
- Assurez-vous que votre instrument est capable d'adapter la fréquence en fonction des conductivités à mesurer.

✓ Mesures de forte conductivité

- Utilisez des cellules platinées, de préférence à 4 pôles, pour éviter les erreurs de polarisation,
- Utilisez des cellules ayant une constante élevée, 1 cm^{-1} ou supérieure,
- Ne diluez pas vos échantillons pour les amener dans une gamme de mesures, à des niveaux élevés, la conductivité n'est pas proportionnelle à la concentration,
- Assurez-vous que votre instrument est capable d'adapter la fréquence en fonction des conductivités à mesurer. [9]

CHAPITRE II :

SERUM SALÉ

Sérum salé :**1. Généralités :**

Le sérum salé est une solution transparente, légèrement salée. Isotonique, il partage avec les fluides du corps (notamment le sang) un même équilibre dans sa composition.

Il est donc parfaitement toléré par les cellules du corps humain. C'est pourquoi il est couramment utilisé lors d'actes chirurgicaux, ou dans des poches de perfusion. Il est également présent dans certaines prothèses mammaires, afin d'éviter un risque de réaction en cas d'épanchement ou de rupture de la prothèse.

2. Composition :

- Chlorure de sodium (0,9 g)
- Eau purifiée qsp 100 mL.
- Ne contient pas de conservateur. [11]

3. Propriétés physicochimiques du chlorure de sodium :

Masse molaire : 58,443 g/mol.

Densité : 2,17. [12]

Solubilité :

- Facilement soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'éthanol anhydre. [13]

Aspect :

- Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, ou cristaux incolores, ou perles blanches ou sensiblement blanches. [13]
- Non explosif.
- Non inflammable.
- Température de fusion : 801° C.
- Température d'ébullition : 1413° C.
- Densité (H₂O=1) à 25° C : 2,17.
- Densité de vapeur : 0,1 kPa (1mm Hg°).

- PH (50g/ L⁻¹ d'eau à 20 ° C) ≈ 6. [14]

4. Structures cristallines usuelles :

Il est constitué de cations sodium (Na⁺) et d'anions chlorure (Cl⁻) qui s'assemblent par interactions électrostatiques en une structure périodique où chaque cation est entouré de manière symétrique par six anions (*un octaèdre*). Ce sont les rayons X qui permettent de décrire cette structure cristalline et de mesurer la distance qui sépare le cation Na⁺ de l'anion Cl⁻. [15]

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Cn						

Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr

Figure 8 : position de Na et Cl dans le tableau périodique.

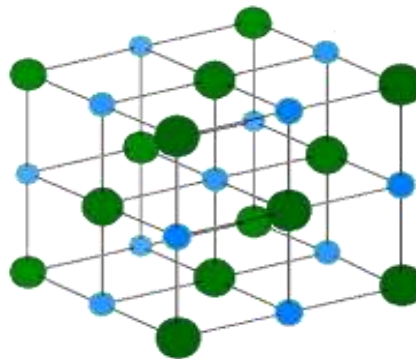


Figure 9 : Structure cristallines du NaCl.

Le réseau de Bravais est cubique à faces centrées. Le motif dans la maille primitive est constitué d'une seule molécule, à savoir un ion Cl⁻ réparti sur les sommets de la maille (chacun des huit ions participe à huit mailles adjacentes, et donc contribue pour un huitième), et un ion Na⁺ placé au centre. [16]

5. Monographie du chlorure de sodium :

5.1. DÉFINITION

Teneur : 99,0 pour cent à 100,5 pour cent (substance desséchée).

5.2. IDENTIFICATION

- A. Le chlorure de sodium donne les réactions des chlorures (2.3.1).
- B. Le chlorure de sodium donne les réactions du sodium (2.3.1).

5.3. ESSAI

Si le chlorure de sodium est sous forme de perles, concassez grossièrement ces perles pour effectuer les essais.

Solution S. Dissolvez 20,0 g de chlorure de sodium dans de l'eau exempte de dioxyde de carbone R préparée à partir d'eau distillée R et complétez à 100,0 ml avec le même solvant.

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

Acidité ou alcalinité. A 20 ml de solution S, ajoutez 0,1 ml de solution de bleu de bromo-thymol R1. Le virage de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,5 ml d'acide chlorhydrique 0,01 M ou d'hydroxyde de sodium 0,01 M.

Bromures : au maximum 100 ppm. A 0,5 ml de solution S, ajoutez 4,0 ml d'eau R, 2,0 ml de solution de rouge de phénol R2 et 1,0 ml de solution de chloramine R à 0,1 g/l et mélangez immédiatement.

Après exactement 2 min, ajoutez 0,15 ml de thiosulfate de sodium 0,1 M, mélangez et complétez à 10,0 ml avec de l'eau R. L'absorbance (2.2.25) de la solution, mesurée à 590 nm, n'est pas supérieure à celle d'une solution préparée simultanément et dans les mêmes conditions en utilisant 5,0 ml d'une solution de bromure de potassium R à 3,0 mg/l.

Utilisez l'eau R comme liquide de compensation.

Ferrocyanures. Dissolvez 2,0 g de chlorure de sodium dans 6 ml d'eau R. Ajoutez 0,5 ml d'un mélange de 5 ml d'une solution de sulfate ferrique et d'ammonium R à 10 g/l dans une solution d'acide sulfurique R à 2,5 g/l et de 95 ml d'une solution de sulfate ferreux R à 10 g/l. Il ne se développe pas de coloration bleue dans les 10 min qui suivent.

Iodures. Humectez, goutte à goutte, 5 g de chlorure de sodium avec un mélange récemment préparé de 0,15 ml de solution de nitrite de sodium R, de 2 ml d'acide sulfurique 0,5 M, de 25 ml de solution d'amidon exempt de iode R et de 25 ml d'eau R. Après 5 min, examinez à la lumière du jour. Le mélange ne présente pas de coloration bleue.

Nitrites. A 10ml de solution S, ajoutez 10ml d'eau R. L'absorbance (2.2.25) est au maximum de 0,01 à 354 nm.

Phosphates (2.4.11) : au maximum 25 ppm. Prélevez 2 ml de solution S et complétez à 100 ml avec de l'eau R.

Sulfates (2.4.13) : au maximum 200 ppm. Prélevez 7,5 ml de solution S et complétez à 30 ml avec de l'eau distillée R.

Aluminium (2.4.17) : au maximum 0,2 ppm, si le chlorure de sodium est destiné à la préparation de solutions pour hémodialyse, hémofiltration ou dialyse péritonéale.

Solution prescrite. Dissolvez 20,0 g de chlorure de sodium dans 100 ml d'eau R et ajoutez 10 ml de solution tampon acétate pH 6,0 R.

Solution témoin.

Mélangez 2 ml de solution à 2 ppm d'aluminium (Al) R, 10 ml de solution tampon acétate pH 6,0 R et 98 ml d'eau R.

Solution à blanc.

Mélangez 10 ml de solution tampon acétate pH 6,0 R et 100 ml d'eau R.

Arsenic (2.4.2, Procédé A) : au maximum 1 ppm, déterminé sur 5 ml de solution S.

Baryum. A 5 ml de solution S, ajoutez 5 ml d'eau distillée R et 2 ml d'acide sulfurique dilué R. Après 2 h, si la solution présente une opalescence, celle-ci n'est pas plus prononcée que celle d'un mélange de 5 ml de solution S et de 7 ml d'eau distillée R.

Fer (2.4.9) : au maximum 2 ppm, déterminé avec la solution S.

Préparez le témoin avec un mélange de 4 ml de solution à 1 ppm de fer (Fe) R et 6 ml d'eau R.

Magnésium et métaux alcalino-terreux (2.4.7) : au maximum 100 ppm, calculé en Ca et déterminé sur 10,0 g de chlorure de sodium.

Utilisez 150 mg de mélange composé au mordant noir 11 R. Le volume d'acétate de sodium 0,01 M utilisé est au maximum de 2,5 ml.

Potassium : au maximum $5,00 \times 10^2$ ppm, si le chlorure de sodium est destiné à la préparation de formes pharmaceutiques administrées par voie parentérale ou à la préparation de solutions pour hémodialyse, hémofiltration ou dialyse péritonéale.

Spectrométrie d'émission atomique (2.2.22, Procédé I).

Solution à examiner. Dissolvez 1,00 g de chlorure de sodium dans de l'eau R et complétez à 100,0 ml avec le même solvant.

Solutions de référence. Dissolvez dans de l'eau R 1,144 g de chlorure de potassium R, desséché au préalable à 100-105 °C pendant 3 h, et complétez à 1000,0 ml avec le même solvant (600 µg de K par millilitre). Diluez autant que nécessaire.

Longueur d'onde : 766,5 nm.

Métaux lourds (2.4.8) : au maximum 5 ppm. 12 ml de solution S satisfont à l'essai A. Préparez la solution témoin avec la solution à 1 ppm de plomb (Pb) R.

Perte à la dessiccation (2.2.32) : au maximum 0,5 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de chlorure de sodium.

Endotoxines bactériennes (2.6.14) : moins de 5 UI/g, si le chlorure de sodium est destiné à la préparation de formes pharmaceutiques administrées par voie parentérale sans autre procédé approprié d'élimination des endotoxines bactériennes.

5.4. DOSAGE

Dissolvez 50,0 mg de chlorure de sodium dans de l'eau R et complétez à 50 ml avec le même solvant. Titrez par le nitrate d'argent 0,1 M. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (2.2.20). 1 ml de nitrate d'argent 0,1 M correspond à 5,844 mg de NaCl.

5.5. ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

— dans les cas appropriés, que la substance convient à la préparation de formes pharmaceutiques administrées par voie parentérale,

— dans les cas appropriés, que la substance convient à la préparation de solutions pour hémodialyse, hémofiltration ou dialyse péritonéale. [13]

6. CHLORURE DE SODIUM 0,9 %, solution pour perfusion

6.1. Formes et présentations

Solution pour perfusion. Liquide limpide, incolore exempt de particules visibles, Osmolarité 308 mOsm/L, pH compris entre 4,5 et 7.

6.2. Composition

0,9 g Pour 100 ml de solution pour perfusion.

Excipients : Eau pour préparations injectables. [11]

6.3. Indications

- Rééquilibration ionique par apport de chlorure et de sodium ;
- Déshydratation extracellulaire ;

- Hypovolémie ;
- Véhicule ou diluant de médicaments compatibles pour administration parentérale. [11]

6.4. Contre-indications

- Hyperchlorémie
- Hypermnatrémie
- Cas sévères d'inflation hydrique et de rétention hydro-sodée, particulièrement en cas d'insuffisance cardiaque décompensée, d'insuffisance hépatique décompensée (insuffisance œdémato-ascitique des cirrhoses), de prééclampsie/éclampsie. [11]

6.5. Les effets indésirables

Classe de systèmes d'organe (SOC)	Effets indésirables (Termes MedDRA)	Fréquence
Affections du système nerveux	Tremblements	Indéterminée
Troubles du métabolisme et de la nutrition	Hypervolémie Hypermnatrémie Acidose métabolique hyperchlorémique	Indéterminée
Affections de la peau et du tissu sous-cutané	Urticaire Eruption cutanée Prurit	Indéterminée
Affections vasculaires	Thrombose veineuse Thrombophlébite Hypotension	Indéterminée
Troubles généraux et anomalies au site d'administration	Frissons Fièvre Infection au niveau du site de perfusion Irritation au site de perfusion Extravasation Réaction locale Douleur localisée* Nécrose/ulcère*	Indéterminée

Lorsque CHLORURE DE SODIUM 0,9 % LAVOISIER, solution pour perfusion, est utilisé comme véhicule ou diluant pour des préparations injectables d'autres médicaments, d'autres effets indésirables associés au(x) médicament(s) ajouté(s) à la solution peuvent survenir. [11]

6.6. Pharmacodynamie

Classe pharmacothérapeutique : SOLUTIONS D'ELECTROLYTES ; Code ATC : B05XA03 (B : sang et organes hématopoïétiques)

CHLORURE DE SODIUM 0,9 % LAVOISIER, solution pour perfusion, est une solution isotonique dont l'osmolarité est d'environ 308 mOsm/l.

Les propriétés pharmacodynamiques de la solution sont celles des ions sodium et chlorure, qui maintiennent l'équilibre hydroélectrolytique.

Les ions tels que le sodium circulent à travers la membrane cellulaire, en utilisant des mécanismes de transport variés, parmi lesquels la pompe à sodium (Na^+ , K^+ -ATPase). Le sodium joue un rôle important dans la neurotransmission et l'électrophysiologie cardiaque, ainsi que dans le métabolisme rénal.

En cas d'ajout de médicament, la pharmacodynamie de la préparation dépendra aussi du médicament ajouté. [11]

6.7. Pharmacocinétique

Absorption

Etant donné que le chlorure de sodium est administré par voie intraveineuse, son absorption est complète, soit de 100 %.

Elimination

Les ions sodium et chlorure sont excrétés principalement dans les urines. De faibles quantités de sodium sont éliminées dans les fèces et la sueur.

En cas d'ajout de médicament, la pharmacocinétique de la préparation dépendra aussi du médicament ajouté. [11]

6.8. Durée de conservation

Avant ouverture :

- Flacon et ampoule (verre incolore) : 5 ans.
- Flacon (polyéthylène) : 3 ans
- Ampoule (PP) : 3 ans.
- Poche (PP) de 50 ml : 2 ans.
- Poche (PP) de 100 ml, 250 ml, 500 ml, et 1 000 ml : 3 ans.

Durée de conservation lors de l'utilisation :

Après ouverture/dilution, le produit doit être utilisé immédiatement.

6.9. Précaution particulière de conservation

- Flacon et ampoule (verre incolore) : Ce médicament ne nécessite pas de précautions particulières de conservation avant ouverture. [11]
- Ampoule (polypropylène) : A conserver à une température ne dépassant pas 25 °C.
- Poche (PP) : A conserver à une température ne dépassant pas 25 °C. [11]

CHAPITRE III :

**LA VALIDATION
ANALYTIQUE**

1. Méthode d'analyse

La méthode d'analyse est la manière dont une analyse est réalisée. Chaque étape doit être décrite en détail. Il faut décrire notamment, mais non exclusivement, la préparation de l'échantillon, de l'étalon de référence et des réactifs, l'utilisation des appareils, la production de la courbe d'étalonnage, l'application des formules de calcul, etc. (ICH Q2R1) [18]

2. Cycle de vie d'une méthode analytique :

Comme tout processus, les méthodes d'analyse naissent, évoluent et disparaissent ; ce périple peut être résumé sous la forme d'un **cycle de vie**, concept déjà largement employé dans l'approche système. La figure 10 résume le cycle de vie d'une méthode d'analyse. Par convention, on a représenté les étapes principales et sous-étapes dans des rectangles et les outils associés comme des ellipses.

Étape 1 : Sélection de la méthode :

D'abord il faut sélectionner une technique analytique, c'est-à-dire choisir parmi les diverses méthodes publiées dans la littérature celle qui, *a priori*, permettra de résoudre le problème analytique posé. Cette démarche repose entièrement sur le savoir-faire et l'expertise du laboratoire. Selon le Cofrac (Comité français d'accréditation), on peut distinguer trois types de méthodes, mais cette distinction ne signifie pas que le besoin de validation soit différent :

- Les méthodes normalisées ;
- Les méthodes adaptées de normes ou de textes de référence ;
- Les méthodes développées par le laboratoire.

Étape 2 : Développement de la méthode :

Ensuite, il convient de mettre au point la méthode, c'est-à-dire optimiser les étapes du mode opératoire pour les adapter à la matrice et aux conditions pratiques où elle sera utilisée. En particulier, il faut préciser l'ensemble des matrices auxquelles elle s'applique ainsi que la gamme de concentrations utilisables. En général, le développement d'une méthode est synonyme d'optimisation. Pour cela la méthodologie de la surface de réponse est maintenant largement reconnue comme l'approche la mieux adaptée à cet objectif. Si la méthode est « indirecte », une première tâche est d'établir un modèle d'étalonnage. Cependant, il existe aussi de nombreuses méthodes quantitatives « directes » qui ne requièrent pas d'étalonnage. Un point important est aussi de vérifier l'existence d'éventuelles interférences. Dans certains cas favorables, un seul plan d'expérience suffit pour optimiser les conditions opératoires et évaluer les interférences. L'étape finale consiste à rédiger le mode opératoire retenu sous la forme de ce

qu'on appelle dans le cadre des Bonnes pratiques de laboratoires (BPL) un mode opératoire normalisé ou *Standard Operating Procedure* (SOP).

Validation de la méthode. La validation ne doit intervenir que sur une méthode complètement mise au point. Son but est de démontrer que la méthode employée permet effectivement d'atteindre les objectifs de performance exigés par un client. On distingue classiquement deux types de validation :

Étape 3 : Validation intra-laboratoire ou interne :

Elle est conduite dans un seul laboratoire.

Étape 4 : Validation inter-laboratoires ou externe.

Elle n'intéresse, en principe, que les méthodes utilisées par plusieurs laboratoires dont les résultats servent lors d'échanges commerciaux ou de contrôles officiels ; on peut la considérer comme optionnelle. L'issue de la validation, le mode opératoire peut évoluer mais, surtout, on peut le compléter des performances effectivement constatées de la méthode. **Estimation de l'incertitude et vérification d'aptitude.** C'est un concept relativement récent en chimie analytique, largement repris dans la norme ISO/CEI 17025 :2005 : la nouvelle exigence d'estimation de l'incertitude de mesure revêt une importance particulière pour les laboratoires accrédités.

Étape 5 : Utilisation en routine.

La vie de la méthode se poursuit par son utilisation en routine. L'obligation de maîtrise de la qualité implique un contrôle des performances dans le temps. Pour effectuer ce contrôle, il existe des outils spécifiques que sont les cartes de contrôle et les essais d'aptitude.

Étape 6 : Revalidation.

Ensuite, après un certain temps d'utilisation, on peut être amené à apporter des améliorations qui, selon leur importance, amènent à une revalidation plus ou moins complète. [19]

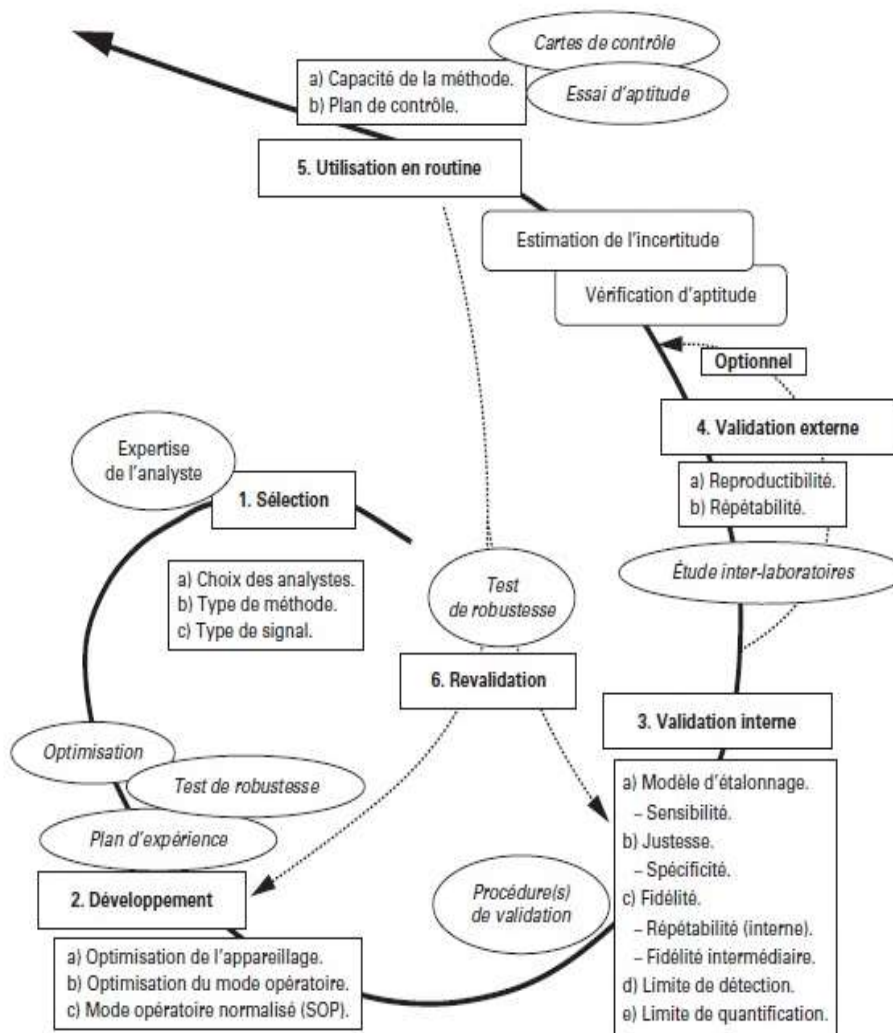


Figure 10 : Cycle de vie d'une méthode d'analyse. [34]

3. Pourquoi devrais-je valider les méthodes d'analyse que j'utilise ?

L'étape de validation est indispensable pour des gens réalisant des dosages de manière très répétitive, devant en particulier garantir la validité du résultat à un tiers (prestation de service). Elle est aussi particulièrement intéressante pour tout développement de méthode car elle va permettre de déterminer si la méthode choisie est apte donner un résultat avec l'incertitude nécessaire ou demandée (elle permet en outre de mettre l'accent sur les étapes à améliorer). [34]

4. L'objectif de la validation :

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

fonction de la finalité de la procédure. Le but est de minimiser le risque tant au niveau du producteur que du futur consommateur. Par conséquent, l'objectif de la validation n'est pas simplement, contrairement à ce que la pratique courante pouvait laisser entrevoir, d'obtenir des estimateurs du biais et de la fidélité. Toutefois, il n'en reste pas moins que ces paramètres, comme nous l'avons déjà signalé, sont des éléments indispensables à l'établissement des garanties précitées. [17]

À la lecture de cet objectif, deux notions fondamentales se dégagent, celles de :

- « Suffisamment proche », signifiant, par exemple, que la mesure réalisée en routine sera à moins de x% (x se rapporte à la limite d'acceptation λ) de sa « vraie valeur » inconnue.
- « Garanties », signifiant qu'il est très probable que, quelle que soit la mesure, elle sera suffisamment proche de la vraie valeur inconnue. [21]

Selon ICH Q2A : « L'objectif de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle est appropriée à l'usage auquel elle est destinée. » [22]

La validation étant une étape obligatoire et primordiale dans le cycle de vie d'une méthode analytique, de nombreux textes réglementaires constituant des références légales à portée régionale ou internationale ont été édictés par différentes bases réglementaires.

5. Définition :

Selon NF EN ISO / CEI 17025 : Validation des méthodes : Confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies ". [23]

Selon la norme U47-600-1 : cette confirmation « consiste à comparer les valeurs des critères de performance déterminées au cours de l'étude de caractérisation de la méthode à celles attendues ou assignées au préalable (limites d'acceptabilité, objectifs à atteindre), puis à déclarer la méthode d'analyse valide ou non valide ». [24]

Selon les bonnes pratiques de fabrication (BPF version 2003) : la validation est « l'établissement de la preuve, en conformité avec les principes de BPF, que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés ».

Selon ISO 8402 : la validation est « la confirmation par examen et apport de preuves tangibles que les exigences particulières pour un usage spécifique prévu sont satisfaites ». [25]

Selon l'FDA : la validation est « l'établissement de l'évidence documentée qui prouve un haut degré d'assurance qu'un processus spécifique produira de façon constante un produit conforme avec ses spécification prédéterminées et les attributs de la qualité ».

Selon le vocabulaire international de métrologie, la Validation est une Vérification, où les exigences spécifiées sont adéquates pour un usage déterminé. [26]

EXEMPLE

Une procédure de mesure, habituellement utilisée pour le mesurage de la concentration en masse d'azote dans l'eau, peut aussi être validée pour le mesurage dans le sérum humain.

La validation rentre dans le cadre général des vérifications et s'applique aux méthodes et procédures de mesure. En revanche, le terme « validation » ne s'applique pas aux résultats de mesure. [26]

La validation d'une méthode de mesure correspond donc à l'apport de preuve objective démontrant que cette méthode a des performances suffisantes pour répondre aux besoins du client. En conséquence, avant toute utilisation dans un laboratoire donné, une méthode de mesure doit être validée.

Pour cela, les caractéristiques de la méthode de mesure doivent être étudiées et confrontées avec les besoins du client. [27]

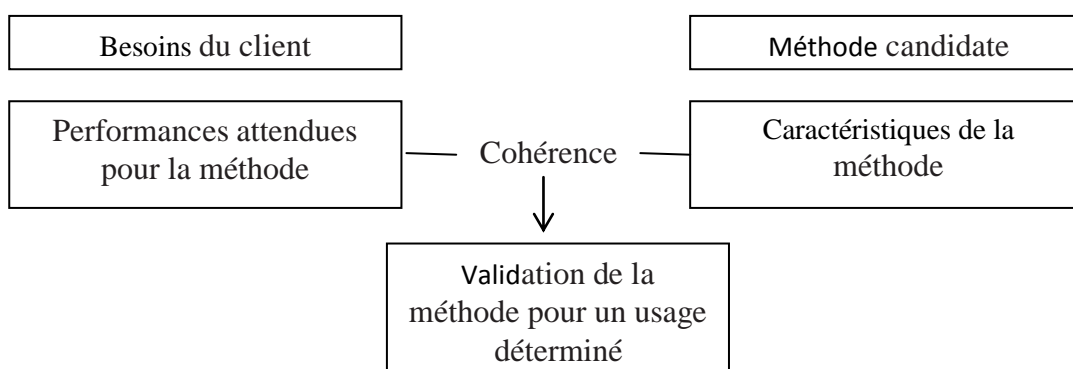


Figure 11 : La validation d'une méthode d'analyse. [27]

Selon toutes ces définitions, la validation requiert trois éléments indispensables :

1. La collecte de preuves objectives qui pourront être exprimées sous la forme de critères relatifs à la fidélité (répétabilité, reproductibilité, limite de quantification, ...) et à la justesse (biais, spécificité, ...). Dans beaucoup de publications, la validation s'arrête à ce simple niveau.

2. La fixation d'exigences en vue d'une utilisation prévue qui doivent être définies à l'avance sous la forme d'un critère d'acceptabilité. C'est là le point le plus délicat dans la me-

sure où ce n'est pas encore une pratique courante pour beaucoup d'utilisateurs d'analyse. Par exemple, si une limite maximum en résidu (LMR) est fixée à 1 mg/kg, peut-on considérer que la détermination de cette quantité avec un niveau d'acceptabilité (et non pas une incertitude) de + 5% peut produire un risque supplémentaire pour la santé publique ou bien peut-on accepter un niveau de + 20 % ? C'est au toxicologue à le dire et non pas à l'analyste.

3. Le calcul d'un « degré de confiance » qui permet de confirmer ou infirmer le fait que les exigences sont atteintes. La plupart des guides de validation proposent de faire des tests d'hypothèses pour établir ce degré de confiance (cette façon de faire ne permet pas d'assurer un niveau de confiance correct). Il existe d'autres façons de confronter preuves et exigences : par exemple, un examen visuel de graphiques, un calcul statistique ou **une** décision d'experts. Le profil d'exactitude, est une méthodologie simple et efficace, pensons-nous, pour établir ce niveau de garantie. [28]

6. Le contexte réglementaire de la validation des méthodes analytiques :

6.1. BPF : Bonne Pratiques de Fabrication

L'OMS définit les bonnes pratiques de fabrication (BPF) comme étant « un des éléments de l'assurance de la qualité, elles garantissent que les produits sont fabriqués et contrôlés de façon uniforme et selon des normes de qualité adaptées à leur utilisation et spécifiées dans l'autorisation de mise sur le marché ». [29]

La validation dans le cadre des BPF consiste à s'assurer que les établissements, leurs systèmes, leur matériel, les procédés et les méthodes d'essai sont bien contrôlés pour pouvoir fabriquer uniformément des produits de qualité.

On retrouve la notion de validation analytique dans plusieurs chapitres de BPF : [30]

Chapitre 1. Gestion de la qualité

1.2. Assurance de la qualité :

V. tous les contrôles nécessaires des produits intermédiaires ont bien été réalisés, de même que tous les contrôles en cours de fabrication et toutes les validations.

Chapitre 2 : Personnel

2.6. Le chef du département du contrôle de la qualité assume généralement les tâches suivantes :

VII. s'assurer de la réalisation des validations nécessaires.

Chapitre 4 : Documentation

4.26. Les équipements importants ou essentiels doivent être accompagnés d'un "cahier de route" mentionnant, selon le cas, toutes les validations, les étalonnages, les opérations d'en-

retien, de nettoyage ou de réparation, avec les dates et le nom des personnes ayant effectué ces opérations.

Chapitre 6 : Contrôle qualité

6.2. Les principales fonctions attribuées au responsable du contrôle de la qualité sont résumées au chapitre 2. Le département du contrôle de la qualité a dans son ensemble d'autres attributions telles que l'établissement, la validation et la mise en œuvre des procédures du contrôle de la qualité.

6.2. USP et FAD

Le concept de la validation des méthodes analytiques dans le contrôle des médicaments est le résultat de deux démarches quasi concomitantes entreprises à l'origine aux Etats-Unis, d'une part par les fabricants du médicament et les représentants de l'USP, et d'autre part par les autorités d'enregistrement.

Ces travaux initiés respectivement en 1985 par les premiers et en 1987 par les autorités de régulation vont être concrétisées par un texte inclus dans l'USP XXI repris par l'USP XXII pour application officielle dès 1990 et par des « guidelines » éditées au **chapitre 21** de " Code of Federal Regulation " (CFR).

- Pharmacopeial Forum - current concept for the validation of compendial assays (1986 + Current revision).
- Federal Code of Regulations - Guidelines for submitting samples and analytical data for method evaluation (21CFR 10.90, 1987).
- Pharmacopeial Forum - Validation of compendial assays - Guidelines (1988) USP XXI (1989) and XXII (1990).

Les normes pharmaceutiques de l'USP sont exécutoires dans les Etats-Unis par la Food and Drug Administration (FDA).

- FDA: Center for Drug Evaluation and research – Validation of chromatographic methods - Reviewer guidance (1994).
- FDA - CDER Draft - Analytical procedure and method validation. [31]

6.3. ICH : Conférence Internationale d'Harmonisation

En 1990, un cycle de conférences ayant pour but l'harmonisation des réglementations a été conjointement initié et organisé par les autorités d'enregistrement américaines, japonaises et européennes : International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Son objectif est d'émettre des recommandations pour réaliser une plus grande harmonisation dans l'interprétation et

l'application des directives techniques et des conditions pour l'enregistrement de produits pharmaceutiques, réduisant de ce fait la duplication des essais effectués pendant la recherche et le développement des nouvelles molécules tout en maintenant toutes les précautions relatives à la qualité, l'efficacité et la sécurité des produits.

L'harmonisation est réalisée par le développement des directives tripartites d'ICH (guidelines ICH) qui portent sur quatre thèmes : [32]

Tableau 1 Les domaines d'application de l'ICH.

<i>Catégorie de la directive</i>	<i>Domaine</i>	<i>Sujet</i>
<i>Q</i>	<i>Qualité</i>	<i>Assurance de la qualité chimique et pharmaceutique</i>
<i>S</i>	<i>Sécurité</i>	<i>Etudes précliniques</i>
<i>E</i>	<i>Efficacité</i>	<i>Etudes cliniques</i>
<i>M</i>	<i>Multidisciplinaire</i>	<i>Thèmes transversaux (terminologie médicale, CTD, ...)</i>

L'ICH a publié des nombreux textes dont deux dédiés à la validation des procédures analytiques :

• **ICH-Q2 : « Analytical Validation »**

1/ ICH Q2A : *Text on Validation of Analytical Procedures "Definitions and Terminology"* (1995) : Ce texte Présente une discussion sur les caractéristiques qui doivent être prises en compte au cours de la validation des méthodes analytiques.

2/ ICH Q2B: *Text on Validation of Analytical Procedures " Methodology"* (1997):

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

En 2005 La ligne directrice parente est rebaptisée **Q2 (R1)** dans laquelle la ligne directrice Q2B « methodology » a été incorporée dans la directive mère. Le nouveau titre est « *Validation des procédures analytiques : texte et méthodologie* » (*Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*) [32]

6.4. ISO : Organisation internationale de normalisation

L'Organisation Internationale de Normalisation (ISO) est une fédération d'organismes nationaux de normalisation fondée en 1947 et comprenant plus de 140 pays. A ce jour, l'ISO a élaboré près de 19 500 normes internationales volontaires, sur la base du consensus, dans presque tous les domaines, afin de faciliter la coordination et l'unification internationales des normes industrielles.

Les normes ISO 5725 et ISO 17025 présentent les définitions relatives à la validation :

ISO 5725 : Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure.

ISO/IEC 17025 (2005) : Exigence générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. [33]

6.5. Le guide de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP) :

Il existe des documents officiels qui définissent les critères de validation à tester, mais Ils ne proposent pas d'approches expérimentales et se limitent, le plus souvent, au concept généraux. et c'est la raison pour laquelle, deux commissions SFSTP ont élaborés des guides de validation dans le but d'aider les industriels de médicaments à valider respectivement leur procédure d'analyse pharmaceutique et biopharmaceutique :

a. Guide de 1992 pour les analyses des spécialités pharmaceutiques :

Il à aider a progressé la validation des procédures de dosage. Cependant, il ressort des commentaires qu'il présente des faiblesses par rapport à l'objectif visé.

b. Guide de 1997 pour les analyses en milieu biologiques :

Il présente aussi une confusion entre les règles de diagnostic et de décision.

c. Le présent guide : rédigé par une nouvelle commission SFSTP :

Il offre un outil pratique de décision prenant en considération les remarques précédentes et reposant sur l'utilisation de l'erreur totale (biais+écart type) associé à la procédure. il propose un consensus sur les normes communément admises en incorporant largement la terminologie ISO. Il présente également une stratégie de planification expérimentale pour la validation des procédures de dosage.

➤ Objectif du guide :

- Proposer une démarche harmonisée de validation applicable aux différents procédures analytiques quantitatives, et ce indépendamment du secteur d'activité.

- Propose de revoir les bases mêmes de la validation analytique pour une démarche harmonisée, en distinguant notamment les règles de diagnostic et les règles de décision.
 - Repose sur l'utilisation du profil d'exactitude, basé sur la notion d'erreur totale (biais+écart type), permettant de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique en contrôlant le risque associé à son utilisation. [34]
- Avantages des démarches proposées par le guide SFSTP :

La démarche proposée par la commission SFSTP évite les écueils précédemment rencontrés :

- Utilisation inadéquate ou exagérée de tests statistiques conduisant à la prise de décision parfois « aberrantes ».
- Calcul des limites de quantification variables selon la technique utilisée.

La démarche proposée par la commission SFSTP est :

- Indépendante du secteur d'activité.
- Indépendante de la procédure (dosage chimiques, biologie ...).
- Indépendante de la matrice.

La méthode proposée utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision permet donc une harmonisation des différentes approches de validation. [34]

7. Type de validation :

On distingue classiquement entre deux types de validation :

7.1. La validation inter-laboratoires

Souvent lourde à réaliser- n'intéresse en principe que les méthodes qui sont utilisées par plusieurs laboratoires ou dont les résultats servent lors d'échanges commerciaux ou de contrôles officiels. C'est pourquoi, on peut la considérer comme optionnelle. Par exemple, dans l'industrie pharmaceutique, il est inutile (voire impossible) de procéder à la validation inter-laboratoires d'une méthode qui ne sert en interne qu'à l'étude d'une molécule, non encore mise sur le marché. Par contre, dans les industries agroalimentaires, il faut toujours procéder à une validation inter-laboratoires pour une méthode qui sert à mesurer la conformité d'une denrée lors d'un échange commercial. Dans ce cas, il peut y avoir une contre-expertise et, pour interpréter les résultats des contrôles, il importe de savoir selon quelle amplitude deux résultats fournis par deux laboratoires indépendants peuvent « normalement » différer. L'outil d'excellence pour une validation inter-laboratoires est l'analyse inter-laboratoires qui permet de calculer des limites de répétabilité et de reproductibilité. Ces deux critères ne sont que des

caractéristiques de performance et il convient de les confronter à des objectifs pour effectivement dire que la méthode est valide.

7.2. La validation intra-laboratoire ou interne (*in house –validation*)

La plus universelle car requise pour toutes les méthodes. Elle s'applique à toute nouvelle méthode qui a été développée par le laboratoire. L'extension de la démonstration est la même qu'il s'agisse de méthodes dérivées de méthodes normalisées ou de méthodes originales. [28]

8. Critères de validation :

8.1. Spécificité :

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité d'établir l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants présents. Il s'agit de démontrer que la substance analysée au sein de la matrice est bien l'analyte recherché. Très souvent la spécificité se fonde sur une absence d'interférences.

Lorsque l'on ne peut pas évaluer l'influence de chaque constituant de la matrice, une technique commode d'emploi permettant d'évaluer l'influence de certaines interférences est la méthode des ajouts dosés. Elle consiste à ajouter à l'échantillon avant, pendant, ou après sa préparation des quantités connues de l'analyte. On examine alors si la réponse de l'instrument de mesure correspond au signal initial augmenté du signal correspondant à la quantité ajoutée.[26]

8.2. Sélectivité :

Propriété d'un **système de mesure**, utilisant une **procédure de mesure** spécifiée, selon laquelle le système fournit des **valeurs mesurées** pour un ou plusieurs **mesurandes**, telles que les valeurs de chaque mesurande sont indépendantes des autres mesurandes ou d'autres **grandeurs** dans le phénomène, le corps ou la substance en cours d'examen. [26]

8.3. Sensibilité

La sensibilité d'une méthode représente la pente de la droite d'étalonnage, si la courbe d'étalonnage n'est pas une droite, dans ce cas la sensibilité à une concentration donnée sera définie comme la pente de la tangente à la courbe à cette concentration. Il est clair que plus la sensibilité sera élevée plus il sera facile de distinguer deux échantillons de concentration voisine. Il apparaît également qu'une augmentation de la sensibilité permettra d'obtenir des

limites de détection ou de quantification plus basses. La sensibilité à une concentration donnée correspond au rapport de la variable de la grandeur mesurée à la valeur correspondante de la concentration de l'élément à doser.

Deux types de sensibilité sont généralement définis : la sensibilité analytique et la sensibilité diagnostique. La différence entre ces deux sensibilités repose là-encore sur l'origine du support utilisé. Pour la sensibilité analytique, les supports sont des supports de référence et pour la sensibilité diagnostique, les supports sont issus du terrain. [26]

8.4. Linéarité :

Linéarité d'un système de mesure : aptitude à fournir des valeurs mesurées qui sont directement proportionnelles à la valeur du mesurande de l'échantillon.

Linéarité d'une méthode de mesure (NF V03-110) : établissement qu'il existe une relation linéaire entre les quantités retrouvées (ou quantifiées) dans des échantillons et leur valeur de référence. [35]

8.5. Justesse

Étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence

NOTE 1 La justesse de mesure n'est pas une grandeur et ne peut donc pas s'exprimer numériquement, mais l'ISO 5725 donne des caractéristiques pour l'étroitesse de l'accord.

NOTE 2 La justesse de mesure varie en sens inverse de l'erreur systématique mais n'est pas liée à l'erreur aléatoire.

NOTE 3 Il convient de ne pas utiliser « exactitude de mesure » pour la justesse de mesure. (14)

NOTE4 La mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de biais. [26]

8.6. Fidélité

Fidélité de mesure ou fidélité (VIM 2.15) : étroitesse de l'accord entre les indications ou les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées

NOTE 1 La fidélité est en général exprimée numériquement par des caractéristiques telles que l'écart-type, la variance ou le coefficient de variation dans les conditions spécifiées.

NOTE 2 Les conditions spécifiées peuvent être, par exemple, des conditions de répétabilité, des conditions de fidélité intermédiaire ou des conditions de reproductibilité (voir l'ISO 5725-1 :1994).

NOTE 3 La fidélité sert à définir la répétabilité de mesure, la fidélité intermédiaire de mesure et la reproductibilité de mesure.

NOTE 4 Le terme « fidélité de mesure » est quelquefois utilisé improprement pour désigner l'exactitude de mesure.

Si les indications ou les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés sont voisines, c'est que leur dispersion est faible, ce qui traduit une bonne fidélité de mesure.

La fidélité de mesure est une qualité qui s'applique aussi bien à un appareil de mesure ou un système de mesure qu'à un ensemble procédure/système de mesure donnée. [26]

8.6.1. Différentes conditions d'étude de la fidélité :

Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de réplicabilité, de répétabilité ou de reproductibilité pour une méthode.

➤ Répétabilité de mesure :

Répétabilité de mesure ou répétabilité, (VIM 2.21) fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de répétabilité.

Condition de répétabilité (VIM 2.20) : condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure de mesure, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps. (14)

➤ Fidélité intermédiaire de mesure :

Fidélité intermédiaire de mesure ou fidélité intermédiaire (VIM 2.23) : fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de fidélité intermédiaire.

Condition de fidélité intermédiaire (VIM 2.22) : condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure de mesure, le même lieu et des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une période de temps étendue, mais peuvent comprendre d'autres conditions que l'on fait varier.

Dans la fidélité intermédiaire « le même lieu » implique une approche obligatoirement INTRA-laboratoire. (14)

➤ **Reproductibilité de mesure :**

Reproductibilité de mesure ou reproductibilité (VIM 2.25) : fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de reproductibilité

Condition de reproductibilité (VIM 2.24) : condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent des lieux, des opérateurs et des systèmes de mesure différents, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires

NOTE 1 Les différents systèmes de mesure peuvent utiliser des procédures de mesure différentes.

NOTE 2 Il convient qu'une spécification relative aux conditions contienne, dans la mesure du possible, les conditions que l'on fait varier et celles qui restent inchangées.

Dans la reproductibilité « les lieux différents » impliquent une approche obligatoirement INTER-laboratoires. [26]

Tableau 2 Différentes conditions d'étude de la fidélité.[26]

Conditions de répétabilité	Conditions de fidélité intermédiaire	Conditions de reproductibilité
Résultats d'essais indépendants obtenus avec : <ul style="list-style-type: none"> - Des mesurages répétés - La même procédure de mesure - Le même matériau à mesurer ou des objets similaires 		
Le même laboratoire Le même opérateur Le même équipement (même système de mesure) Un intervalle de temps très court	Le même laboratoire Des opérateurs éventuellement différents Des équipements éventuellement différents Un intervalle de temps étendu	Des laboratoires différents Des opérateurs différents Des équipements différents Des moments différents.

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (résultats d'essais indépendants) dans des conditions prescrites. La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard.

La fidélité peut être évaluée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra laboratoire) et la reproductibilité (inter laboratoire).

La fidélité traduit uniquement la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée. La mesure de fidélité est calculée à partir de l'écart type des résultats d'essais.

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

Nb. La justesse et la fidélité d'une méthode analytique peut être expliqué très clairement à l'aide de la figure suivante dont on distingue quatre cas possibles :

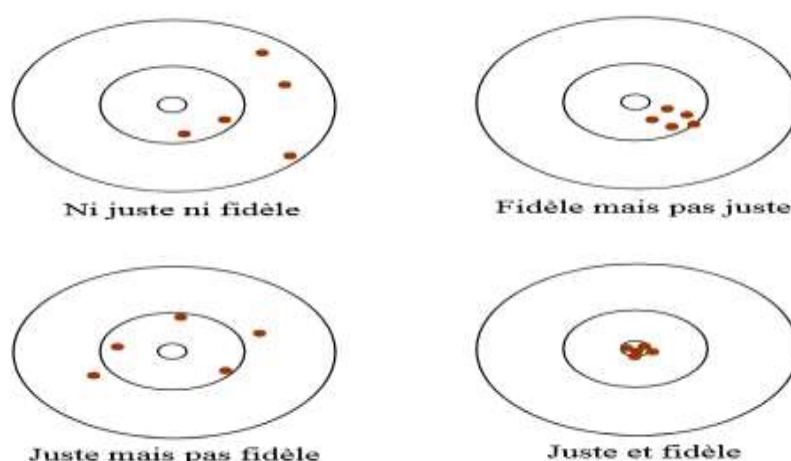


Figure 12: Image des notions de justesse et de fidélité.

8.7. Exactitude :

« Étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée. » (ISO 5725) [36]

Note : le terme « exactitude », appliqué à un ensemble de résultats d'essai, implique une combinaison de composantes aléatoires et d'une erreur systématique commune ou d'une composante de biais.

8.8. Limite de détection LDM :

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure. [37]

8.9. Limite de quantification :

La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie. [37]

8.10. Robustesse :

Robustesse est la capacité de la procédure à fournir des résultats analytiques d'une exactitude et d'une précision acceptables dans diverses conditions. Les résultats d'échantillons séparés sont influencés par les changements des conditions opérationnelles ou environnementales. La robustesse doit être prise en compte pendant la phase de développement et doit montrer la fiabilité d'une analyse lorsque des variations délibérées sont apportées aux paramètres de la méthode. [38]

9. Types de procédures analytiques à valider

Toutes les procédures d'analyse doivent être validées, selon **ICH Q2(R1)**. Les quatre types les plus communs de ces dernières sont les suivants :

- Les tests d'identification.
- Les tests quantitatifs pour la teneur en impuretés.
- Les tests limites pour le contrôle des impuretés.
- Les tests quantitatifs de la fraction active dans des échantillons de substance médicamenteuse ou de produit médicamenteux ou autre composant sélectionné dans le produit fini.

L'ampleur de la validation de la procédure analytique dépend du type d'analyse et de l'objectif visé, les critères de validation à satisfaire vont alors différer comme il est illustré dans le tableau suivant : [22]

Tableau 3 : Les différents critères de validation selon le type de procédures analytiques.

Type de test Caractéristiques	Dosage quantitatif	Recherche quantitative d'impuretés	Essais limites	Identification	Dosage en bioanalyse
Exactitude	+	+	-	-	+
Répétabilité	+	+	-	-	+
Fidélité Intermédiaire	+	+	-	-	+
Spécificité	+	+	+	+	+
Limite de Détection	-	+	+	-	+

Limite de Quantification	-	+	-	-	+
Linéarité	+	+	-	-	Fonction de Réponse
Intervalle de Mesure	+	+	-	-	+
Robustesse	+	+	+	-	-

10. Règles de décision :

Puisque les documents réglementaires relatifs à la validation des méthodes sont à caractères global, ils laissent une place à l'interprétation des analystes qui pourront alors choisir la règle de décision qui permettra de déclarer valide une méthode d'analyse. Selon le processus de décision adopté, nous pouvons distinguer entre 3 approches statistiques conventionnelles, se caractérisant toutes par le fait qu'ils comparent séparément la justesse et la fidélité, c'est-à-dire respectivement les erreurs systématiques et les erreurs aléatoires de la méthode. Nous distinguons aussi une quatrième approche qui s'intéresse à la combinaison des erreurs systématique et aléatoire dans le concept d'erreur totale. [39]

10.1. L'approche descriptive :

L'approche descriptive utilise seulement des estimations des paramètres statistiques : Biais et fidélité intermédiaire.

Les valeurs estimées de chaque critère sont calculées à chaque niveau de concentration des standards de validation et sont comparées aux limites d'acceptation fixées à priori. Les limites d'acceptation rencontrées dans l'industrie pharmaceutique pour des méthodes de dosages de principes actifs dans des produits finis sont :

±2 % pour le biais relatif

3% pour le CVFI

Cela signifie que si le biais estimé est inclus dans l'intervalle de [-2 %, +2 %], la justesse de la méthode pour le niveau de concentration étudié est acceptée.

Pour le critère de fidélité, si le CVFI est plus petit que 3 %, la fidélité de la méthode pour le niveau de concentration étudié est acceptée.

10.2. L'approche de différence

L'approche de différence est basée sur les tests d'hypothèses comme le test de Student.

Les tests des hypothèses statistiques sont composés de deux hypothèses mutuellement exclusives, à savoir l'hypothèse nulle H0 et l'hypothèse alternative H1.

Le critère de justesse (ou le biais de la méthode) est évalué en utilisant un test bilatéral de Student dont les hypothèses nulles et alternatives sont données à l'Eq. 3. Ceci peut être vérifié en comparant l'intervalle de confiance à 95 % du biais global estimé à la valeur 0% de biais relatif.

Hypothèse nulle :

$H_0 : \text{biais} = 0 \Leftrightarrow H_0 : \text{biais relatif} = 0 \% \Leftrightarrow H_0 : \text{recouvrement} = 100 \%$

Hypothèse alternative :

$H_0 : \text{biais} \neq 0 \Leftrightarrow H_0 : \text{biais relatif} \neq 0 \% \Leftrightarrow H_0 : \text{recouvrement} \neq 100 \%$

Avec $\text{biais} = x_i - \mu_T$, le $\text{biais relatif} = (x_i - \mu_T / \mu_T) * 100$ et le $\text{recouvrement} = (x_i / \mu_T) * 100$

Si cet intervalle contient 0 % de biais, la justesse de méthode est acceptée, sinon, elle devrait être rejetée comme illustré dans la Figure 22 (a).

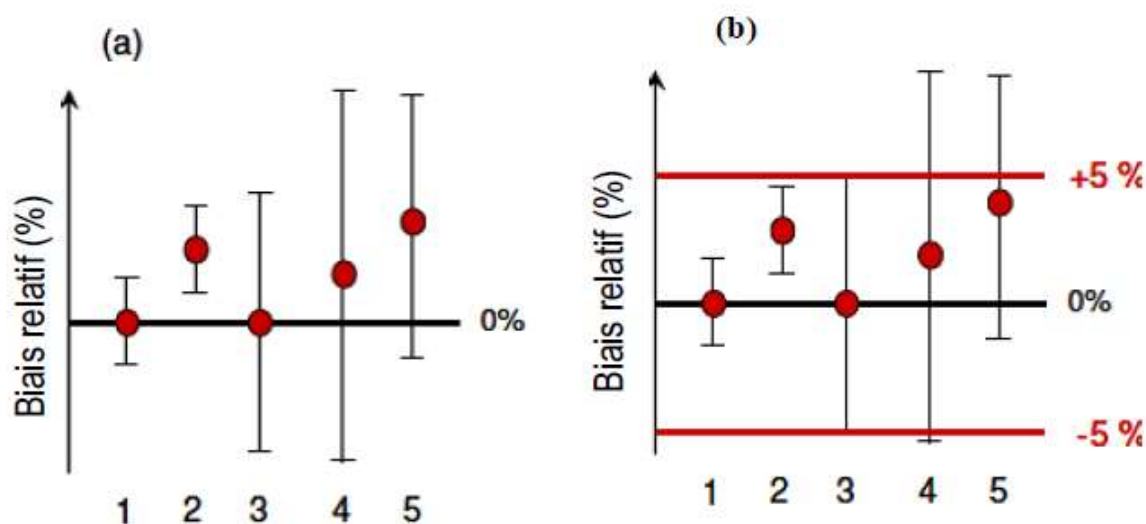


Figure 13a et 13b: Les règles de décisions de validité des méthodes analytiques pour 5 situations différentes (1 à 5) selon le biais relatif de la méthode ;(a) l'approche de différence du biais relatif ;(b) l'approche d'équivalence du biais relatif avec les limites de décision fixées à + ou - 5 %.

10.3. L'approche d'équivalence

L'approche d'équivalence diffère des précédentes par le fait qu'au lieu de vérifier si le biais relatif estimé ou le CVFI estimé est inclus dans les limites d'acceptation, elle vérifie si la vraie valeur de ces paramètres est incluse dans leurs limites d'acceptation respectives, cela pour chaque niveau de concentration des standards de validation étudiées comme le montre la Figure 22 (b) Cela consiste à comparer des intervalles de confiance des paramètres étudiés aux limites d'acceptation.

Pour le critère de justesse, l'intervalle de confiance à 95 % du biais relatif est calculé pour chaque niveau de concentration et comparé par exemple aux limites d'acceptation de ± 2 %.

L'hypothèse statistique de ce test est maintenant :

H01 : Biais relatif $\leq -\Delta$ vs H11 : biais relatif $> -\Delta$

Et

H02 : Biais relatif $\geq \Delta$ vs H12 : biais relatif $< \Delta$

Où Δ (%) est la limite de décision, à savoir la différence maximale tolérée pour le biais relatif de la méthode (par exemple 2%).

Comme illustré par les deux lignes horizontales représentant les limites de décision de ± 5 % au niveau de la Figure 22 b, la règle de décision a changé. Avec cette nouvelle règle, les procédures 4 et 5 sont rejetées, alors que la procédure 2 est maintenant considérée comme valide.

Pour le critère de Fidélité, c'est la limite supérieure de l'intervalle de confiance à 95% du CVFI qui est comparée à, par exemple, la limite de 3% et qui doit être plus petite que cette valeur maximale. [39]

10.4. L'approche de l'erreur totale ou Profil d'exactitude

A côté de ces approches classiques, une approche originale, basée sur le profil d'exactitude en utilisant les intervalles de tolérance statistique et l'erreur totale de mesure comme outil de décision unique a été proposé. Face à la disponibilité de ces différentes approches, il est du devoir de l'analyste de choisir l'approche la plus appropriée.

Toutefois, cette dernière approche est une règle de décision, à la fois pratique et visuelle. Elle repose sur l'intégration du profil d'exactitude dans des limites d'acceptation ($\pm\lambda$). Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles de tolérance permet donc, comme illustré dans la Figure 23, de décider de la capacité ou non d'une procédure à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. La zone en grisé montre l'intervalle de dosage dans lequel la procédure est capable de quantifier avec une exactitude connue et un risque fixé par l'analyste.

C'est ainsi que dans ces conditions, si l'analyste est prêt à assumer par exemple un risque de 5%, il pourra au terme de la validation de sa procédure garantir que 95 fois sur 100 les futures mesures fournies par celle-ci seront comprises dans les limites d'acceptation fixées

en fonction des contraintes de son secteur d'activité (ex : 1% ou 2% sur les matières premières, 5% sur les spécialités pharmaceutiques, 15% en bio-analyse, environnement, etc.)

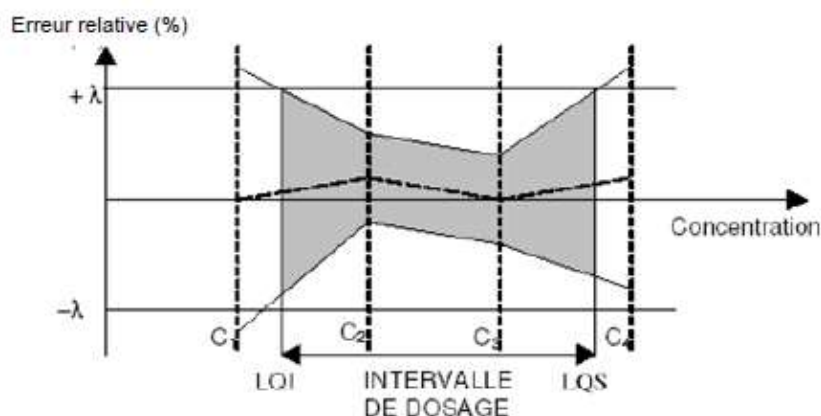


Figure 14: Illustration du profil d'exactitude comme outil de décision. *LQI* : Limite de quantification inférieure, *LQS* : limite de quantification supérieure

Comme les vraies valeurs de biais et de fidélité de la procédure sont inconnues, le profil d'exactitude par niveau de concentration (C_1, C_2, \dots) s'obtient en calculant l'intervalle de tolérance qui permet d'évaluer la probabilité d'obtenir des résultats futurs dans des limites d'acceptation et ce, à partir des estimations disponibles du biais et de la fidélité de la procédure après la phase de validation au niveau de concentration en question. A noter que les estimations du biais et de la variance sont des éléments essentiels pour calculer les intervalles de tolérance, mais la décision n'est pas faite sur la base de ces estimations de biais et de variance.

Le profil d'exactitude, représenté dans la Figure 23, s'obtient en reliant les limites de tolérance basses et hautes estimées pour chaque niveau de concentration. Si, sur une partie de l'intervalle de dosage sous épreuve, les limites de tolérance devaient sortir des limites d'acceptation, comme dans l'exemple de la Figure 23 pour les niveaux de concentration C_1 et C_4 , de nouvelles limites de quantification, et par là même un nouvel intervalle de dosage seraient définis.

La Figure 13 représente ces nouvelles limites LQS (limite de quantification supérieure) et LQI (limite de quantification inférieure) qui sont en parfait accord avec la définition de ce critère, savoir la plus petite quantité de substance à analyser qui peut être dosée avec une exactitude (justesse + fidélité) définie. L'utilisation du profil d'exactitude, comme seul outil de décision, permet non seulement de réconcilier les objectifs de la procédure avec ceux de la validation mais aussi de visualiser rapidement la capacité de la procédure à répondre de façon fiable à son objectif analytique. [39]

11. Validation d'une méthode par le profil d'exactitude

- ❖ L'objectif d'une procédure est de pouvoir déterminer avec le plus d'exactitude possible chacune des quantités (ou concentrations) inconnues qu'un laboratoire aura à doser, puis à démontrer que l'écart entre ces concentrations et les concentrations de références se situent dans les limites d'acceptation.

$[-\lambda, +\lambda]$ fixées a priori pour chaque type d'application (λ étant le risque d'erreur).

$$-\lambda < \mathbf{x} - \mathbf{u} < +\lambda$$

(x = valeur trouvée / u = valeur de référence).

- $\lambda = 2\%$ pour les analyses d'une matière première.
 - $\lambda = 5\%$ pour un produit fini.
 - $\lambda = 15\%$ en analyse biologique.
- ❖ L'objectif de la validation est de pouvoir donner au laboratoire et aux autorités réglementaires des garanties que chaque résultat qui sera obtenu dans le futur par cette méthodologie sera suffisamment proche de la vraie valeur de l'échantillon à doser, c'est-à-dire que la probabilité que $|X-U| < \lambda$, doit être supérieure ou égale à une valeur minimale β (par exemple 90 ou 95 %).

$$\text{Prob}(|\mathbf{X} - \mathbf{U}| < \lambda) \geq \beta$$

- β : l'acceptation.

11.1. Définition

Profil d'exactitude : combinaisons, sous une forme graphique, d'un ou plusieurs intervalles de tolérance d'espérance β calculés à différents niveaux de concentrations et d'un ou plusieurs intervalles d'acceptabilités. [35]

Intervalle de tolérance :

Intervalle de tolérance d'espérance β : intervalle qui contient en moyenne une proportion β % définie de futurs mesurages, obtenus selon un mode opératoire donné et pour une concentration donnée.

NOTE Les limites de l'intervalle sont obtenues par le calcul à partir d'essais répétés réalisés en vue de la validation. [35]

Intervalle d'acceptabilité :

Spécification de la performance exigée pour la méthode, exprimée comme un écart acceptable autour de la valeur de référence.

Les limites de l'intervalle sont fixées par le client ou par une obligation réglementaire, parfois en fonction de niveau de concentration. Elles sont notés (+) ou (-) λ en valeurs absolues et dans l'unité du mesurande ou $(1 \pm \lambda) \times 100$ en valeurs relatives. [35]

L'intervalle d'acceptabilité et l'intervalle de tolérance sont deux outils indispensables pour construire le profil d'exactitude :

- L'intervalle d'acceptabilité est choisi préalablement ;
- L'intervalle de tolérance est établi à l'issue de la réalisation des essais, à partir des résultats obtenus. La détermination de cet intervalle de tolérance correspond à une approche probabiliste. [27]

11.2. Le concept du profil d'exactitude

Repose sur le concept de l'erreur Total (biais + écart-type).

Intègre de façon statistiquement correcte dans un seul graphique (ou tableau) l'ensemble des éléments essentiels de la validation, à savoir :

- Le biais.
- La fidélité.
- Le risque.
- Les limites de quantification.

Ce que tout analyste attend d'une procédure analytique c'est que la différence entre le résultat rendu (x) et la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon, qui par ailleurs restera toujours inconnue, soit petite ou du moins inférieure à une limite d'acceptation, c'est-à-dire :

$$-\lambda < x - \mu_T < \lambda \Leftrightarrow |x - \mu_T| < \lambda$$

Avec λ la limite d'acceptation, qui peut être variable selon les exigences de l'analyste ou la finalité de la procédure analytique, laquelle est liée aux exigences communément admises par la pratique professionnelle (par exemple : 1 ou 2% sur des matières premières, 5% sur des spécialités pharmaceutiques, 15% en bioanalyse, environnement, etc.). Nous voyons ainsi apparaître deux principes fondamentaux : d'une part, une notion de limite d'acceptation des performances d'une procédure analytique, d'autre part, de manière implicite, celle de la responsabilité de l'analyste dans la décision d'accepter ou non une procédure en fonction de ses performances et de l'usage pour lequel elle est prévue. Par ailleurs, toute procédure analytique (méthode de dosage) se caractérise par un « vrai biais » μ_M (erreur systématique), et une « vraie fidélité » σ_{2M} (erreur aléatoire mesurée par un écart type ou une variance).

Ces deux paramètres sont propres à toute procédure analytique et sont tout aussi inconnus que la « vraie valeur » de l'échantillon à déterminer. En fait, les expériences réalisées en phase de validation nous permettent d'obtenir des estimateurs de ce biais et de cette variance (fidélité) qui seront d'autant plus fiables que les expériences effectuées sur des échantillons connus – les standards de validation (SV) – seront adéquates, c'est-à-dire que le plan d'expériences et le nombre d'essais seront appropriés. Ces estimateurs de biais et de variance ne sont pas une fin en soi, ils sont une étape intermédiaire obligatoire pour pouvoir évaluer si la procédure analytique va vraisemblablement pouvoir ou non quantifier avec une exactitude suffisante chacune des quantités inconnues, c'est-à-dire remplir son objectif [37]

11.3. Avantage du profil d'exactitude

Elle a l'avantage de proposer une méthode d'interprétation graphique très simple et visuelle qui ne s'embarrasse pas de tests statistiques toujours délicats à décrypter. Son objectif est de servir les analystes plutôt que de les transformer en statisticiens... Elle est universelle et s'applique à toutes les méthodes de mesure, comme le prouve une littérature maintenant abondante. [34]

11.4. Organiser la validation d'une méthode

Pour organiser la validation d'une méthode d'analyse, il faut d'abord l'avoir correctement mise au point. Bien souvent les analystes sont trop impatientes et vont essayer de valider une méthode dont le domaine d'application n'est encore bien défini et pour laquelle il existe des effets de matrice inconnus. C'est une perte de temps et d'argent. Une étude de validation doit démarrer lorsqu'on dispose d'un mode opératoire complètement rédigé. Bien sûr l'organisation pratique des essais dépend ensuite du guide de validation choisi. Dans Feinberg

(2010b) nous proposons une séquence de dix opérations qui débouchent sur la construction d'un profil d'exactitude. On peut déjà en définir des principes généraux :

- Définir les objectifs à atteindre ;
- Prévoir les plans d'expérience à réaliser ;
- Prévoir les quantités et la qualité des matériaux qui seront utilisés ;
- Organiser le calendrier des études et celui du personnel qui en sera chargé.

En fin d'étude, il ne faut pas sous-estimer le temps nécessaire pour interpréter les résultats. C'est pourquoi, il importe de prévoir dès le début le mode d'enregistrement des mesures, en fonction des outils de calcul dont dispose le laboratoire. De toute façon, si le laboratoire fonctionne avec un système qualité, il se doit de rédiger une procédure et tous les documents annexes qui précisent comment l'étude sera conduite. On peut proposer cette série d'étapes qui constituera le squelette de cette procédure :

- Nommer un responsable qui coordonnera l'étude de validation ;
- Rédiger la version préliminaire du mode opératoire de la méthode en suivant une procédure de présentation d'un mode opératoire normalisé.
- Ouvrir une fiche de validation ;
- Réunir un groupe de travail qui définira le domaine d'application et les spécifications, en particulier l'objectif attendu de la méthode.
- Rédiger les plans d'expérience qui devront être effectués. Prévoir la logistique, en termes de volumes d'échantillon de validation, de réactifs et de disponibilité du personnel.
- Réaliser les études prévues.
- Interpréter les résultats et calculer les divers critères de performance requis.
- Rédiger la version finale du mode opératoire de la méthode avec ses critères de performance.

Il est alors possible de définir un certain nombre de types de dossiers de validation qui se solderont par des documents présentables à un organisme de contrôle. Le dossier de validation, une fois constitué, permettra aussi d'établir des valeurs seuils de qualification du matériel de mesure qu'il faudra vérifier, par exemple, avant chaque utilisation. Ces tests de qualification font l'objet de fiches de qualification spécifiques de chaque instrument employé. Une vérification d'aptitude doit aussi avoir lieu si la méthode est transférée sur un autre matériel. Il ne faut donc pas confondre la validation de la méthode avec un test de qualification de l'instrumentation. [40]

11.5. Mise en œuvre du profil d'exactitude

11.5.1. Protocoles de validation

a. Préparation des standards d'étalonnage

Les standards d'étalonnage (SE) doivent être préparés selon le protocole qui sera appliqué en routine tant au niveau du mode opératoire que du nombre de niveaux de concentration (point d'étalonnage) et du nombre de répétitions par niveau. [37]

b. Préparation des standards de validation

Les standards de validation (SV) doivent quant à eux être préparés dans la matrice et être des échantillons indépendants (variance intra série) dans la mesure où c'est applicable. En effet, ils représentent, en phase de validation, les futurs échantillons que la procédure analytique aura à quantifier. Chaque standard de validation est préparé et traité de façon indépendante comme un futur échantillon. Ce caractère d'indépendance est fondamental pour l'estimation correcte de la variance inter séries. [37]

c. Effet utilisé dans le laboratoire

Dans la pratique, le plus souvent on utilise dans les laboratoires l'effet « jour », mais on pourrait utiliser aussi l'effet « opérateur ». Rappelons qu'il n'est pas nécessaire que ces jours soient consécutifs. Il est également à noter que, suivant les contraintes analytiques, l'effet « jour » peut être remplacé par l'effet « série », par exemple en réalisant deux séries le même jour, pour autant que la procédure analytique soit recommencée dans son intégralité entre les séries (préparation des échantillons, des différentes solutions, des réactifs, étalonnage, etc.). De plus, dans le cadre de l'estimation de la fidélité intermédiaire, c'est-à-dire de la fidélité dans un même laboratoire dans des conditions différentes (jours différents, appareils différents, opérateurs différents, etc.), des expériences alternatives doivent également être envisagées. En effet, la procédure analytique n'est pas développée pour quantifier en routine avec le même opérateur et sur le même équipement un seul échantillon inconnu pendant un jour, mais bien un très grand nombre de ces échantillons répartis dans le temps et, par conséquent, impliquant souvent plusieurs opérateurs et plusieurs équipements. [37]

d. Réalisation des essais

Les mesurages sont effectués selon la recommandation de la norme NF ISO 5725 :

- I série de mesurages (d'indices i) ;

- J répétitions (d'indice j) dans chaque série.
- K niveaux (d'indice k), couvrant le domaine d'application de la méthode.

Chaque série est l'ensemble des répétitions effectuées en condition de répétabilité sur chacun des k niveaux. Les séries différentes par le moment des mesurages et/ou par l'opérateur.

Une série i comprend l'ensemble valeurs mesurées y_{ijk} pour ce i.

Pour l'ensemble des séries, on obtient un ensemble de valeurs mesurées y_{ijk} .

Le minimum recommandé est : $I=3$, $j=2$, $k=3$. Ceci signifie qu'au minimum il faut choisir trois niveaux du matériau d'essai, effectuer trois séries et pour chaque série, deux essais pour chaque niveau ; soit un nombre total de 18 essais au minimum.

11.5.2. Méthodologie statistique

a. La collecte des données :

On collecte les données dans un tableau après la réalisation des mesurages.

b. La fonction de réponse :

À Partir des SE on va déterminer les différentes fonctions de réponse $y = f(x)$ c'est à dire les relations mathématiques pouvant relier la réponse Y à la quantité ou à la concentration X de substance à doser,

❖ Types de fonctions :

Deux familles de fonctions se dégagent de cet ensemble :

- Les fonctions dites linéaires en leurs paramètres.
- Les fonctions non linéaires.

❖ Le choix de la fonction de réponse :

Différentes fonctions de réponse peuvent être envisagées lors de la validation de la méthode. Le choix dépend du type de méthode (méthode physicochimique, bio analytique, immuno-dosage, etc.).

Très vraisemblablement, la plupart des méthodes physicochimiques auront recours à la droite (passant par 0 ou non). Pour les méthodes bio-analytiques, la fonction quadratique pourra être envisagée dans certains cas. Dans le cas d'un immuno-dosage, le choix se portera sur les fonctions logistiques à 4 ou 5 paramètres. [37]

❖ Techniques statistiques :

Le calcul des estimations des coefficients du modèle d'étalonnage peut faire appel aux diverses techniques statistiques classiques détaillées dans la littérature :

1. Régression par la méthode des moindres carrés (AFNOR, 1996)

2. Régression pondérée (Azaïs J.M., Bardet J.M., 2006)

3. Régression non linéaire (Huet S., et al, 2004)

La méthode la plus accessible est celle des moindres carrés, car elle est disponible sur les tableurs. La régression pondérée s'applique dans les cas où les variances des réponses ne sont pas homogènes entre niveaux. [41]

❖ Les fonctions f classiquement utilisées :

*Tableau 4:*Exemple de fonction de réponse.

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

c. Calcule des concentrations retrouvées par prédiction inverse :

➤ **Définition :**

Effectuer les prédictions inverses, c'est-à-dire calculer les concentrations en retour avec la fonction de réponse, [37] Il s'agit de transformer les réponses instrumentales mesurées en concentrations.

➤ **Etape réaliser avant la prédiction inverse :**

Il est préférable de s'assurer qu'au sein d'un niveau de concentration, les concentrations sont toutes identiques. Si ce n'est pas le cas, il vaut alors mieux les aligner.

[37]

➤ **Le calcul des prédictions inverse pour différentes fonctions de réponse**

❖ Equation de la prédiction inverse :

Pour les méthodes indirectes, les modèles d'étalonnage servent à calculer les concentrations

Retrouvées, à partir des données au plan de validation, en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage, selon le modèle mathématique suivant :

$$\hat{x} = z = f^{-1}(Y)$$

La fonction inverse est appelée équation de prédiction inverse et les valeurs z ainsi obtenues sont appelées concentrations retrouvées. [41]

Les prédictions inverses pour les différents modèles de régression s'obtiennent comme suit (Tableau.) :

Tableau 5: Les prédictions inverses pour les différents modèles de régression.

Fonction de réponse	Fonction inverse de calcul de la concentration retrouvée
Droite passant par l'origine	$X_{ijk, \text{ calc}} = \frac{y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$
Droite	$X_{ijk, \text{ calc}} = \frac{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}$
Fonction quadratique	$X_{ijk, \text{ calc}} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^2 - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{2\hat{\gamma}_i}$
Logistique à 4 paramètres	$X_{ijk, \text{ calc}} = \hat{\gamma}_i \left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$
Logistique à 5 paramètres	$X_{ijk, \text{ calc}} = \hat{\gamma}_i \left(\left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} \right)^{\frac{1}{\hat{\varphi}_i}} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

❖ Calcul des concentrations retrouvées :

Utiliser les données du plan de validation et les paramètres des modèles d'étalonnage estimés à partir du plan d'étalonnage pour calculer les concentrations retrouvées dans les échantillons de validation. Effectuer ces calculs par série, avec le modèle de la série correspondante. Ce mode de calcul souligne le fait qu'il est indispensable que les essais des plans d'étalonnage et de validation soient synchronisés c'est-à-dire réalisés le même jour et/ou par le même opérateur et/ou par le même laboratoire. [41]

11.5.3. Protocole et évaluation statistique des critères de validation selon le guide SFSTP (2003 – 2006)

$[-\lambda, +\lambda]$ fixées a priori pour chaque type d'application (λ étant le risque d'erreur).

$$-\lambda < \mathbf{x} - \mathbf{u} < +\lambda$$

(x = valeur trouvée / u = valeur de référence).

$$\mathbf{Probe} (|\mathbf{X} - \mathbf{U}| < \lambda) \geq \beta$$

- β : l'acceptation.

15.5.1. Estimation de la spécificité

Vérification de la non interférence des excipients par l'injection d'un placebo et comparaison avec l'échantillon.

Après avoir vérifié la spécificité de la méthode d'analyse on opère sur deux ensembles d'échantillons :

- 3 séries de standards d'étalonnage (SE).
- 3 séries de standards de validation (SV).

Le nombre de niveaux de concentration à utiliser est laissé à l'appréciation de l'opérateur. (En général on utilise la démarche ICH avec 5 niveaux de 80 à 120% et avec un pas de 10%).

Les SE peuvent être réalisés sans la matrice (si on a démontré qu'il n'y a pas d'effet matrice) ou avec la matrice, avec deux répétitions au minimum pour chaque niveau de concentration.

Les SV doivent toujours être réalisés avec la matrice (Forme pharmaceutique reconstituée), avec trois répétitions au minimum pour chaque niveau de concentration.

15.5.2. Estimation de la fonction de réponse

À Partir des SE on va déterminer les différentes fonctions de réponse $y = f(x)$ c'est à dire les relations mathématiques pouvant relier la réponse Y à la quantité ou à la concentration X de substance à doser, parmi ces fonctions de réponse proposées par protocole SFSTP on retient :

- Le modèle linéaire : $y = ax + b$ (droite ne passant pas par l'origine).
- Le modèle linéaire passant par le zéro : $y = a_1x$ (droite passant par l'origine prenant en compte l'ensemble des points).
- Le modèle reliant le zéro et le point de 100% : $Y = a_2x$ (droite passant par zéro et le 100% : linéaire 0-100%).
- Le modèle exponentiel : $Y = ax^b$.
- Le modèle polynomial de degré 2 : $Y = ax^2 + bx + C$.

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

- ϵ : Biais.
- Y : Amplitude du signal du spectre.
- X : Concentration.
- En général on teste les trois premières fonctions [42]

15.5.3. Alignement des réponses des SV

Si pour un niveau de concentration les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries, il est indispensable de procéder à un alignement des réponses sur la valeur de la concentration moyenne (ou la concentration théorique du niveau considéré).

L'alignement des (n) répétitions d'un niveau donné s'effectue comme suit :

$$YN_i = y_i + f(x_m) - f(x_i)$$

- f : fonction de réponse testée avec les SE.
- Y_{Ni} : réponse alignée.
- y_i : réponse de l'équipement.
- x_m : valeur référence.
- x_i : valeur acceptée.

15.5.4. Calcul des prédictions inverses

On utilise les fonctions de réponses réciproques pour calculer les quantités ou concentrations x^* des standards de validation à partir des réponses alignées YN_i de l'appareil de mesure :

$$x^* = f^{-1}(Y)$$

15.5.5. Estimation de la justesse

$$Biais_j = \bar{x}_j - u_j$$

$$Biais (\%)_j = 100 \times \frac{\bar{x}_j - u_j}{u_j}$$

$$Recouvrement (\%)_j = 100 \times \frac{\bar{x}_j}{u_j}$$

- \bar{x}_j : Moyenne des concentrations par groupe.
- u_j : Concentration théorique par groupe.
- $Biais (\%)_j$: Exactitude relative (ExR).
- $R (\%)_j$: Recouvrement %.

La méthode est juste si : $Biais < |\lambda\%|$ ($\lambda = 5\%$ pour un produit fini).

15.5.6. Estimation de la fidélité

1. Variabilité intra-laboratoire

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

(MSE = Moyenne des Variances).

- $x_{ijk,cal}$: Concentration par groupe.
- $\bar{x}_{ij,cal}$: Moyenne de toutes les concentrations par groupe.
- n_{ij} : Nombre d'observation par groupe.
- p : Nombre de groupe.

2. Variabilité inter-laboratoire

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

(MSM = n*Variance des Moyennes).

- $\bar{x}_{ij,cal}$: Concentration par groupe.
- $\bar{x}_{j,cal}$: Moyenne de toutes les concentrations par groupe.
- n_{ij} : Nombre d'observation par groupe.

3. Fidélité intermédiaire

$$\sigma_{FI,j}^2 = MSE_j + MSM_j$$

Si $MSE < MSM$

$$VAR_{intra} = MSE \quad \text{et} \quad VAR_{inter} = (MSM - MSE) / n$$

SINON $VAR_{intra} = VAR_{géné}$ et $VAR_{inter} = 0$

$VAR_{Ré} = VAR_{intra} =$ Variabilité intra-groupe.

$VAR_{inter} =$ Variabilité inter-groupe.

$VAR_{FI} = VAR_{intra} + VAR_{inter}$

Après avoir déterminé les deux variances de respectabilité et respectabilité intermédiaire nous déterminons par la suite le CV (coefficient de variation) pour chaque paramètre qui doivent être < à 2%.

$$CV_{Ré}\% = \frac{\sqrt{VAR_{Ré}}}{\text{moyenne générale}} * 100$$

$$CV_{FI}\% = \frac{\sqrt{VAR_{FI}}}{\text{moyenne générale}} * 100$$

La méthode est fidèle si : $CV < 2\%$

15.5.7. Estimation de l'exactitude

Selon SFSTP 2006 l'exactitude est estimée par calcul de l'erreur totale.

$$\text{Erreur totale} = \text{Erreur aléatoire} + \text{Erreur systématique}$$

L'erreur aléatoire est représentée par la fidélité intermédiaire qui est exprimé par CV_{FI} .

L'erreur systématique est représentée par la justesse qui est exprimé par le $|\text{Biais } \%|$.

$$ET = |\text{Biais}\%| + CV_{FI}$$

- ET : Erreur Totale.
- $|\text{Biais}\%|$: Exactitude relative.
- CV_{FI} : Coefficient de variation de la fidélité intermédiaire.

La méthode est exacte si : $ET < |\lambda\%|$ ($-\lambda < ET < +\lambda$).

($\lambda = 5\%$ pour un produit fini). [43]

15.5.8. Estimation des intervalles de tolérance et profil d'exactitude

Selon SPSTP 2006 l'estimation de l'intervalle de tolérance sert à déterminer le profil d'exactitude afin de projeter la validation de la méthode dans le futur.

- ✓ En pratique l'intervalle de tolérance est calculé pour chaque niveau j de concentration à partir des standards de validation.

$$VAR_{FI} = VAR_{inter} + VAR_{intra}$$

$$R_j = \frac{VAR_{inter}}{VAR_{intra}} \quad B_j = \sqrt{\frac{R_j + 1}{nR_j + 1}}$$

$$v = \frac{(R + 1)^2}{\frac{(R + \frac{1}{n})^2}{p - 1} + \frac{1 - \frac{1}{n}}{pn}}$$

$$IDT = \text{Biais}\% \pm t \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_f^2} CV_{FI}}$$

- *IDT* : intervalle de tolérance.
- *t* : variable de Student pour un risque $\alpha = (1-B)$ et ddl=*v*.
- *ddl* : degré de liberté.
- *n* : nombre de répétitions.
- *p* : nombre de séries.

Le profil d'exactitude s'obtient en reliant entre elles les bornes supérieures puis les bornes inférieures de l'intervalle de tolérance.

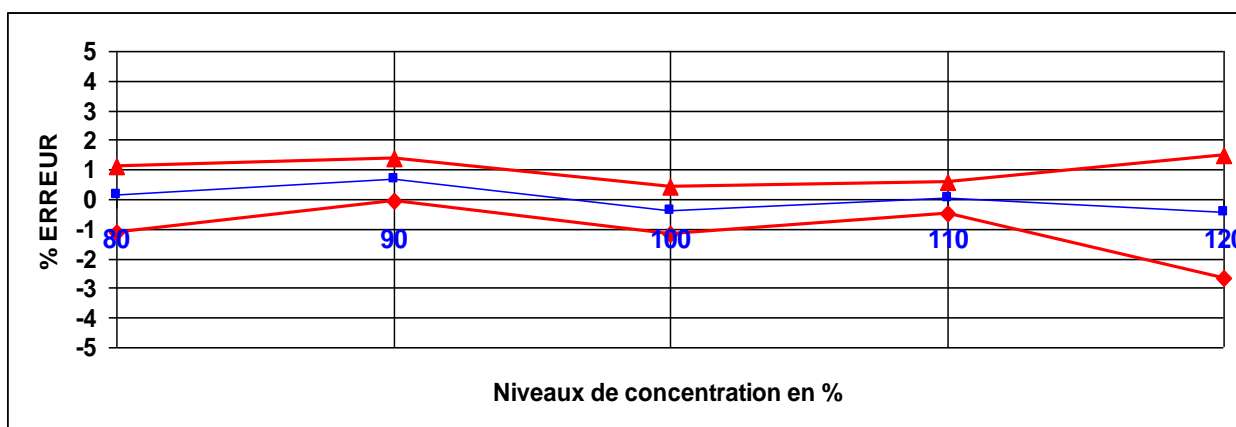


Figure 15 : Exemple d'un profil d'exactitude.

- ✓ On démontre que si le profil d'exactitude est entièrement inclus dans les limites $-\lambda\%$, $+\lambda\%$, on peut alors affirmer qu'en routine, le pourcentage de résultats dont la différence entre la valeur déterminée *X* et la valeur vraie *U* est inférieure, en valeur absolue à λ , sera au moins égale à β .

$$Prob (|X - U| < \lambda) \geq \beta$$

- ✓ Nous déterminons par la suite l'intervalle de dosage la désignant les 2 points inférieur et supérieur d'intersection de l'intervalle de tolérance avec la limite du risque λ ($-\lambda$ et $+\lambda$).
- λ : Risque d'erreur de l'exactitude.
- β : Pourcentage d'acceptation du profil d'exactitude.
- $\alpha = 1 - \beta$: Risque d'erreur du profil d'exactitude. [42]

15.5.9. Linéarité :

On vérifie la linéarité de la fonction choisie. Comme cité précédemment, la linéarité est la capacité d'une procédure à fournir une relation linéaire entre **les concentrations introduites** et **les concentrations calculées**.

Exemple du modèle linéaire : **Concentration calculé = a (concentration introduite) + b.**

On détermine R^2 qui doit être le plus proche de 1 :

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} (y_i^* - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^{i=n} (y_i - \hat{y}_i)^2}$$

- $R = \sqrt{R^2}$.
- K : Nombre de groupe.
- j : Indice de groupe.
- i : Indice des valeurs individuelles dans le groupe j.
- R^2 : coefficient de détermination.
- R : coefficient de corrélation.
- y_i^* : Réponse estimée par le modèle.
- \hat{y}_i : Moyenne de toutes les réponses.
- y_i : Réponse donnée par l'équipement.

- ✓ **La méthode est linéaire si : $R^2 \geq 0,99$ [42]**

12. Interprétation du profil d'exactitude pour la validation :

Pour utiliser le profil d'exactitude en vue de valider une méthode, il faut avoir fixé les deux critères de décision suivants :

- ✓ Les limites d'acceptabilité $\pm\lambda$: Elles servent à traduire les objectifs pratiques des utilisateurs. Elles délimitent un intervalle autour de la valeur de référence. Le plus souvent, ces limites sont réglementaires ou issues de la réglementation. Mais dans le cas où il n'existe pas de référence établie, il convient de prendre en compte les attentes des utilisateurs finaux, comme une LQ donnée ;
- ✓ La proportion β : Elle représente la proportion de futurs résultats qui seront en moyenne compris dans les intervalles de tolérance. La valeur choisie pour β dépend largement du champ d'application (contrôle sanitaire, contrôle de fabrication, etc.). Il est évident que plus β est petit, par exemple 70 %, plus la méthode risque de produire des résultats qui ne correspondent pas aux spécifications annoncées. C'est pourquoi, dans la méthode du profil d'exactitude cette proportion a été fixée à 80 %, au moins. [42]

L'interprétation est faite de la manière suivante :

- Si l'intervalle de tolérance est entièrement compris dans l'intervalle d'acceptabilité, on peut alors conclure que la méthode est capable de fournir des résultats acceptables dans une proportion au moins égale à β . La méthode est validée.
- Mais dès que l'intervalle de tolérance sort de l'intervalle d'acceptabilité, on peut conclure que la méthode n'est plus capable de fournir suffisamment de résultats acceptables, en fonction des choix faits au départ de l'étude. la méthode n'est pas validée.

Dans certains cas, on peut limiter le domaine d'utilisation ce qui permet de valider la méthode pour ce nouveau domaine défini (appelé alors domaine de validité).

Dans d'autres cas, en présence d'un biais important, on peut éventuellement appliquer une correction avant de valider la méthode. [19]

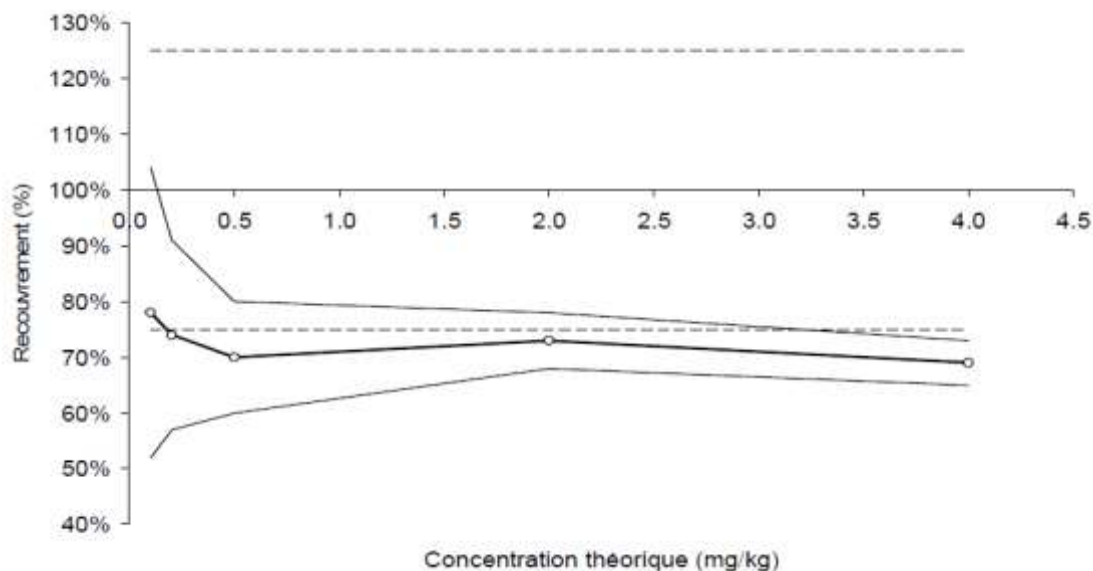


Figure 16 : exemple d'un profil d'exactitude pour une méthode présentant un biais systématique important, caractérisé par un taux de recouvrement d'environ 70 %.

- **Règles de décision :**

Reporter les limites d'acceptabilité sur le graphique du profil d'exactitude pour permettre une interprétation visuelle directe des résultats. La figure 15 illustre une situation classique où la majeure partie des intervalles de tolérance est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité. Dès que l'intervalle de tolérance sort de l'intervalle d'acceptabilité, on peut conclure que la méthode n'est plus capable de fournir suffisamment de résultats acceptables, en fonction des choix faits au départ de l'étude. Par exemple, pour $\beta = 80\%$ et une limite d'acceptabilité de $\pm 25\%$, on peut conclure que la méthode est valide entre environ 0,2 mg/kg et 4,0 mg/kg. En outre, ce graphique fournit d'autres indications. En particulier, sur la figure 15, il apparaît que la justesse varie avec la concentration. Le taux de recouvrement qui traduit la justesse est d'environ 108 % aux basses concentrations pour être proche de 100 % aux concentrations élevées. À l'aide des résultats statistiques, on peut trouver différents éléments qui expliquent le comportement de ce biais de la méthode.

Dans le cas illustré par la figure 16, la méthode présente un biais systématique élevé : le taux de recouvrement est seulement d'environ 70 % ; dû par exemple à un effet de matrice non contrôlé. Il faut alors conclure que la méthode n'est pas valide dans le domaine étudié. Si les pratiques de la profession ou la réglementation le permettent, il est alors possible d'appliquer un facteur de correction qui viendra corriger ce biais. La procédure à appliquer pour calculer et valider ce facteur de correction est décrite par Max Feinberg (2010c). [42]

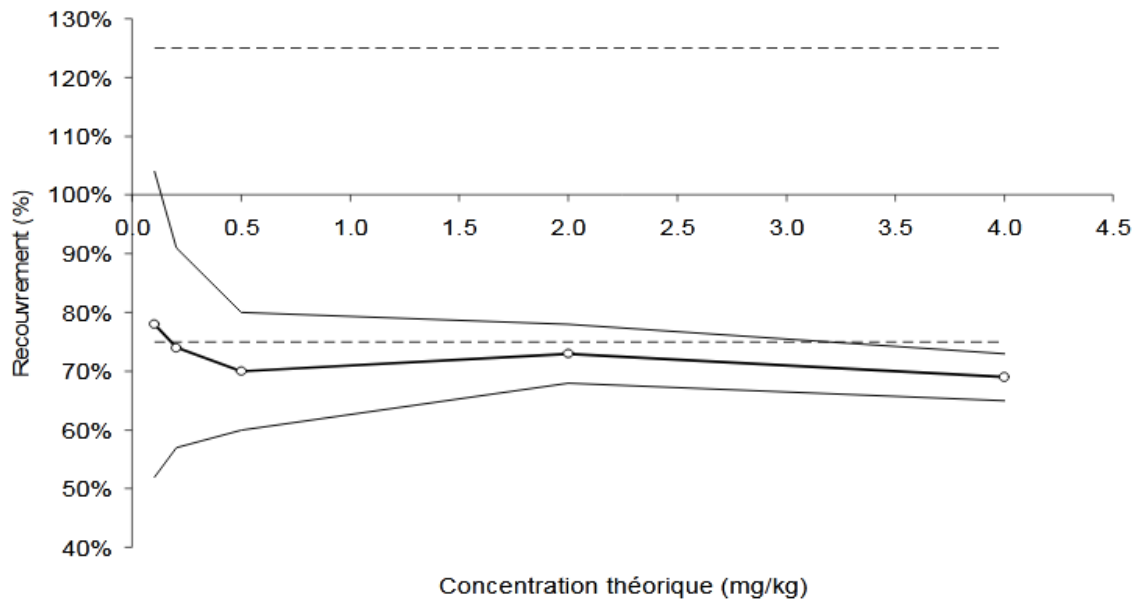


Figure 17: exemple d'un profil d'exactitude pour une méthode présentant un biais systématique important, caractérisé par un taux de recouvrement d'environ 70 %.

DEUXIEME PARTIE :

**PARTIE
PRATIQUE**

I. Matériel et Méthodes :

I.1.Type d'étude :

C'est une étude expérimentale qui vise à valider une technique analytique « électrochimie » pour le dosage des électrolytes Na Cl dans le sérum salé 0.9% en appliquant le protocole statistique des critères de validation selon le guide SFSTP (2003 – 2006)

I.2.Choix de la technique :

La technique électrochimique choisie est la **conductimétrie** pour plusieurs raisons :

- La nature de l'expérience : le dosage concerne les électrolytes Na⁺ et Cl⁻ qui sont des conducteurs parfaits de l'électricité donc la possibilité d'utiliser un conductimètre.
- Relation directe entre quantité (concentration) et conductivité.
- Faisabilité et la disponibilité de l'appareillage et ses étalons.
- Technique très sensible.

I.3.Lieu de l'étude :

Tout le travail a été effectué dans le laboratoire de chimie analytique et le laboratoire de chimie minérale du département de pharmacie faculté de médecine DR. B. BENZERDJEB - TLEMCEN.

I.4.Critère de jugement :

On a jugé la conductivité des électrolytes Na⁺ et Cl⁻ dans les échantillons préparés.

Les résultats sont exprimés en ms/cm à 25 °C.

I.5.MATERIELS :

I.5.1. Appareillage:

1. Les Fioles jaugées de 100 ml.
2. Entonnoirs.
3. Béchers.
4. Filtres.
5. Pissette.
6. Erlenmeyer.
7. Spatule.
8. Balance analytique de précision.

9. Barreau magnétique.
10. Thermomètre.
11. Agitateur magnétique.
12. Etuve.
13. Conductimètre référence : EC214
14. Logistique ; logiciel Excel et logiciel iVal 1.0.

I.5.2. Réactifs

1. Chlorure de sodium (ISO 13485 :2003 CERTIFIED)
N° de lot : C2B6AQ01.
2. Eau distillée.
3. Une solution étalon pour étalonner le conductimètre.

I.6.METHODES :

I.6.1. Mode opératoire:

Protocole de validation :

Nous avons procédé à la validation de la méthode de dosage des électrolytes du sérum salé conformément au protocole du guide de la SFSTP 2006, selon un intervalle de dosage d'ICH de 80 à 120 % avec un pas de 20% c'est-à-dire trois niveaux de concentration 80 %,100%, 120 %.

- La procédure de validation est réalisée sur 3 jours.
- Chaque jour comprend une série de Standard d'étalonnage (SE) et une série de standard de validation (SV).
- Chaque série comprend 3 répétitions par un niveau de concentrations.
- Chaque jour un opérateur différent effectue une série de Standard d'étalonnage (SE) et une série de standard de validation (SV), soit 3 opérateurs différents sur les 3 jours.

- Le plan d'expérience de validation consiste en 3 jours, trois niveaux et trois répétitions ($3 \times 3 \times 3$) soit 27 essais. Le plan d'étalonnage consiste en 3 jours, trois niveaux et trois répétitions ($3 \times 3 \times 3$) soit 27 essais.

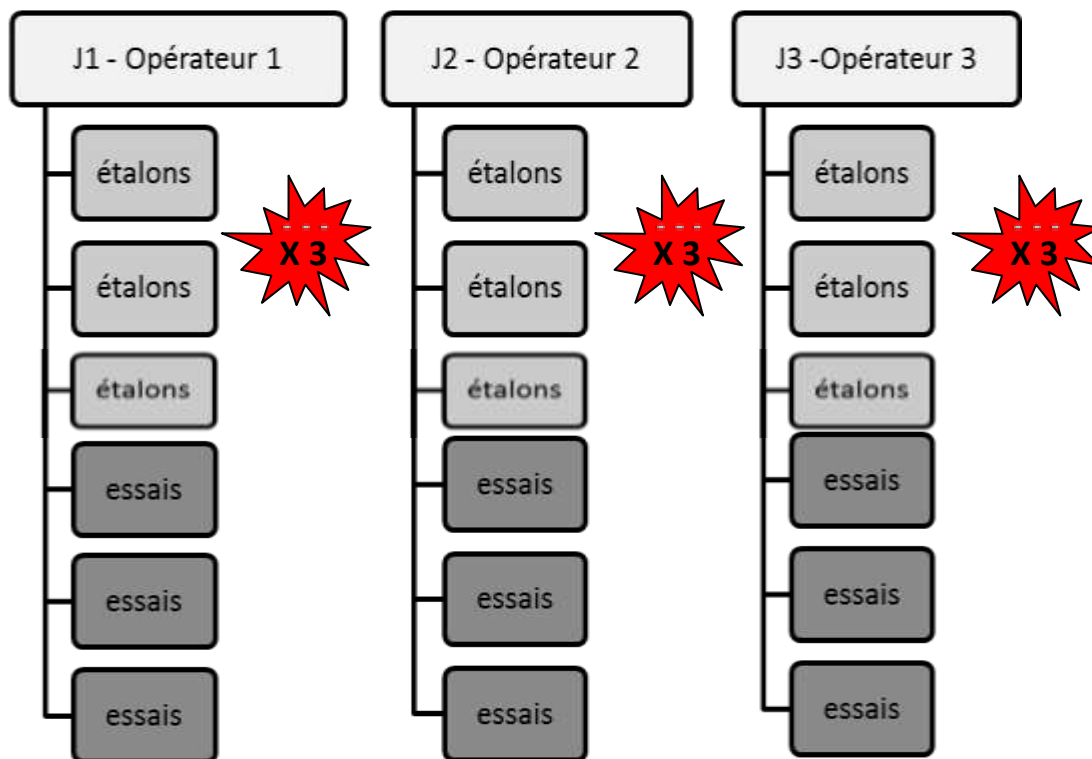


Figure 18 : Protocole de validation.

I.6.2. Préparation des échantillons:

Préparation de la solution Standard d'étalonnage :

Trois niveaux de concentrations sont préparés (80% ,100 %,120%) et pour chaque échantillon de chaque niveau de concentration :

- Peser la quantité équivalente au pourcentage de concentration de chlorure de sodium (ANNEXE II) avec une balance analytique.
- Dissoudre la quantité pesée avec l'eau distillée dans une fiole jaugée de 100 ml.
- Ajuster avec l'eau distillée jusqu'au trait de jauge et homogénéiser.
- Verser les 100ml préparés dans un bécher.
- Etalonner le conductimètre par ses solutions étalons.
- Introduire l'électrode de conductimètre dans le bécher et mesurer la conductivité.

- Rincer à chaque fois l'électrode et la verrerie avant et après les mesures avec l'eau distillée.
- Mesurer à chaque fois la température des solutions et s'assurer qu'elle est à 25°C, chauffer ou refroidir s'il le faut pour l'obtenir car la conductivité est sensible à la température.

Préparation de la solution Standard de validation :

Trois niveaux de concentrations sont préparés (80% ,100 %,120%) et pour chaque échantillon de chaque niveau de concentration :

- Peser la quantité équivalente au pourcentage de concentration de chlorure de sodium (ANNEXE III) avec une balance analytique.
- Dissoudre la quantité pesée avec l'eau distillée dans une fiole jaugée de 100 ml.
- Ajuster avec l'eau distillée jusqu'au trait de jauge et homogénéiser.
- Verser les 100ml préparés dans un bécher.
- Etalonner le conductimètre par ses solutions étalons.
- Introduire l'électrode de conductimètre dans le bécher et mesurer la conductivité.
- Rincer à chaque fois l'électrode et la verrerie avant et après les mesures avec l'eau distillée.
- Mesurer à chaque fois la température des solutions et s'assurer qu'elle est à 25°C, chauffer ou refroidir s'il le faut pour l'obtenir car la conductivité est sensible à la température.

N.B. dans cette validation la série SE et la série SV est la même, car la forme pharmaceutique ne contient pas d'excipient juste l'eau distillée et les électrolytes Na⁺ Cl⁻

II. Résultats :

II.1. Le plan d'étalonnage :

Le plan d'étalonnage comporte $I = 3$ séries (jours) pour $K^c = 3$ niveaux de concentration et $J' = 3$ répétitions par jour et par niveau, soit un total de 27 Essais.

Tableau 6: plan d'étalonnage (mesures exprimées en ms/cm à 25 °C).

Série d'étalonnage SE		Jour 1		Jour 2		Jour 3	
Niveau C %	C théorique	C réelles	Réponses	C réelles	Réponses	C réelles	Réponses
80 %	0,72	0,72	12,05	0,72	12,02	0,72	11,92
80 %	0,72	0,72	12	0,72	12,01	0,72	11,94
80 %	0,72	0,72	11,92	0,72	11,99	0,72	11,92
100 %	0,9	0,9	14,61	0,9	14,78	0,9	14,72
100 %	0,9	0,9	14,75	0,9	14,77	0,9	14,69
100 %	0,9	0,9	14,7	0,9	14,72	0,9	14,72
120 %	1,08	1,08	17,41	1,08	17,49	1,08	17,48
120 %	1,08	1,08	17,42	1,08	17,41	1,08	17,41
120 %	1,08	1,08	17,41	1,08	17,43	1,08	17,45

II.2. Le plan de validation :

Le plan de validation comporte $I = 3$ séries (jours) pour $K^c = 3$ niveaux de concentration et $J' = 3$ répétitions par jour et par niveau, soit un total de 27 Essais.

Tableau 7: plan de validation (mesures exprimées en ms/cm à 25 °c).

Série de validation SV		Jour 1		Jour 2		Jour 3	
Niveau C %	C théorique	C réelles	Réponses	C réelles	Réponses	C réelles	Réponses
80 %	0,72	0,72	12,03	0,72	11,97	0,72	12,01
80 %	0,72	0,72	11,91	0,72	11,95	0,72	11,93
80 %	0,72	0,72	11,95	0,72	11,9	0,72	11,98
100 %	0,9	0,9	14,74	0,9	14,7	0,9	14,76
100 %	0,9	0,9	14,76	0,9	14,69	0,9	14,8
100 %	0,9	0,9	14,76	0,9	14,72	0,9	14,7
120 %	1,08	1,08	17,45	1,08	17,45	1,08	17,49
120 %	1,08	1,08	17,43	1,08	17,48	1,08	17,49
120 %	1,08	1,08	17,43	1,08	17,41	1,08	17,51

II.3. Les Calculs :

II.3.1. Estimation des paramètres de la droite :

Les modèles choisis : modèles linéaires :

La droite $Y=bx+a$ ne passe pas par l'origine.

La droite $Y=bx$ passe par l'origine.

La méthode de calcul : est la méthode de régression aux moindres carrés.

A partir de : Série d'étalonnage.

a. Estimation des paramètres de la droite $Y=bx+a$:

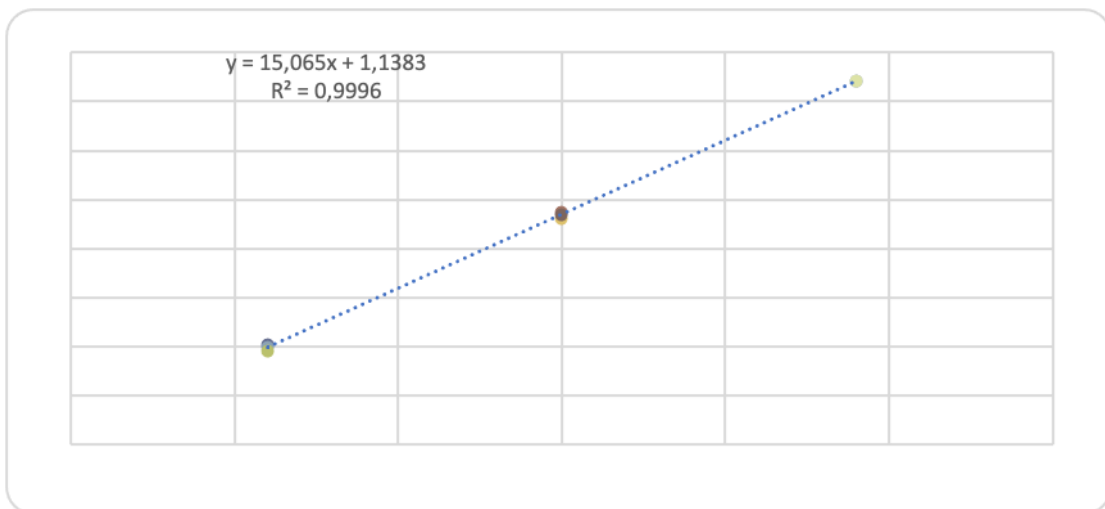


Figure 19 : conductivité= f (concentrations)-jour1-

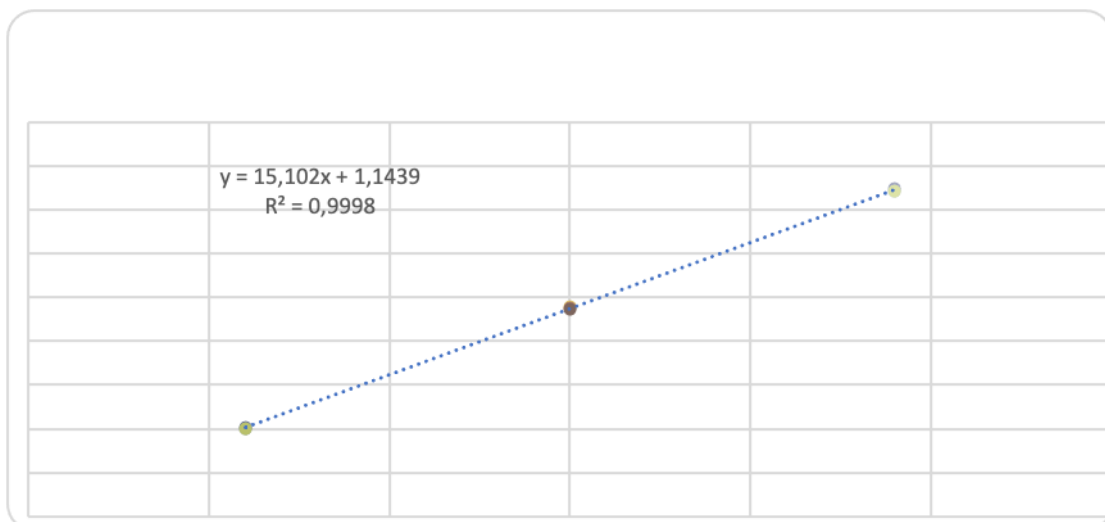


Figure 20 : conductivité= f (concentrations)-jour2-

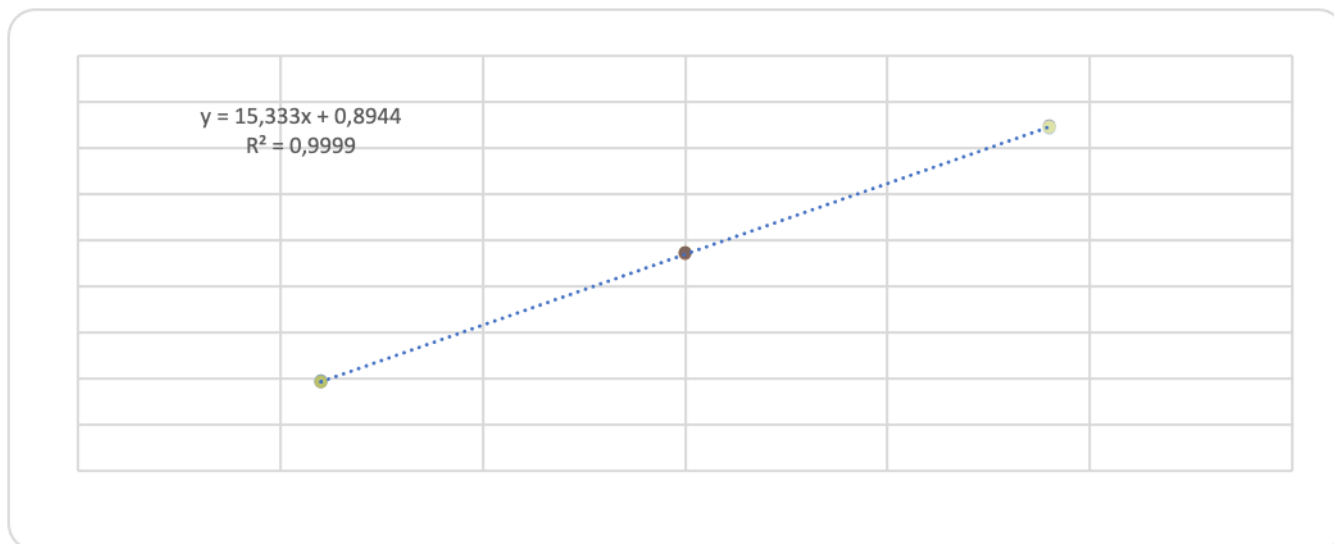


Figure 21 : conductivité=f(concentrations)-jour3-

Tableau 8 : coefficients de modèles d'étalonnage $Y=bx+a$.

Jour	B	A	R ²
1	15,0648148148147	1,13833333333334	0,999565378283254
2	15,1018518518517	1,143888888888901	0,999819467085864
3	15,3333333333333	0,8944444444444504	0,999903254866053

b. Estimation des paramètres de la droite $Y=bx$:

Tableau 9: coefficients de modèles d'étalonnage $Y=bx$.

	Jour 1	Jour 2	Jour 3
B	16,2967772967773	16,3398268398268	16,3013468013468

II.3.2. Prédiction inverse :

À partir des coefficients des différents modèles d'étalonnage obtenus et des mesures des échantillons de validation, on calcule les concentrations prédites inverses de chaque répétition en prenant soin d'utiliser les modèles obtenus pour chaque série.

Tableau 10: Concentrations retrouvées par prédiction inverse à partir des données du plan de validation (exprimées en mg/l).

			X = (Y-a) /b	X = Y/b
			Concentration calculée	Concentration calculée
Jour 1	80 %	0,72	0,722987093	0,73818276
	80 %	0,72	0,715021512	0,73081934
	80 %	0,72	0,717676706	0,73327381
	100 %	0,9	0,90287646	0,9044733
	100 %	0,9	0,904204057	0,90570054
	100 %	0,9	0,904204057	0,90570054
	120 %	1,08	1,082765827	1,07076385
	120 %	1,08	1,08143823	1,06953661
	120 %	1,08	1,08143823	1,06953661
Jour 2	80 %	0,72	0,716873084	0,7325659
	80 %	0,72	0,715548743	0,7313419
	80 %	0,72	0,712237891	0,72828189
	100 %	0,9	0,897645616	0,89964234
	100 %	0,9	0,896983446	0,89903034
	100 %	0,9	0,898969957	0,90086634
	120 %	1,08	1,079742489	1,06794277
	120 %	1,08	1,081729001	1,06977878
	120 %	1,08	1,077093807	1,06549477
Jour 3	80 %	0,72	0,724927536	0,73674894
	80 %	0,72	0,719710145	0,73184137
	80 %	0,72	0,722971014	0,7349086
	100 %	0,9	0,904275362	0,90544666
	100 %	0,9	0,906884058	0,90790044
	100 %	0,9	0,900362319	0,90176598
	120 %	1,08	1,082318841	1,07291748
	120 %	1,08	1,082318841	1,07291748
	120 %	1,08	1,083623188	1,07414438

II.3.3. Calculer les critères de validation :

a. Justesse :

Tableau 11: Estimation de la justesse.

Modèle	Niveau	Conc. Moyenne calculée	Biais absolu	Biais relatif	Recouvrement
y=bx+a	80%	0,718661524889313	-0,001338475110687	-0,18589932	99,81410068
	100%	0,901822814552291	0,001822814552291	0,20253495	100,202535
	120%	1,081385383705060	0,001385383705058	0,12827627	100,1282763
y=bx	80%	0,733107168497219	0,013107168497220	1,82044007	101,8204401
	100%	0,903391831161153	0,003391831161153	0,37687013	100,3768701
	120%	1,070336971346040	-0,009663028653959	-0,89472488	99,10527512

b. Erreur totale

Erreur totale = |Biais%|+ fidélité intermédiaire = justesse + fidélité

L'erreur totale d'une procédure analytique évalue son aptitude à produire des résultats exacts. Elle est estimée pour chaque niveau j de concentration

Tableau 12: Estimation de l'exactitude.

Niveaux	Y = b X + a	Y = b X
80	0,825113172	2,248584589
100	0,62469379	0,758214983
120	0,318996691	1,177644436

c. Intervalle de tolérance :

Calculer les limites des intervalles de tolérance selon la méthode décrite dans Feinberg M.

➤ **Pour le modèle Y= bx+a :**

Tableau 13: Intervalle de tolérance du modèle Y=bx+a.

Niveaux	LAI	Min	Biais %	Max	LAS
80	-5	-2,44310502	-0,18589932	2,07130638	5
100	-5	-1,84447553	0,20253495	2,24954543	5
120	-5	-0,45637577	0,12827627	0,71292831	5

➤ Pour le modèle $Y=bx$:

Tableau 14: Intervalle de tolérance du modèle $Y=bx$.

Niveaux	LAI	Min	Biais %	Max	LAS
80	-5	0,69951483	1,82044007	2,94136531	5
100	-5	-0,98823533	0,37687013	1,74197559	5
120	-5	-2,27619651	-0,89472488	0,48674676	5

II.3.4. Construction du profil d'exactitude :

La construction se fait en sélectionnant les valeurs de la ligne « concentration moyenne théorique » en abscisses et les valeurs des cinq lignes sous le titre « profile d'exactitude » en ordonnées.

➤ *Modèle $Y=bx+a$:*

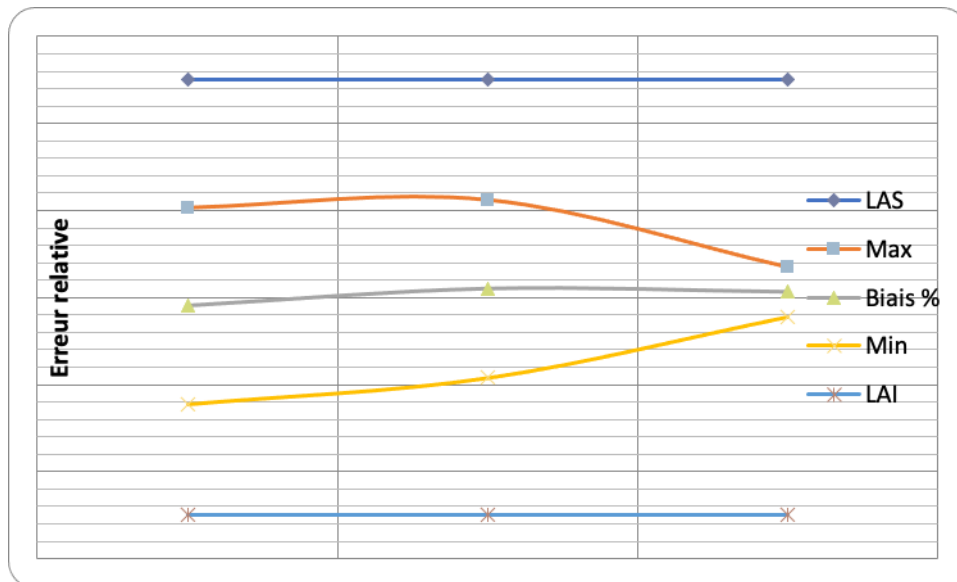


Figure 22 : profil d'exactitude pour le modèle $y=bx+a$.

➤ *Modèle $Y=bx$:*

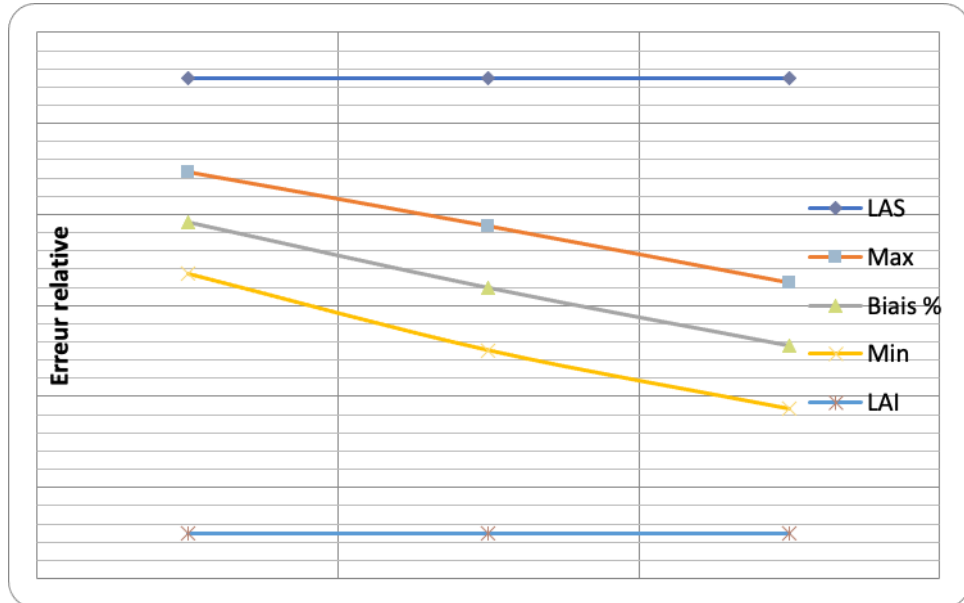


Figure 23 : profil d'exactitude pour le modèle $y=bx$.

III. Discussion :

D'après les résultats des figures, le coefficient de corrélation R est égale à 0.9999, très proche de 1, ce qui signifie que la méthode est linéaire à l'intérieur de l'intervalle des concentrations étudiées : 0.72 à 1.08.

Cette méthode est plus sensible que celle de référence basée sur la précipitation, mais elle présente l'inconvénient d'être non spécifique, c'est à dire qu'elle n'est pas capable de distinguer les différents types d'ions et par conséquent ne peut fournir qu'un résultat proportionnel à tous les ions présents.

❖ Pour le modèle $Y=bx+a$:

On observe que les limites de tolérance à 95 % sont comprises entre les limites d'acceptabilité à ± 5 % (donc on n'utilise pas un facteur de correction), et vue qu'il n'y ait pas une intersection entre la limite d'acceptabilité et la limite de tolérance. La limite de quantification haute et basse correspond au point haut et bas de la gamme des échantillons de validation. La méthode est donc validée entre 0.72 à 1.08 ($\lambda=5\%$, $\beta=95\%$), c'est-à-dire cette méthode est considérée comme valide dans tous les domaines étudiés.

Par ailleurs, on constate que, d'une part la fidélité varie en fonction de la concentration puisque son coefficient de variation passe de 0.63 % à 0.19 %, et d'autre part, la justesse varie aussi puisque le biais de justesse varie de -0.185 % à 0.128 %. Cette remarque souligne l'intérêt de procéder aux calculs niveau par niveau, Cependant, ce biais n'a pas d'influence importante sur la validité de la méthode.

❖ Pour le modèle $Y=bx$:

La méthode est donc validée entre 0.72 à 1.08 ($\lambda=5\%$, $\beta=95\%$) pour ce modèle d'étalonnage $Y=bx$ car dans ce domaine, l'intervalle de tolérance est compris dans l'intervalle d'acceptabilité.

Dans ce modèle $Y=bx$ on a besoin de faire les calculs niveau par niveau parce qu'il y a une variation du coefficient de variation de la fidélité et le biais en fonction de la concentration.

✚ Le choix du meilleur profil :

L'examen du profil d'exactitude conduit aux observations suivantes :

- **Pour la fonction de réponse $y=bx+a$:**

Le profil d'exactitude montre un élargissement de l'intervalle de tolérance plus important en dessous de 0.9 cm/ms et moins important au-dessus de ce niveau de concentration, et l'intervalle de tolérance est toujours compris dans les limites d'acceptation de 5%,

- on observe aussi un biais positif pour les niveaux 2 et 3, et négatif pour le niveau 1. Dans tous les cas le biais observé est proche de 0.

▪ **Pour la fonction de réponse $y=bx$:**

- On observe un biais positif pour les niveaux 1 et 2, et négatif pour le niveau 3. Le biais observé est un peu loin de 0, mais dans tous les cas est inférieur à 2.

Dans les deux cas, les modèles d'étalonnage sont valides parce que leur intervalle de tolérance est inclus dans les limites d'acceptabilités.

Et généralement le choix d'un meilleur modèle se fait par rapport aux besoins du client (qui sont cités dans un cahier de charge) mais pour nous le choix s'effectue en basant sur les objectifs de trouver des biais plus proches de zéro, avec un intervalle de tolérance le plus étroit et situé à l'intérieur des limites d'acceptabilité, une meilleure justesse et limite de quantification la plus basse : pour les deux modèles d'étalonnage $y=bx+a$ ou $y=bx$ on a les mêmes limites de quantification.

Nous avons sélectionné le modèle $Y=bx+a$, après avoir examiné soigneusement les profils d'exactitudes des 2 modèles.

CONCLUSION

Dans ce travail on a réussi à proposer une méthode alternative pour le dosage des électrolytes du sérum salé, et la valider en se basant sur le guide de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP)

Les résultats obtenus montrent que les différents critères de validation analytique par le concept de l'erreur totale ont été satisfaisants et nous pouvons donc conclure que la nouvelle méthode de dosage du sérum salé par la technique conductimétrique est valide dans le domaine étudié [0.72 à 1.08] en fixant les limites de tolérance à 95 % et les limites d'acceptabilité à ± 5 %

Cette méthode basée sur la mesure de la conductivité, présente beaucoup d'avantages par sa facilité de réalisation et son faible coût et sa rapidité, et nous souhaitons que cette méthode devienne une méthode de référence pour le dosage des électrolytes dans le sérum salé.

La démarche harmonisée -pour la validation des méthodes analytiques basée sur le profil d'exactitude, lui-même basé sur la notion d'erreur totale (biais + écart type), proposé par la commission SFSTP sur la validation des méthodes analytiques- a montré son applicabilité et sa facilité de réalisation, permettant de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] : miomandre f., et al., 2011. "électrochimie" : des concepts aux applications. 2e édition, paris, france. 409p
- [2] : yann v., 2006. de l'oxydoréduction à l'électrochimie. 1^{er} édition, ellipses, 328 p.
- [3] : douglas a., donald m., 2015, chimie analytique. 3e édition, de boeck, 1176 p.
- [4] : jean l., 2011. chimie analytique et équilibres ioniques. 1^{er} édition, lavoisier, 826 p
- [5] : burgot jean-louis. chimie analytique et équilibres ioniques. éditions tec & doc. p. 197 – 412.
- [6] : mendham et al., 2006. analyse chimique quantitative de vogel, paris, france. 889p
- [7] : lefrou c., et al., 2013. "électrochimie" : concepts fondamentaux illustré. nouvelle édition, grenoble, france. 384p
- [8] : francis r., et al., 2015. analyse chimique - méthodes et techniques instrumentales : méthodes et techniques instrumentales-, 9e édition, dunod, 592 p.
- [9] : alexév. analyse quantitative. 3e éd., édition mir. moscou, 1980. oxydo-réduction, p. 356– 420.
- [10] : guernet michel ; hamon michel. abrégé de chimie analytique, tome 1 : chimie des solutions. 2e éd. édition masson. paris, 1990, p.191 – 210.
- [11] : vidal expert, version 2020.08.1.
- [12] : david r. lide, crc handbook of chemistry and physics, 88th edition (2007-2008), crc press, 2608 p. isbn : 978-0849304873
- [13] : pharmacopée européenne 6e édition, publiée le 16 juillet 2007
- [14] : picot a., gaidou f. fiche resumée toxico ecotoxico chimique. association toxicologie chimie.
- [15] : société chimique de france : sel (chlorure de sodium). [pdf], <http://www.societechimiquedefrance.fr/sel-chlorure-2de-sodium.html> , page consulté le 14/05/2020.

[16] : Roland f.,2005. propriétés physiques, mécaniques, etélectroniques des matériaux solides, ecole nationale supérieure des mines saint-etienne-, [pdf]. disponible sur : https://www.emse.fr/~fortunier/cours/physics_of_solid_materials/poly.pdf

[17] : Max f, michel laurentie. 2010. validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude [internet]. institut national de la recherche agronomique-inra- . disponible sur : https://www6.inrae.fr/cahier_des_techniques

[18] : ICH q2r1.

[19] : Feinberg m.,2012. Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude. dossier *techniques de l'ingénieur l'expertise technique et scientifique de référence*, p224v2.

[20]: Feinberg M., Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude-
-[PDF].Disponible sur :

https://www6.inrae.fr/cahier_des_techniques/layout/set/print/content/download/3286/31783/version/1/file/03_IntroFeinb.pdf

[21]: Commission sfstp, ph. hubert, j.j. nguyen-huu, b. boulanger, e. chapuzet, p. chiap, n. cohen, p.a. compagnon, w. dewe, m. feinberg, m. lallier, m. laurentie, n. mercier, g. muzard, c. nivet, l. valat.,2006. validation des procédures analytiques quantitatives harmonisation des démarches.

[22] : ich : validation des méthodes d'analyse : texte et méthodologie [web], disponible sur <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/medicaments-produits/sante/medicaments/demandes-presentations/lignes-directrices/international-conference-harmonisation/qualite/validation-methodes-analyse-texte-methodologie.html> (consulté le 13/03/2020)

[23] : iso. iso/iec 17025 :2017, exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

[24] : norme nf u47-600-1. méthodes d'analyse en santé animale - pcr (réaction de polymérisation en chaîne) - partie 1 : exigences et recommandations pour la mise en œuvre de la pcr en santé animale .disponible sur : <https://norminfo.afnor.org/norme/nf%20u47-600->

1/methodes-danalyse-en-sante-animale-pcr-reaction-de-polymerisation-en-chaine-partie-1-exigences-et-recommandations-pour/105188 .

[25] : iso/tc 176/sc 1 , 1994, iso 8402:1994 : management de la qualité et assurance de la qualité -vocabulaire, 2eme édition, organisation internationale de normalisation(iso), 39p. disponible sur : <https://www.iso.org/fr/standard/20115.html> .

[26] : jcgm 200 :2012 : vocabulaire international de métrologie – concepts fondamentaux et généraux et termes associés (vim). [pdf] (2008), disponible sur : https://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/jcgm_200_2012.pdf .

[27] : joffin c., lafont f., mathieu e., 2015.le guide de métrologie pour les laboratoires.1er édition,lexitis, paris, france, 318 p. isbn :978-2-36233-149-7

[28] : feinberg m., 2009. labo-stat- guide de validation des méthodes d'analyse.2^{ème} édition, tec et doc, paris, france,362 p. isbn :978-2-7430-1106-2.

[29] : oms, guide oms des normes relatives aux bonnes pratiques de fabrication (bpf), partie 1 : modes opératoires normalisés et formules originales de fabrication. disponible sur : https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68527/who_vsq_97.01_fre.pdf?sequence=1&isallowed=y

[30] :<http://www.sante.gouv.fr> ; la page consulté le 19/02/2020

[31] :<http://nte-serveur.univ-lyon1.fr> ; la page consulté le 22/02/2020

[32] :<http://ich.org/> ; la page consulté le 19/02/2020

[33] :<http://www.iso.org> ; la page consulté le 22/02/2020

[34] : max feinberg. validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude-introduction-.disponible sur : https://www6.inrae.fr/cahier_des_techniques/layout/set/print/content/download/3286/31783/version/1/file/03_introfeinb.pdf .

[35] : norme nf v03-110 [internet]. disponible sur : <https://norminfo.afnor.org/norme/nf%20v03-110/analyse-des-produits-agricoles-et-alimentaires-protocole-de-caracterisation-en-vue-de-la-validation-dune-methode-danalyse/83631>

[36] :iso :iso 5725-5 :1998 exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure -partie 5 : méthodes alternatives pour la détermination de la fidélité d'une méthode de mesure normalisée [web], disponible sur : <https://www.iso.org/fr/standard/1384.html>

[37] : commission sfstp, ph. hubert, j.j. nguyen-huu, b. boulanger, e. chapuzet, p. chiap, n. cohen, p.a. compagnon, w. dewe, m. feinberg, m. lallier, m. laurentie, n. mercier, g. muzard, c. nivet, l. valat.,2006. validation des procédures analytiques quantitatives harmonisation des démarches.

[38] : World health organization ,2016, guidelines on validation – appendix 4 analytical method validation (june 2016).

[39] : Bouabidi a., 2013. étude critique des différentes approches de validation des méthodes analytiques. thèse doctorat : sciences pharmaceutiques. faculté des sciences ben m'sik casablanca-faculté de médecine département pharmacie université de liège, 2013.

[40] : Feinberg m. : principes et vocabulaire pour la validation des méthodes. [pdf](2010) disponible sur : https://www6.inrae.fr/cahier_des_techniques/content/download/3288/31789/version/1/file/13_feinberg_valid.pdf

[41] : Feinberg m., 2010. mise en œuvre du profil d'exactitude-validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude -. cahier technique de l'inrae.

[42] : ait hamouda n., belgacem a.,2013. etablissement d'une nouvelle procédure de validation,de performance et d'équivalence entre deux techniques analytiques (uplc/hplc),cas du dosage de di-dolex ®.thèse de doctorat :pharmacie.université d'alger centre,75p.

[43] : Commission sfstp, p. hubert, j.j. nguyen-huu, b. boulanger, e. chapuzet, n. cohen, p.a. compagnon, w. dewé, m. feinberg, m. laurentie, n. mercier, g. muzard, l. valat.,2006. validation des procédures analytiques quantitatives : harmonisation des démarches partie ii - statistiques. stp pharma.

[44] : logiciel Excel et logiciel iVal 1.0.

ANNEXE I :

La formule basique du **pourcentage massique** d'un composé est :

$$\text{Pourcentage massique} = (\text{masse molaire de l'élément/masse moléculaire totale du composé}) \times 100.$$

Donc :

A 0.9 % :

0.9 g du chlorure de sodium \longrightarrow dans 100 g d'eau distillé.

On sait bien que : 100 g d'eau distillé =100 ml. (est la raison pour laquelle on travaille avec des fiole de 100 ml).

A 0.72 % :

0.72 g du chlorure de sodium \longrightarrow dans 100 g d'eau distillé.

On sait bien que : 100 g d'eau distillé =100 ml. (est la raison pour laquelle on travaille avec des fiole de 100 ml).

A 1.08 % :

1.08 g du chlorure de sodium \longrightarrow dans 100 g d'eau distillé.

On sait bien que : 100 g d'eau distillé =100 ml. (est la raison pour laquelle on travaille avec des fiole de 100 ml).

ANNEXE II :

Les quantités de chlorures de sodium pour chaque échantillon des standards d'étalonnages

Pourcentage massique %	Nom d'échantillon	Masse en gramme
0.72 %	E1	0.72 g
	E2	0.72 g
	E3	0.72 g
0.9%	E4	0.9 g
	E5	0.9 g
	E6	0.9 g
1.08 %	E7	1.08 g
	E8	1.08 g
	E9	1.08 g

ANNEXE III :

Les quantités de chlorures de sodium pour chaque échantillon des standards de validation

Pourcentage massique %	Nom d'échantillon	Masse en gramme
0.72 %	E1	0.72 g
	E2	0.72 g
	E3	0.72 g
0.9%	E4	0.9 g
	E5	0.9 g
	E6	0.9 g
1.08 %	E7	1.08 g
	E8	1.08 g
	E9	1.08 g

Résumé :

La validation d'une méthode d'analyse consiste à apporter la preuve qu'elle est adaptée aux objectifs que l'on s'est fixé. La fiabilité des résultats analytiques qui sont obtenus lors de la réalisation des méthodes analytiques ont un rôle très important pour la prise de décisions, telle que la détermination de la qualité et de la quantité, pour cela, nous devons valider chaque méthode analytique utilisée.

L'objectif de ce travail est de proposer et valider une autre méthode pour le dosage des électrolytes du sérum salé : « la conductimétrie », une technique rapide, simple et sensible qui peut remplacer la précipitation et offre une alternative pour l'utilisation en routine au niveau des laboratoires de contrôle.

Après l'application du nouveau protocole de validation SFSTP 2003-2006, les résultats obtenus montrent que les différents critères de validation analytique par le concept de l'erreur totale ont été satisfaisants et nous pouvons donc conclure que la nouvelle méthode de dosage du sérum salé par la technique conductimétrique est valide dans le domaine étudié [0.72 à 1.08] en fixant les limites de tolérance à 95 % et les limites d'acceptabilité à ± 5 %.

Abstract :

The validation of an analytical method consists in providing the proof that it is adapted to the objectives which one has set. The reliability of the analytical results which are obtained during the realization of the analytical methods have a very important role for making decisions, such as determining quality and quantity, for this we need to validate each analytical method used.

The objective of this work is to propose and validate another method for the determination of the electrolytes of salted serum: "conductimetry", a rapid, simple and sensitive technique which can replace precipitation and offers an alternative for routine use. at the level of control laboratories.

After the application of the new SFSTP 2003-2006 validation protocol, the results obtained show that the various analytical validation criteria by the concept of total error were satisfactory and we can therefore conclude that the new salt serum assay method by the conductimetric technique is valid in the field studied [0.72 to 1.08] by setting the tolerance limits at 95% and the acceptability limits at ± 5 %.

Les Mot clés :

- validation analytique, SFSTP, conductimétrie, les électrolytes, sérum salé, étalonnage, spécificité, sélectivité, erreur, sensibilité, linéarité, justesse, fidélité, Exactitude, robustesse, les standards de validation (SD), les standard d'étalonnage.