

Master Sciences et Techniques CAC Agiq
Chimométrie et Analyse Chimique : Application à la gestion industrielle
de la qualité

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Validation analytique par l'approche du profil
d'exactitude d'une méthode chromatographique liquide
de dosage de la bupivacaine dans le plasma humain

Présenté par:

BEN-SAGHROUNE Hayat

Encadré par:

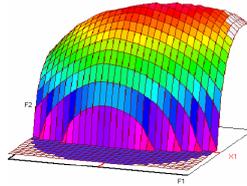
Pr. KHABBAL Youssef
Pr. IHSSANE Bouchaib

CHU Hassan II Fès
FST Fès

Soutenu Le 16 Juin 2014 devant le jury composé de:

- Pr B. IHSSANE**
- Pr T. SAFFAJ**
- Pr A. LHASSANI**

Stage effectué au laboratoire de pharmacologie CHU Hassan II



Master ST CAC Agiq

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et prénom: **BEN-SAGHROUNE Hayat**

Année Universitaire : 2013/2014

Titre: Validation analytique par l'approche du profil d'exactitude d'une méthode chromatographique liquide de dosage de la bupivacaïne dans le plasma humain

Résumé

Une méthode de dosage de la bupivacaïne par HPLC est soumise à la validation analytique, pour la quantification de ce médicament dans le sang des patients.

Cette quantification est réalisée après extraction, chromatographie sur une colonne Protecol C8 et détection une longueur d'onde de 210 nm. La phase mobile est composée d'un mélange constitué d'un tampon phosphate (0,01M, pH=4) et acétonitrile, 65 :35.

La validation est réalisée en utilisant l'approche du profil d'exactitude qui consiste à combiner les estimés de la justesse (biais %) et la fidélité (CV%) pour calculer les deux intervalles de tolérance à une attente de 90% des résultats futurs soient inclus dans les limites d'acceptabilité de $\pm 15\%$ dans l'intervalle de concentration étudié de 0,1 à 2 $\mu\text{g/ml}$.

Les résultats obtenus montrent que la méthode chromatographique est valide dans un intervalle de concentration de 0,189 à 2 $\mu\text{g/ml}$. Par ailleurs, l'incertitude de mesure a été également estimée à chaque niveau de concentration. Les valeurs trouvées montrent l'exactitude et la fiabilité de la méthode bioanalytique.

Mots clés: Validation Analytique, Profil d'Exactitude, Erreur totale, Incertitude de mesure, Bupivacaïne, Plasma humain.

SOMMAIRE

Dédicaces
i

Remerciements	ii
Liste des abréviations	iii
Liste des figures	iv
Liste des tableaux	v
Introduction	1
Première partie : Présentation du LCAM du CHU Hassan II Fès	2
I-Présentation du LCAM	2
II-Les différentes méthodes d'analyses médicamenteuses du LCAM :	3
Deuxième partie : Etude bibliographique	4
I-Méthode analytique :	4
II-Généralités sur la validation analytique	6
1-Définition et principe :	6
2-Aspect réglementaire :	6
3-Critères de validation :	6
a. Spécificité, Sélectivité	8
b. Linéarité	10
c. Justesse	10
d. Fidélité	10
e. Exactitude.....	11
f. Limite de quantification	11
g. Intervalle de dosage.....	11
h. Fonction de réponse	11
III-Méthodologie globale au moyen du profil d'exactitude	11
1-Principe :	12
2-Analyse de la fonction de réponse et sélection du modèle d'étalonnage approprié.....	14
3-Calcul de la justesse et de la fidélité	15
4-Calcul des intervalles de tolérance.....	17
5-Profil d'exactitude et décision.....	19
5-1-Calcul.....	19
5-2-choix de la fonction de réponse	19
6-Calcul de la limite de quantification :	19
MST CAC agiq - BEN-SAGHROUNE Hayat	
7-Construction graphique et interprétation :	20
8-Estimation de l'incertitude de mesure :	21
IV-La bupivacaine	22
1-Propriétés physico-chimiques :	22
2-Propriétés pharmacologiques :	22
2-1-Propriétés pharmacodynamiques :	22
2-2-Propriétés pharmacocinétiques :	23
3-Données cliniques :	23

3-1-Indications thérapeutiques :	23
3-2-Posologie et mode d'administration :	23
3-3-Contre-indications :	24
3-4-Effets indésirables :	24
Troisième partie : Etude expérimentale.....	25
I-Méthode de dosage de la bupivacaine	25
1-Réactifs :	25
2-Conditions chromatographiques :	25
3-Solutions étalons:	26
4-Méthode :	26
II-Etude préliminaire et détermination du domaine d'application de la méthode.....	27
1-Domaine de linéarité	27
2-Sélectivité	29
III-Validation au moyen du profil d'exactitude	32
1-Plan expérimental de validation	32
2-Choix du modèle d'étalonnage.....	33
3-Calcul de la justesse et de la fidélité	38
4-Calcul des intervalles de tolérance	39
5-Calcul de la limite de quantification	40
6-Estimation de l'incertitude de mesure	42
Conclusion.....	4
3	
Bibliographies	44
Annexes	46

INTRODUCTION

La bupivacaïne est un anesthésique local amide le plus puissant actuellement employé du fait de sa longue durée d'action. Elle est utilisée dans des opérations chirurgicales. Les effets de cette molécule sont très dépendants de sa dose. Des concentrations veineuses dépassant le seuil peuvent provoquer des signes de toxicité neurologique et cardiaque. C'est pour cette raison sa détermination est souvent demandée.

La maîtrise de la qualité des analyses biologiques est une préoccupation importante pour le laboratoire. D'où la nécessité de valider la méthode de dosage de ce composé chimique.

Ainsi notre travail porte sur la validation analytique d'une méthode chromatographique liquide de dosage de la bupivacaïne dans une matrice plasmatique par l'approche du profil d'exactitude, fondée sur l'estimé des intervalles de tolérance, avec une proportion β de futures mesures incluses dans les limites d'acceptation λ qui est fixé en fonction des contraintes du domaine d'application.

Dans le présent rapport nous présentons d'abord, le laboratoire d'analyse (Lieu de stage), ensuite une étude bibliographique qui portera sur la méthodologie de validation analytique basée sur la notion de l'erreur totale est présentée.

Dans la partie expérimentale, le domaine de linéarité et la sélectivité de la méthode sont vérifiés, puis nous élaborons les plans d'étalonnage et de validation, ce qui nous permet de choisir le modèle d'étalonnage adéquat après la génération de plusieurs modèles, pour pouvoir en fin de calculer les différents critères de validation et de déterminer le domaine de validité de la méthode.

Finalement, l'incertitude de mesure est estimée, en exploitant les résultats de validation, à chaque niveau de concentration.

I-Présentation du LCAM :

Le Laboratoire Central d'Analyses Médicales offre une gamme élargie d'analyses médicales introduites pour la première fois au niveau régional et national.

Le LCAM est constitué de trois niveaux le rez de chaussée, le premier étage et le deuxième étage où on peut trouver l'accueil, les salles de prélèvements, les locaux administratifs et les laboratoires.

Les spécialités qui se trouvent dans le LCAM sont :

- ☞ Biochimie et pharmacotoxicologie
- ☞ Immunologie et sérologie
- ☞ Bactériologie et parasitologie
- ☞ Hématologie cytologie et Hémostase
- ☞ Cytogénétique et Oncogénétique
- ☞ Biologie moléculaire
- ☞ Anatomie pathologie
- ☞ Macroscopie
- ☞ Microscopie
- ☞ Immuno-histochimie



Figure1 : laboratoire central d'analyses médicales du CHU Hassan II

Le Laboratoire de Pharmaco-toxicologie effectue principalement de la recherche, de l'identification et du dosage des médicaments et toxiques pour le CHU Hassan II.

Le laboratoire de pharmacologie-toxicologie possède deux domaines principaux d'activité:

- **L'activité hospitalière de pharmacologie toxicologie**

Le suivi thérapeutique pharmacologique consiste à adapter individuellement la posologie de certains médicaments dans des situations médicales à risque à partir de la mesure de paramètres d'exposition du patient au médicament. Ces activités sont assurées pour les patients hospitalisés au CHU de Fés ainsi que pour des hôpitaux, cliniques et laboratoires de la région.

- **L'activité toxicologique** qui vise à diagnostiquer les principales causes d'intoxication médicamenteuses ou autres tel que l'alcool, les produits stupéfiants, certains pesticides ou herbicides...

Des activités de recherche sont associées à ces activités de laboratoire:

- **L'activité de recherche et développement**

Les praticiens du laboratoire développent de nouvelles méthodes d'analyses permettant de suivre le progrès thérapeutique (nouveaux médicaments), de mesurer des concentrations de plus en plus faibles de toxiques ou médicaments avec des méthodes de plus en plus spécifiques.

II-Les différentes méthodes d'analyses médicamenteuses du LCAM :

Le laboratoire dispose de nombreuses méthodes d'analyses spécifiques à savoir :

☞ Méthodes Immuno-chromatographiques :

Elles sont basées sur le principe de l'immuno-chromatographie sur membrane avec des nanoparticules naturellement colorées en rose.

☞ Méthodes chromatographiques

* CCM : Chromatographie sur couche mince : Les molécules à séparer sont entraînées par un fluide qui en montant dans la phase stationnaire, va entraîner le composé que l'on avait déposé. Il y a donc distribution ou partition des composants entre ces deux phases.

* HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance : La chromatographie en phase liquide à haute performance est une méthode d'analyse physico-chimique, qui sépare les constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase mobile le long d'une phase stationnaire.

☞ Méthodes immuno-enzymatiques :

Ce sont des méthodes analytiques quantitatives qui consistent à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution.

☞ Méthodes colorimétriques :

Elles se basent sur une recherche colorimétrique des médicaments dans les urines et/ou dans le liquide de lavage gastrique.

I-Méthode analytique :

1-Définition :

Une analyse chimique peut être définie comme une suite d'opérations élémentaires, statistiquement indépendantes les unes des autres, qui commencent au moment de la prise d'essai (prélèvement d'un échantillon analytique sur l'échantillon de laboratoire) et aboutissent à l'expression d'un résultat d'analyse qu'il faudra valider pour pouvoir disposer enfin d'une donnée analytique [1].

Une méthode analytique est définie de la manière suivante dans le projet de norme FD V 01-0001: « procédure écrite décrivant l'ensemble des moyens et modes opératoires nécessaires pour détecter et/ou doser l'analyte, c'est-à-dire : domaine d'application, principe et/ou réactions, définitions, réactifs, appareillage, modes opératoires, expression des résultats, fidélité, rapport d'essai (selon l'ISO/DIS 78-2)»

2-Cycle de vie d'une méthode analytique :

D'abord, il convient de préciser à quel moment il faut valider une méthode. En effet, 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 2 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 [12].

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, 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.

Lorsque le laboratoire applique intégralement une méthode normalisée, certains considèrent parfois qu'il est possible de passer directement à l'étape 4 et qu'il n'est pas nécessaire de procéder à une validation complète : une simple vérification d'aptitude suffirait.

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 [2].

Étape 3: Validation de la méthode.

Comme l'indique très explicitement la figure 2, 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, validation interne et externe. La validation intra laboratoire ou interne. Elle est conduite dans un seul laboratoire. C'est surtout ce type de validation qui est traité dans ce travail.

Étape 4 : 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.

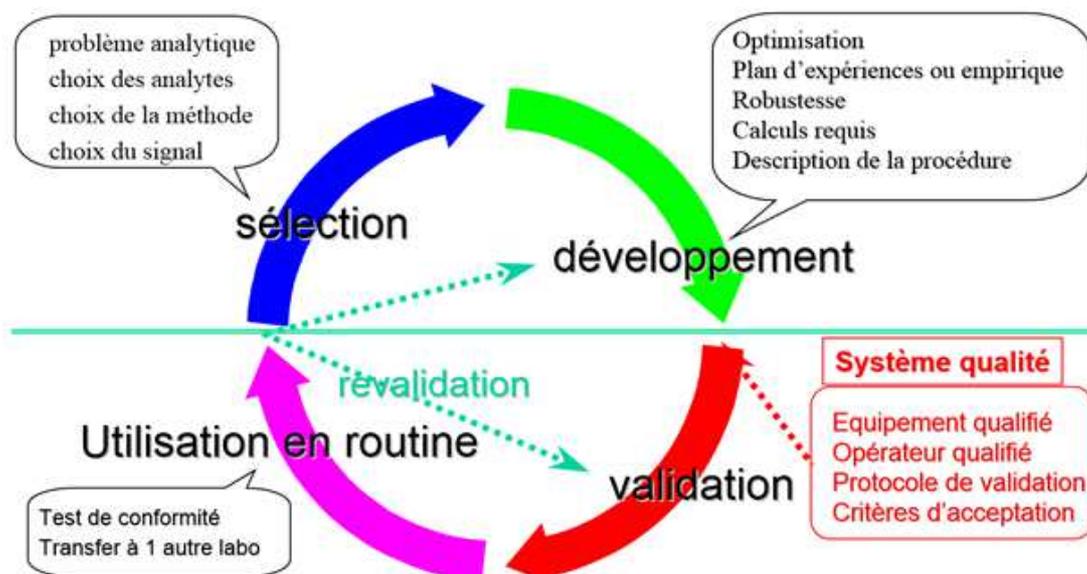


Figure 2 : Cycle de vie d'une méthode analytique [3].

I-Généralités sur la validation analytique:

1-Définition et principe :

La Validation d'une méthode est la procédure par laquelle on démontre, preuves expérimentales à l'appui, que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée [4]. Il faut donc démontrer que la méthode mise en œuvre par le laboratoire est apte à l'emploi prévu (besoin du client) [5].

La validation d'une méthode d'analyse entraîne la détermination de plusieurs paramètres : la limite de détection d'une méthode (LD), la limite de quantification d'une méthode (LQ), la limite de linéarité (LL), la fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire), la justesse, la sensibilité, et finalement, la récupération [6]. Les caractéristiques à déterminer diffèrent suivant que le dosage est quantitatif ou qualitatif.

La validation est donc fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables.

2- Aspect réglementaire :

Dans la littérature on trouve différents textes réglementaires, on cite à titre d'exemple :

- ☞ **Deux guidelines ICH (International Conference on Harmonization)** ont été dédiés à la validation analytique : Q2: «Analytical Validation»
 - Q2A: «Text on Validation of Analytical Procedures: Présente une discussion sur les caractéristiques qui doivent être prises en compte au cours de la validation des méthodes analytiques
 - Q2B: «Methodology» : 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.
- ☞ **SFSTP (Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques)** présentent les recommandations réglementaires communément admises et appliquées dans l'industrie pharmaceutique nationale et une démarche statistique pour la validation d'une procédure analytique.

3-Critères de validation :

La validation d'une méthode analytique consiste à vérifier certains critères, à savoir :

- Spécificité
- Sélectivité
- Linéarité
- Justesse

- Fidélité :
 - Répétabilité (intra-laboratoire)
 - Fidélité intermédiaire
 - Reproductibilité (inter-laboratoires)
- Exactitude
- Limite de détection
- Limite de quantification
- Intervalle de dosage
- Fonction de réponse

Les paramètres faisant partie de la validation d'une méthode analytique dépendent du type de cette méthode (ICH Q2) :

- Tests d'identification
- Test limite de recherche d'impureté
- Test quantitatif de teneur en impureté
- Test quantitatif de teneur en principe actif (PA)

Le tableau suivant renseigne les différentes caractéristiques à évaluer en fonction du type de procédure analytique à valider. Cette liste doit être considérée comme un guide et une base de référence.

Type de tests Caractéristiques	Dosage	Impuretés		Identification	Dosage bioanalyse
		Quantitatif	Essais limites		
Exactitude	✓	✓			✓
Fidélité répétabilité	✓	✓			✓
Fidélité fidélité intermédiaire	✓	✓		✓	✓
Spécificité Sélectivité	✓	✓	✓	✓	✓
Limite de détection		✓	✓		✓
Limite de quantification		✓			✓
Linéarité	✓	✓			Fonction de réponse
Intervalle de mesure	✓	✓			✓
Robustesse	✓	✓	✓		✓

Tableau 1 : Les critères à évaluer en fonction du type de procédure analytique à valider

a. Spécificité-sélectivité

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents. Cette caractéristique est étudiée en premier, en effet elle permet de vérifier que le signal mesuré correspond bien à l'analyte recherché.

La sélectivité peut se définir comme l'aptitude d'un élément de la méthode d'analyse (appareil de mesure, milieu de culture, etc...) à discerner un analyte donné dans un mélange complexe.

Selon ces définitions, il s'agit bien de démontrer que la ou les substance(s) analysée(s) au sein de la matrice est bien le ou les analyte(s) recherché(s). Or, en ce qui concerne les techniques chromatographiques, celles-ci sont plutôt sélectives que spécifiques. Le degré de sélectivité de la procédure de dosage dépend d'ailleurs de la qualité de la séparation chromatographique et de la sélectivité intrinsèque du mode de détection. Très souvent la spécificité/sélectivité se fonde sur une absence d'interférences [7].

En chimie analytique, la cause principale d'un manque de spécificité est la présence d'interférences. Les interférences sont une des grandes causes d'erreur de justesse. Lorsqu'il s'agit de la spécificité et des interférences, on a à faire avec des erreurs systématiques qui sont directement liées à la méthode. La littérature traite en abondance les divers mécanismes chimiques, physiques, physico-chimiques ou biologiques qui sont à la source d'interférences spécifiquement liées à un type de méthode.

Dans notre cas, on soupçonne l'existence d'interférences dues aux composés du plasma, par conséquent, on parle d'effets de matrice. Pratiquement, les interférences ont deux conséquences néfastes :

- soit, elles entraînent une surestimation de la concentration de l'échantillon, car la réponse est plus élevée que ce qu'elle devrait être ;
- soit, elles causent une sous-estimation de la concentration, car le signal est partiellement masqué.

Dans les deux cas, elles occasionnent donc un biais de justesse.

On peut proposer de représenter graphiquement l'effet du manque de spécificité en considérant la **droite de justesse**.

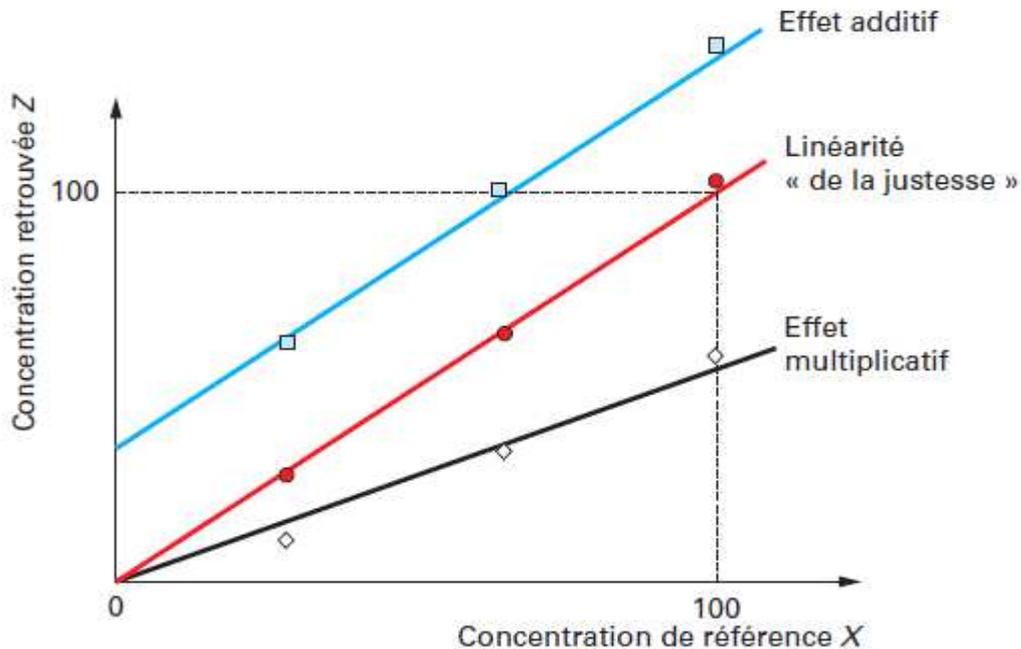


Figure 3 : La représentation graphique de la concentration introduite en fonction de la concentration retrouvée, visualisant l'effet de matrice sous ces différents aspects, additif et multiplicatif.

La figure 3 illustre cette droite de justesse selon trois situations hypothétiques :

- les cercles pleins produisent une droite confondue avec la première bissectrice ; la spécificité est parfaite ;
- les carrés illustrent un décalage systématique des concentrations retrouvées ; on parle **d'effet additif** ;
- les losanges illustrent une autre situation dans laquelle le biais est proportionnel à la concentration ; on parle **d'effet multiplicatif**.

En conservant nos notations, à savoir X la valeur de référence et Z la concentration retrouvée par étalonnage inverse, ces trois droites correspondent aux équations suivantes :

- absence d'effet : $Z = X$
- effet multiplicatif : $Z = b_1 X$
- effet additif : $Z = b_0 + X$

Mais, on peut aussi supposer qu'il existe des situations où ces effets se combinent :

- combinaison des effets : $Z = b_0 + b_1 X$

Ainsi, le coefficient b_1 peut être assimilé à l'inverse d'un taux de recouvrement moyen, tel que défini dans la littérature.

b. Linéarité

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance présente dans l'échantillon. [3]

c. Justesse :

La justesse représente l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et la valeur conventionnellement vraie de l'échantillon (la valeur de référence acceptée). La mesure de la justesse est exprimée en termes de biais, celui-ci représentant la différence entre la moyenne des résultats d'essais et la valeur de référence acceptée [1].

d. Fidélité :

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 mesures 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.

Les mesures quantitatives de la fidélité dépendent de façon critique des conditions stipulées. Peuvent ainsi être distinguées les conditions de :

- **répétabilité** : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps ;
- **fidélité intermédiaire** : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné ;

- **reproductibilité** : conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents.

e. Exactitude

L'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur acceptée comme conventionnellement vraie, ou comme valeur de référence, et la valeur trouvée (= **valeur moyenne obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois**) [3].

Cette notion est la combinaison d'une erreur systématique, liée à la justesse de la méthode, et d'une composante aléatoire, liée à la mesure elle-même et qui dépend donc de la fidélité de la méthode [1].

f. Limite de quantification

Elle correspond à la limite à partir de laquelle la méthode est suffisamment précise pour donner une estimation quantitative satisfaisante d'une concentration inconnue de la substance à doser.

g. Intervalle de dosage

L'intervalle de dosage d'une procédure d'analyse est la région entre les niveaux supérieurs et inférieurs (ces valeurs incluses) pour laquelle il a été démontré que la procédure est appropriée quant à son exactitude (justesse+fidélité) et sa linéarité, en utilisant la méthode décrite.

h. Fonction de réponse

La fonction de réponse traduit à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existant entre la réponse et la concentration en substance à examiner dans l'échantillon [3].

La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelé « courbe d'étalonnage ».

III- Méthodologie globale au moyen du profil d'exactitude :

La validation a pour but de démontrer que la procédure analytique correspond à l'usage pour lequel elle est prévue. La stratégie couramment utilisée pour la validation d'une procédure analytique est basée sur les critères d'acceptation qui considèrent de manière dissociée le biais et la variance. Cependant, dans l'étude présente, nous avons appliqué une nouvelle stratégie basée sur l'intervalle de tolérance d'espérance β de l'erreur totale d'une mesure (en anglais « β expectation tolerance intervals for the total error measurement »), erreur qui prend en compte la justesse (biais) et la fidélité intermédiaire (écart-type).

Cette stratégie donne la possibilité de contrôler le risque d'acceptation d'une méthode non adéquate et ce, au moyen des profils d'exactitude. Un autre avantage présenté par cette stratégie est de fournir la garantie que les résultats des mesures qui seront obtenus lors de l'application future de la méthode validée seront inclus dans les limites d'acceptation fixées à priori selon les exigences définies.

En conséquence, le profil d'exactitude peut être considéré comme un outil de décision très utile pour accepter ou rejeter une méthode selon son usage prévu. De plus, le profil d'exactitude peut être utilisé pour sélectionner le modèle de régression le plus approprié pour la calibration, pour déterminer les limites de quantification supérieure et inférieure, et subséquemment pour sélectionner l'intervalle de concentration pour le dosage.

1-Principe :

La validation au moyen du profil d'exactitude est la combinaison, sous la forme d'un graphique, de plusieurs intervalles de tolérance (β -IT) calculés à partir de mesures réalisées sur des échantillons à différents niveaux de concentration et d'un intervalle d'acceptabilité.

Cette méthodologie s'appuie sur deux concepts complémentaires:

- ↻ la limite d'acceptabilité (λ) qui sert à chiffrer les objectifs de la méthode. C'est le seuil de performance globale fixé par l'utilisateur du résultat. La plupart du temps, elle s'exprime comme un pourcentage autour de la valeur de référence, par exemple $\pm 15\%$.
- ↻ l'intervalle de tolérance (β -IT) qui délimite un intervalle dans lequel se trouvera une proportion moyenne β % de futures mesures.

Les 10 étapes pour valider une méthode avec le profil d'exactitude :

1. Disposer du mode opératoire et définir le mesurande ;
2. Définir le domaine de validation (gamme de concentrations) et l'objectif attendu de la méthode sous la forme d'un intervalle d'acceptabilité ;
3. Sélectionner des échantillons de validation dont les valeurs de référence sont connues ;
4. Choisir un plan d'expérience de validation ;
5. Pour les méthodes indirectes, choisir du plan d'expérience d'étalonnage ;

6. Collecter les données ;
7. Pour les méthodes indirectes, calculer les concentrations retrouvées par étalonnage inverse;
8. Calculer les critères de validation à partir des concentrations retrouvées : principalement les écarts-types de fidélité de fidélité intermédiaire et des biais de justesse ;
9. Calculer les intervalles de tolérance et construire le profil d'exactitude ;
10. Interpréter les résultats et décider si la méthode est valide ou non.

L'objectif de la méthodologie globale est de **fournir des garanties** que chaque résultat qui sera obtenu en routine sera **suffisamment proche** de la valeur vraie de l'échantillon traité.

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

– « suffisamment proche » signifie que le résultat fourni en routine sera à une distance raisonnable (ou exigée par le client) de la valeur vraie ;

Si l'on appelle Z le résultat fourni en routine et X la valeur vraie de l'échantillon, la notion de « suffisamment proche » peut s'écrire sous la forme suivante :

$$\boxed{-\lambda < Z - X < +\lambda} \quad \text{ou} \quad \boxed{|Z - X| < \lambda}$$

Les quantités $-\lambda$ et $+\lambda$ représentent ces « distances raisonnables » maximales qu'un client est prêt à accepter. Elles forment ce que nous appelons l'intervalle d'acceptabilité. Elle peut aussi s'écrire sous la forme d'un écart relatif :

$$\boxed{\frac{|Z - X|}{X} < \lambda \%}$$

– « fournir des garanties » signifie qu'il faut calculer la probabilité de produire des résultats situés à cette distance raisonnable.

Quant à l'idée de « fournir une garantie », elle peut s'écrire sous la forme d'une probabilité supérieure ou égale à une proportion β :

$$\boxed{\text{Prob} (|Z - X| < \lambda) \geq \beta}$$

Le risque associé d'une procédure s'évalue par la proportion attendue de mesures en dehors des limites d'acceptation. Le risque associé dépend des estimés du biais et de la précision de la procédure analytique obtenus en phase de validation comme le montre la figure 4.

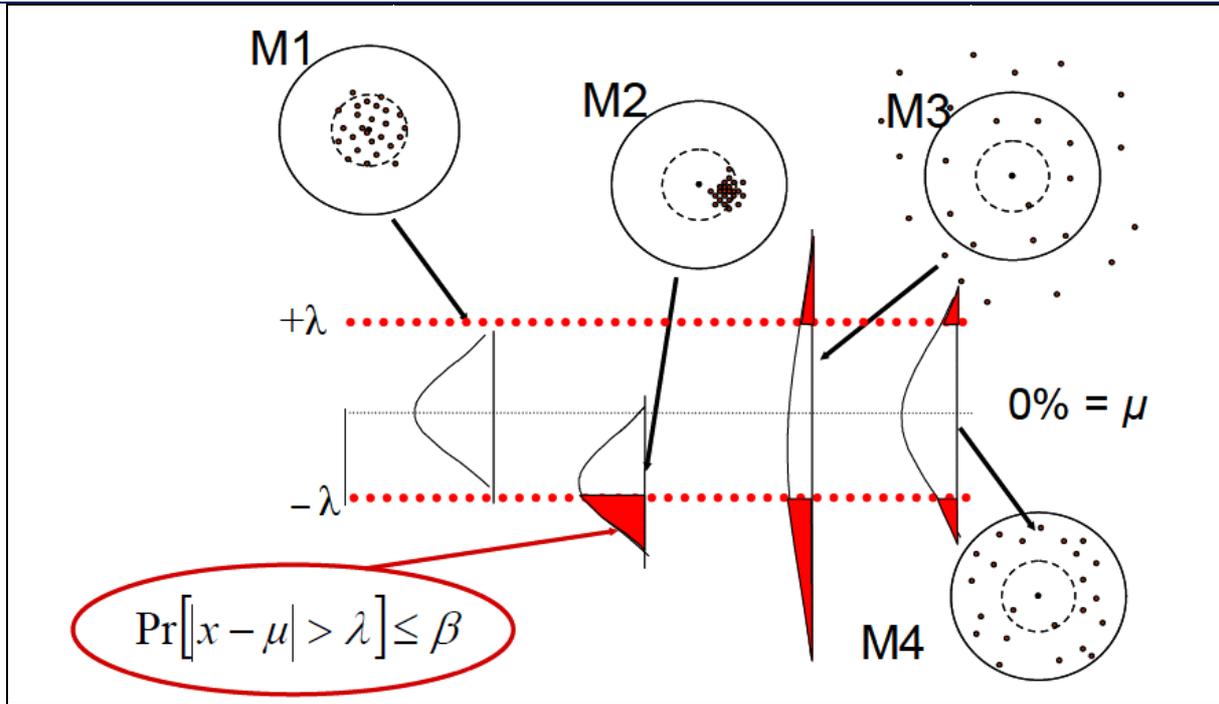


Figure 4 : Profil d'exactitude comme outil de décision pour quatre méthodes M1 (fidèle et juste), M2 (fidèle mais non juste), M3 (non fidèle et non juste) et M4 (non fidèle mais juste)

Ainsi, le profil d'exactitude est un outil de décision basée sur le risque associé à la méthode. La notion de risque est liée à la garantie concernant la future analyse des échantillons inconnus tout en appliquant la méthode validée. Par conséquent, le profil d'exactitude peut servir à accepter ou rejeter une méthode analytique suivant l'usage attendu.

Une autre notion relative à cette nouvelle stratégie de validation importante dans le cadre de notre travail est sa possibilité d'estimer l'incertitude de mesure sur la base des données de validation [1].

2-Analyse de la fonction de réponse et sélection du modèle de régression approprié

Cette étape constitue l'une des plus importantes du fait que la fiabilité des résultats de validation qui seront obtenus dépend du modèle de régression sélectionné.

Une fois les expériences réalisées et les données collectées, il convient tout d'abord de déterminer, sur la base des standards d'étalonnage (SE), la relation entre la réponse (signal ou réponse de l'instrument) Y et la quantité (concentration) X. Cette relation se caractérise à l'aide d'une fonction f qui doit être strictement monotone (strictement croissante ou décroissante) sur l'intervalle de dosage envisagé:

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

où $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$ est l'erreur associée à la fonction de réponse f appelée communément erreur résiduelle.

Il faut donc ajuster la fonction de réponse, c'est à-dire évaluer les paramètres du modèle, de manière à ce que l'erreur résiduelle soit minimisée.

Différentes fonctions de réponse peuvent être sélectionnées lors de la validation de la méthode, dont on peut citer quelques exemples comme illustré au tableau ci-dessous :

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

Tableau 2 : Exemples de fonctions de réponse.

3-Calcul de la justesse et de la fidélité

3-1-Modèle :

L'estimation de la justesse et de la fidélité de la méthode s'effectue avec les concentrations calculées provenant des standards de validation en phase de validation. Cette estimation est réalisée à chacun des j niveaux de concentration considérés à l'aide du modèle statistique suivant :

$$X_{ijk} = \mu_j + \alpha_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (\text{Eq. 2})$$

Avec

i : indice de série,

j : indice de niveau,

k : indice de répétition

X_{ijk} est la k-ième concentration calculée du niveau j de la i-ème série,

μ_j est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration j,

α_{ij} est au niveau j l'écart entre la moyenne de la i-ème série et la moyenne μ_j ; α_{ij} est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma^2_{B,j}$,

ε_{ijk} est l'erreur expérimentale, considérée comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma^2_{w,j}$.

Les variances $\sigma^2_{B,j}$ et $\sigma^2_{w,j}$ représentent les variances inter-séries et intra-séries, respectivement.

A fin de les estimer, une analyse de variance (One-way balanced ANOVA) à chaque niveau de concentration est réalisée. Ainsi les carrés moyens (CM) suivants $CM_{\text{inter-série}}$ et $CM_{\text{intra-série}}$ sont calculés par les formules suivantes:

$$\hat{\mu}_j = \frac{1}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^{n_{ij}} x_{ijk,calc} \quad (\text{Eq.3})$$

$$CM_{\text{inter-série},j} = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p n_{ij} (\bar{x}_{ij,\text{calc}} - \bar{x}_{j,\text{calc}})^2 \quad (\text{Eq.4})$$

$$CM_{\text{intra-série},j} = \frac{1}{\sum_{i=1}^p n_{ij} - p} \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^{n_{ij}} (x_{ijk,\text{calc}} - \bar{x}_{ij,\text{calc}})^2 \quad (\text{Eq.5})$$

Si $CM_{\text{intra-série},j} < CM_{\text{inter-série},j}$ alors :

$$\hat{\sigma}_{W,j}^2 = CM_{\text{intra-série},j} \quad (\text{Eq.6})$$

$$\hat{\sigma}_{B,j}^2 = \frac{CM_{\text{inter-série},j} - CM_{\text{intra-série},j}}{n} \quad (\text{Eq.7})$$

Sinon :

$$\hat{\sigma}_{W,j}^2 = \frac{1}{pn-1} \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^k (x_{ijk,\text{calc}} - \bar{x}_{j,\text{calc}})^2 \quad (\text{Eq.8})$$

$$\hat{\sigma}_{B,j}^2 = 0 \quad (\text{Eq.9})$$

3-2-Calcul de la justesse :

La justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique. Elle peut s'exprimer de différentes façons. Les trois paramètres présentés ici, mesurent en réalité des défauts de justesse :

– **biais absolu** : $B = Z - X$ (avec X la valeur de référence d'un échantillon et Z la moyenne de mesurages répétés sur ce même échantillon)

– **taux de recouvrement ou de récupération** :

$$R\% = \frac{Z}{X} * 100 \quad (\text{Eq. 10})$$

– **biais relatif** :

$$B\% = \frac{(Z-X)}{X} * 100 \quad (\text{Eq. 11})$$

3-3-Calcul de la fidélité

La fidélité fournit une indication sur les erreurs dues au hasard. Elle peut être estimée en calculant la répétabilité et la fidélité intermédiaire à chaque niveau de concentration utilisé en validation.

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité tandis que la somme des estimations des variances intra- et inter-série donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire :

$$\begin{aligned} \text{Répétabilité :} \quad & \hat{\sigma}_{R,j}^2 = \hat{\sigma}_{W,j}^2 \\ \text{Et} \quad & \text{CV}_R = \frac{\hat{\sigma}_R}{\hat{z}_j} * 100 \end{aligned} \quad (\text{Eq. 12})$$

$$\begin{aligned} \text{Fidélité intermédiaire:} \quad & \hat{\sigma}_{FI,j}^2 = \hat{\sigma}_{W,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2 \\ \text{Et} \quad & \text{CV}_{FI} = \frac{\hat{\sigma}_{FI}}{\hat{z}_j} * 100 \end{aligned} \quad (\text{Eq. 13})$$

4-Calcul des intervalles de tolérance :

Ce qui nous importe cependant en validation, ce n'est pas la validité des résultats obtenus que nous obtenions avec l'Erreur Totale, mais plutôt la garantie ou une représentation de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultats dans le futur, C'est le rôle de l'intervalle de Tolérance.

L'estimation des paramètres $\hat{\mu}_j$, $\hat{\sigma}_{B,j}^2$ et $\hat{\sigma}_{W,j}^2$ à chaque niveau de concentration j a pour but de permettre d'estimer la proportion attendue d'observation dans les limites d'acceptation prédéfinies $[-\lambda, \lambda]$, c'est-à-dire :

$$E_{\hat{\mu}, \hat{\sigma}} \left\{ P \left[|X - \mu_T| < \lambda \mid \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M \right] \geq \beta \right\}$$

Cependant il n'existe pas de solution exacte pour estimer cette proportion attendue. La solution déjà proposée par plusieurs auteurs [13, 14] est de calculer l'intervalle de Tolérance (β -Expectation Tolerance Interval) tel que proposé par Mee [15]:

$$\hat{\mu}_j - Q_t \left(v; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} \hat{\sigma}_{FI,j}; \hat{\mu}_j + Q_t \left(v; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} \hat{\sigma}_{FI,j} \quad (\text{Eq. 14})$$

Où k est choisi afin que la proportion attendue des résultats futurs tombant dans les limites de l'intervalle soit égale à β .

Si cet intervalle de tolérance est totalement inclus dans les limites $[-\lambda, +\lambda]$, c'est-à-dire si

$$\hat{\mu}_M - k\hat{\sigma}_M > -\lambda \text{ et } \hat{\mu}_M + k\hat{\sigma}_M > +\lambda$$

Alors la proportion attendue de résultats dans les limites d'acceptation sera supérieure à β .

L'estimation des paramètres de justesse et fidélité $\hat{\mu}_j$, $\hat{\sigma}_{B,j}$ et $\hat{\sigma}_{W,j}$, et à chaque niveau de concentration j , n'est pas une fin en soi, mais une étape indispensable pour calculer la proportion attendue de résultats qui se situent dans les limites d'acceptation.

L'intervalle de tolérance sera calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation. Pratiquement, l'intervalle de tolérance se calcule comme suit [15, 14] en valeur absolue:

$$E_{\hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M} \left\{ P_X \left[\hat{\mu}_M - k \hat{\sigma}_M < X < \hat{\mu}_M + k \hat{\sigma}_M \mid \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M \right] \right\} = \beta \quad (\text{Eq. 15})$$

Où

$$\hat{\sigma}_{FIj}^2 = \hat{\sigma}_{Wj}^2 + \hat{\sigma}_{Bj}^2$$

$$R_j = \frac{\hat{\sigma}_{Bj}^2}{\hat{\sigma}_{Wj}^2} ; B_j = \sqrt{\frac{R_j + 1}{nR_j + 1}}$$

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

$Q_t \left(v; \frac{1+\beta}{2} \right)$ est le quantile β de la distribution t de Student à v degrés de liberté.

Le même intervalle que Eq. 14 en échelle relative devient :

$$\left[\text{biais} (\%) - Q_t \left(v; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{FI,j} ; \text{biais} (\%) + Q_t \left(v; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{FI,j} \right] \quad (\text{Eq. 16})$$

Deux termes sont contenus dans l'intervalle de tolérance : l'un étant la justesse et l'autre étant, à un facteur près, le coefficient de variation de fidélité intermédiaire. C'est la raison pour laquelle cet intervalle peut ainsi être considéré comme une expression de l'exactitude des résultats. Mais l'intervalle de tolérance intègre une dimension supplémentaire, celle de chance (ou risque) pour des résultats futurs, conditionnellement à des résultats passés.

La méthode peut dès lors être considérée comme exacte au niveau de chance β pour le niveau de concentration en question, si l'intervalle de tolérance est incluse dans les limites $[-\lambda, \lambda]$ définies a priori en fonction des objectifs de la méthode.

5-Profil d'exactitude et décision

5-1-Calcul

Selon l'équation Eq. 14 les bornes de ces intervalles sont :

$$L_j = \text{biais} (\%) - Q_t \left(v; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{F.L.j}$$

$$U_j = \text{biais} (\%) + Q_t \left(v; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{F.L.j}$$

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes L_j entre elles ($L_1 \rightarrow L_2 \rightarrow \dots \rightarrow L_m$) et d'autre part les bornes U_j entre elles ($U_1 \rightarrow U_2 \rightarrow \dots \rightarrow U_m$).

5-2-choix de la fonction de réponse :

La bonne fonction de réponse doit permettre à la procédure analytique d'atteindre ses objectifs, autrement dit pour chaque niveau de concentration, les limites de tolérance ne doivent pas sortir des limites d'acceptations retenues au préalable.

En outre, il est nécessaire que le coefficient de détermination R^2 doit être toujours supérieur à 0,99 mais ce coefficient n'est pas en rapport avec la qualité des résultats

Seulement, le profil d'exactitude, qui est le reflet direct de ce que la procédure analytique est capable, permet de juger l'adéquation de différentes pratiques et permet de prendre des décisions.

6-Calcul de la limite de quantification :

Elle est calculée par simple interpolation linéaire entre les points où l'intervalle de tolérance coupe la limite d'acceptabilité. La Figure 5 sert à illustrer ce calcul.

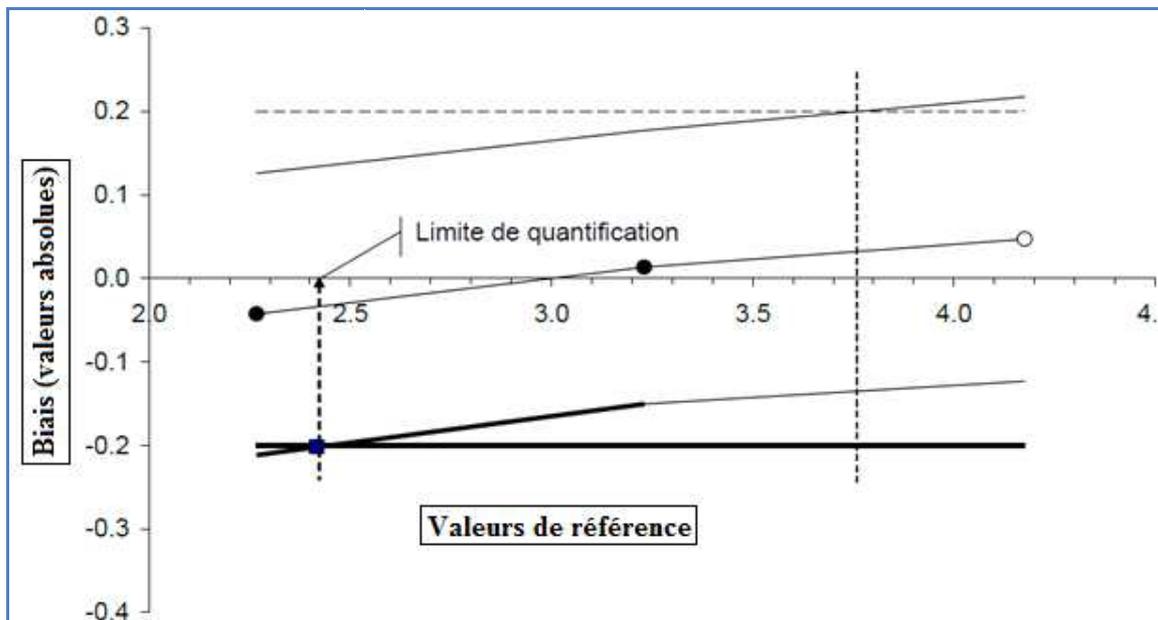


Figure 5 : Calcul de la limite de quantification par interpolation

La LQ peut être obtenue en calculant l'abscisse du point d'intersection de la droite de la limite d'acceptation et de la droite de l'intervalle de tolérance.

Z les valeurs absolues lues sur l'axe des ordonnées;

X les valeurs de référence fournies par l'axe des abscisses;

x_A et x_B les abscisses des deux niveaux A et B;

x_{At} et x_{Bt} les ordonnées de la limite supérieure (ou inférieure) de l'intervalle de tolérance;

x_{Aa} et x_{Ba} les ordonnées de la limite supérieure (ou inférieure) d'acceptabilité;

Les équations de deux droites (intervalle de tolérance et limite d'acceptabilité) sont respectivement:

$$Z = t_0 + t_1 X \quad (\text{Eq. 17})$$

$$Z = a_0 + a_1 X \quad (\text{Eq. 18})$$

L'égalité entre les deux droites permet de calculer la LQ.

$$t_0 + t_1 X = a_0 + a_1 X \quad (\text{Eq. 19})$$

$$X(t_1 - a_1) = a_0 - t_0 \quad (\text{Eq. 20})$$

La limite de quantification s'exprime comme suit :

$$x_{LQ} = \frac{a_0 - t_0}{t_1 - a_1} \quad (\text{Eq. 21})$$

7-Construction graphique et interprétation :

Le mode de représentation est le plus lisible et le plus facile à interpréter est celui qui consiste à exprimer tous les résultats en valeurs relatives, ramenées à la valeur de référence du niveau. Les limites d'acceptabilité sont aussi exprimées de façon relative et se situent entre 90 et 110 %.

Sur l'axe des abscisses, on représente la concentration théorique des niveaux ; tandis que sur l'axe des ordonnées on représente simultanément :

- les limites des intervalles de tolérance d'espérance β calculés sur les concentrations retrouvées et exprimées en pourcentage sous la forme d'un taux de recouvrement ou d'une exactitude relative ;
- les intervalles d'acceptabilité, définis en fonction de l'objectif de la méthode, exprimés de la même façon que les intervalles de tolérance.

Les limites d'acceptabilité et la proportion β qui sert à calculer les intervalles de tolérance dépendent strictement du contexte d'utilisation de la méthode.

Sur la figure 6, dans le domaine de validité, délimité par les traits verticaux discontinus, la méthode est capable de produire une proportion moyenne attendue de résultats égale à β comprise entre les limites d'acceptabilité : la méthode est dite valide dans ce domaine. Le domaine d'application représente le domaine initialement choisi pour conduire la validation.

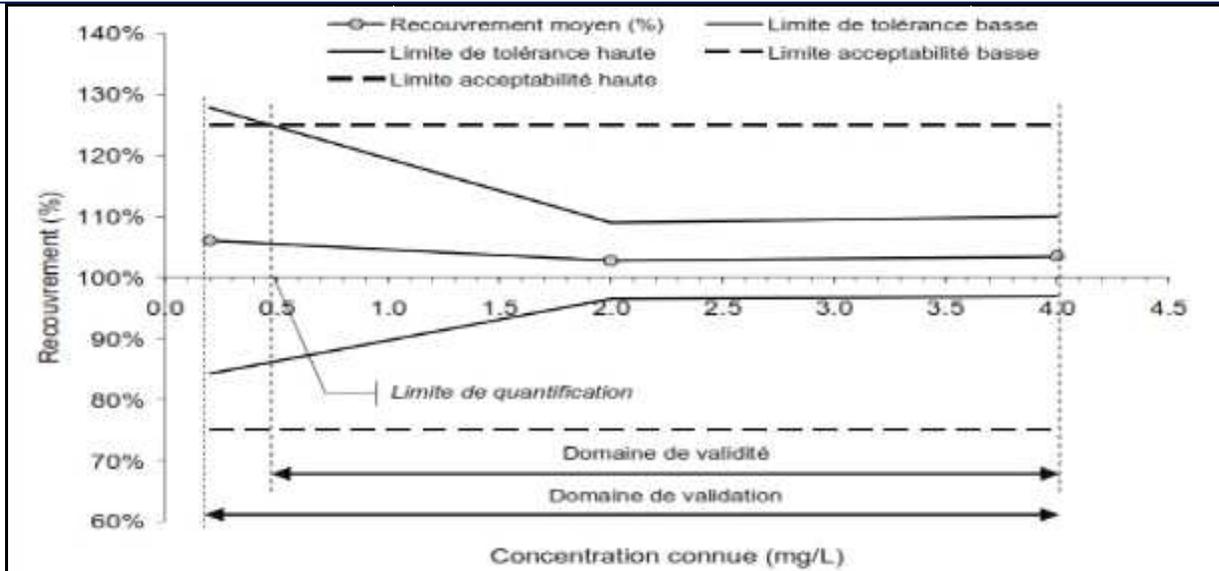


Figure 6 : Exemple de profil d'exactitude construit avec 3 niveaux de concentration (0,4 ; 2 et 4 mg/L) qui délimitent le domaine de validation (ou d'application) de la méthode à valider.

8-Estimation de l'incertitude de mesure :

L'expression de l'incertitude-type composée de Z est à peu près égale à :

$$u_c(Z) \approx \sqrt{u^2(\delta) + S_B^2 + S_r^2} \quad (\text{Eq. 22})$$

Dans lequel Z est le résultat observé et δ est une expression du manque de fidélité de la méthode (biais). L'intérêt de cette formulation est de retrouver un certain nombre de résultats déjà présentés précédemment. Par exemple, la variance de fidélité intermédiaire est égale à :

$$S_{FI}^2 = S_B^2 + S_r^2 \quad (\text{Eq. 23})$$

Où S_B^2 représente la variance de l'effet série et S_r^2 la variance de répétabilité. Par ailleurs, on montre facilement que la variance de δ est égale à la variance de la moyenne générale et on trouve :

$$u^2(\delta) = S_{FI}^2 \left(\frac{1}{np * B^2} \right) \quad (\text{Eq. 24})$$

Avec p est le nombre de séries, n est le nombre de répétitions.

Si on additionne ces deux variances, comme la loi de propagation des incertitudes le propose, on trouve que l'incertitude composée de Z est égale à :

$$u_c(Z) \approx \sqrt{S_{FI}^2 + S_{FI}^2 \left(\frac{1}{np * B^2} \right)} = S_{FI} \sqrt{1 + \frac{1}{np * B^2}} = S_{IT} \quad (\text{Eq. 25})$$

Donc l'incertitude-type composée de Z est proche de l'écart-type de l'intervalle de tolérance (S_{IT}). Une grande partie de l'incertitude peut donc être estimée directement à partir des calculs effectués lors de la construction du profil d'exactitude pour les différents niveaux de concentration retenus dans le plan de validation. D'un point de vue pratique, on utilise l'incertitude élargie à 95%, notée $U(Z) = 2 S_{IT}$.

IV-La bupivacaine :

1-Propriétés physico-chimiques :

La bupivacaine est un anesthésique local de la famille des amino-amides (voir figure 7) le plus puissant actuellement employé du fait de sa longue durée d'action, commercialisé sous le nom de Marcaïne[®]. Sa forme pharmaceutique est une solution injectable. Ses principales propriétés physico-chimiques sont [17] :

- Nom chimique : n-butyl-1 diméthyl-2',6'pipéridincarboxanilide-2
- Formule brute : C₁₈H₂₈N₂O
- C'est une poudre blanche inodore ayant une saveur amère.
- Elle est soluble dans l'eau et l'alcool
- Elle est légèrement soluble dans l'éther, dans l'acétone ou dans le chloroforme.
- Son pka=8,1

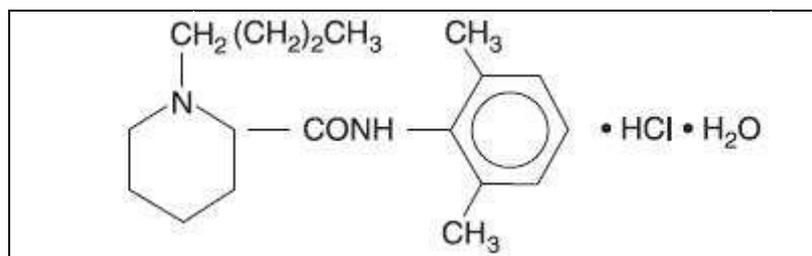


Figure 7: Structure chimique de la Bupivacaine.[16]

2-Propriétés pharmacologiques :

2-1-Propriétés pharmacodynamiques :

La bupivacaine fait partie du groupe des anesthésiques à liaison amide.

L'activité anesthésique de la bupivacaine se caractérise par [18]:

- Un délai lent de l'installation de l'anesthésie,
- Une longue durée d'action (allongée lors de l'utilisation de la forme adrénalinée),
- L'obtention d'un bloc sensitif presque exclusif avec la concentration à 2,5 mg/ml ou associé à un bloc moteur plus ou moins important avec la concentration à 5 mg/ml/flacon/patient
- Les premiers signes de toxicité neurologique et cardiaque interviennent à 1,6 µg/ml, dès 4µg/ml le patient convulse.

2-2-Propriétés pharmacocinétiques :

En pharmacologie, la pharmacocinétique est caractérisée par quatre étapes :

- Absorption : L'absorption et la diffusion de la bupivacaine dépendent de très nombreux paramètres: type d'injection, profil du patient, concentration, dose totale injectée,

- Distribution : Fixation aux protéines plasmatiques (préférentiellement les alpha 1 glucoprotéines) très élevée: de l'ordre de 95 pour cent aux doses utilisées en thérapeutique.
- Métabolisme : Métabolisme hépatique par système monooxygénasique cytochrome P-450
- Elimination : Elimination rénale, principalement sous forme de métabolites .La demi-vie apparente d'élimination est de 3 h 30.

3-Données cliniques :

3.1. Indications thérapeutiques

- Anesthésie loco-régionale lors d'intervention chirurgicale: anesthésie tronculaire, plexique, caudale, péridurale.
- Analgésie péridurale:
 - En obstétrique;
 - Dans le traitement de la douleur au cours d'algies diverses: néoplasiques, postopératoires, post-traumatiques, artéritiques;
 - Dans la préparation à certains gestes thérapeutiques douloureux (kinésithérapie post-opératoire, post-traumatique).

3.2. Posologie et mode d'administration

La bupivacaine devra être uniquement utilisée par ou sous la responsabilité de médecins expérimentés dans les techniques d'anesthésie loco-régionale.

Le chlorhydrate de bupivacaine existe sous forme adrénalinée ou non, aux concentrations de 2,5 mg/ml et 5 mg/ml et dans différentes présentations.

La forme, la concentration et la présentation utilisées varient en fonction de l'indication et du but recherché (anesthésie chirurgicale ou analgésie pure), de l'âge et de l'état pathologique du patient.

L'emploi des formes adrénalinées allonge la durée d'action. Les formes les plus concentrées procurent un bloc moteur plus constant et plus intense.

3.3. Contre-indications

- Voie intraveineuse, y compris l'anesthésie locale intraveineuse.
- Hypersensibilité connue aux anesthésiques locaux à liaison amide.
- Patients sous anticoagulants.
- Porphyries.
- Troubles de la conduction auriculo-ventriculaire nécessitant un entraînement électrosystolique permanent non encore réalisé.
- Epilepsie non contrôlée par un traitement.

3-4-Effets indésirables :

La bupivacaïne comme tous les anesthésiques locaux agit en bloquant la conduction nerveuse au niveau du canal sodique. Ses effets aduerses, très rares mais graves, se rencontrent en cas de passage intravasculaire accidentel. Ils sont dominés par une très forte toxicité cardiaque (troubles du rythme graves, arrêt cardiaques) et une forte toxicité neurologique. Une technique rigoureuse d'injection permet d'éviter la survenue de tels accidents. L'allergie à la bupivacaïne est exceptionnelle.

I-Méthode de dosage du bupivacaïne :

1-Réactifs :

- Solution de la bupivacaïne pure (Bupivacaïne hydrochloride $C_{18}H_{28}N_2O$, HCl Analytical Standard, for drug analysis, Fluka Analytical, Product of Italy)
- Tampon dihydrogénophosphate de potassium, 0.01 M, pH=4 qualité analytique
- Héxane mélangé à 5% isopropylalcool qualité analytique (n-Hexan CHROMASOLV C_8H_{14} , iso-propyl alcohol for HPLC Propan-2-ol C_3H_8O , Germany)
- Acétonitrile qualité grade HPLC (pureté $\geq 99,9\%$, Germany)
- Eau purifiée

2- Conditions chromatographiques :

- La quantité de bupivacaine est déterminée dans chaque échantillon par l'appareil HPLC qui est constitué de plusieurs éléments comme est montré dans la figure 7



Figure 8 : Image de l'appareil HPLC Shimadzu.

- 1 : Réservoir des solvants de la phase mobile
- 2 : Dégazeur DGU-20A5
- 3 et 6 : Pompes quaternaire LC-20AD
- 4 : Injecteur automatique SIL-20AC
- 7 : Chambre de la colonne CTO-20AC
- 5 : Détecteur UV-Visible SPD-M20A

- 8 : Enregistreur

Les chromatogrammes sont enregistrés et les calculs des aires effectués à l'aide d'un intégrateur D-2500. Tous ces matériels sont commercialisés par la Société SCOMEDICA.

L'acquisition et l'intégration des résultats ont été réalisées à l'aide du logiciel LCSOLUTION.

- La séparation chromatographique est réalisée par l'intermédiaire d'une pré-colonne «SYMMETRY C18 » et d'une colonne « ProteCol C8 HQ 250mm×4.6 mm ID 5 µm 120Å » ;
- La phase mobile est un mélange de dihydrogénophosphate de potassium (0,01 M, pH=4) et acétonitrile (65v :35v) ;
- La bupivacaïne absorbe dans le spectre UV et la détection se fait à une longueur d'onde de 210 nm ;
- La température de la chambre de la colonne est de 25°C ;
- Le débit d'élution est de 0,7 ml/min maintenu par une pression de 154 bars ;
- Le volume injecté est de 50 µl de chaque extrait plasmatique ;

3-Solutions étalons:

- Une solution d'étalon de bupivacaïne est préparée par dissolution du médicament dans l'eau purifiée (1mg/ml) puis cette solution est diluée pour avoir un standard de concentration 15 µg/ml à partir de la quelle on effectue la gamme de linéarité.
- La solution a ensuite été diluée successivement avec de l'eau purifiée pour préparer des solutions étalons de travail dans la plage de concentration de 0,01 à 2,5 µg /ml pour l'analyte. Toutes les solutions ont été stockées à 4°C et ont été amenés à température ambiante avant utilisation.

4-Méthode :

- Les prélèvements veineux sont recueillis sur tubes EDTA et centrifugés.
- Après centrifugation et séparation, 0,5 ml de plasma est transféré dans un tube conique de 15ml de matière plastique.
- Ajouter 3ml d'Hexane (contenant 5% Isopropyl-alcool)
- Vortexer pendant 2 min (agitateur IKA vortex genius 3)
- Après centrifugation à 3500 rpm pendant 10 min (Centrifugeuse UNIVERSAL 320 Hettich ZENTRIFUGEN), la couche organique supérieure est transférée quantitativement dans un tube en verre de 10 ml et évaporée en utilisant un évaporateur à 50 ° C sous courant d'azote

- Le résidu a été reconstitué dans 100 μl de la phase mobile, puis mélanger au vortex.

II-Etude préliminaire et détermination du domaine d'application de la méthode

1-Domaine de linéarité :

En ce qui concerne le signal analytique, l'erreur la plus répandue lorsqu'on cherche à le convertir en un résultat d'analyse, consiste à croire a priori qu'on se trouve dans le domaine de linéarité de la méthode alors qu'on en est sorti.

Il s'agit donc en premier lieu d'avoir parfaitement déterminé le domaine de linéarité de la méthode pour l'analyte considéré.

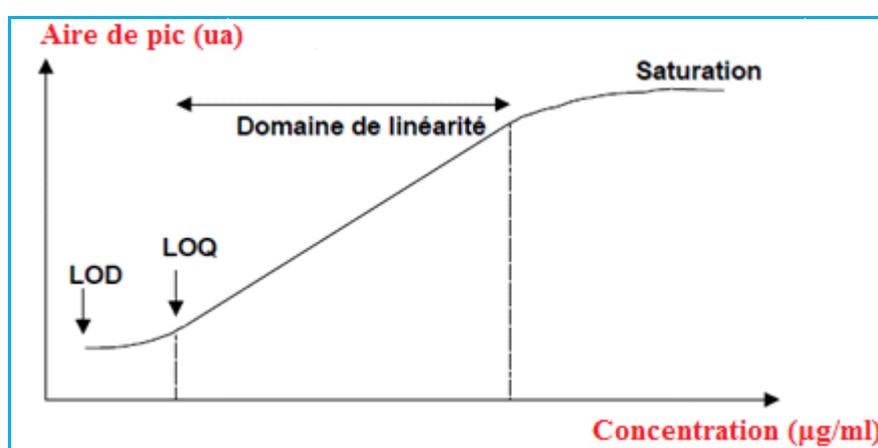


Figure 9 : Domaine de linéarité

L'étude du domaine de linéarité, est évaluée généralement par la qualité de la régression. Elle permet de définir les limites haute et basse de la relation linéaire existant entre la concentration de l'analyse observée et la dilution effectuée.

Elle a été réalisée par dilution d'une solution mère de 1mg/ml dans la phase mobile, dont la concentration a été ajustée afin de couvrir la gamme d'étalonnage (0,01—2,5 $\mu\text{g/ml}$). Chaque dilution a été analysée en triple et on a calculé la moyenne.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	0,01	0,05	0,1	0,2	0,5	1	1,5	2	2,5
Sérum (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Héxane+5%isopropyl alcool (ml)	3	3	3	3	3	3	3	3	3
[Bupivacaine] à 15 $\mu\text{g/ml}$ en (μl)	3	15	30	60	150	300	450	600	750
Phase mobile (μl)	997	985	970	940	850	700	550	400	250
Volume total (ml)	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5

Tableau 3 : Gamme d'étalonnage

La détermination de l'intervalle de linéarité dépend de la qualité de la régression statistique, et évalué à partir du coefficient de détermination R^2 qui représente le pouvoir explicatif du modèle de régression retenu. Le tableau suivant représente les résultats obtenus :

N° Solution	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Réponse (ua)
1	0,01	926
2	0,05	6211
3	0,1	247567
4	0,2	503221
5	0,5	1454529
6	1	3122345
7	1,5	4678873
8	2	7238742
9	2,5	15272645

Tableau 4 : Résultats obtenus à partir de la gamme d'étalonnage

Le graphique suivant rapporte les valeurs trouvées expérimentalement :

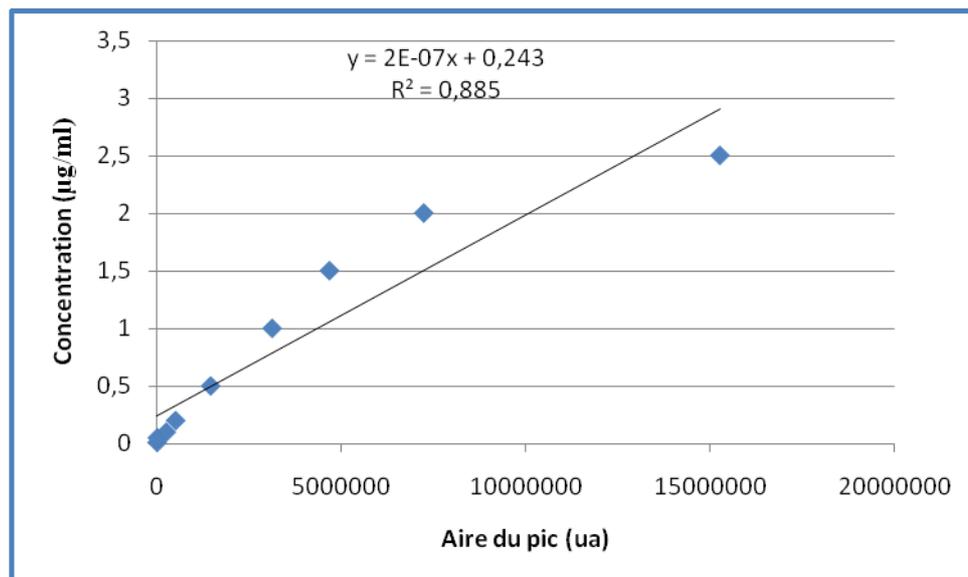


Figure 10 : Courbe de linéarité d'une gamme s'étendant entre 0,01 et 2,5 $\mu\text{g/ml}$

En prenant les aires entre 0,01 et 2,5 $\mu\text{g/ml}$, nous obtenons un domaine de linéarité avec un coefficient de détermination R^2 égale à 0,885. Pour obtenir une meilleure sensibilité et un meilleur coefficient R^2 , nous avons écarté le dernier point, et nous avons obtenu une linéarité meilleure que la première, avec un coefficient de détermination $R^2=0,991$, comme il a été montré sur la courbe suivante :

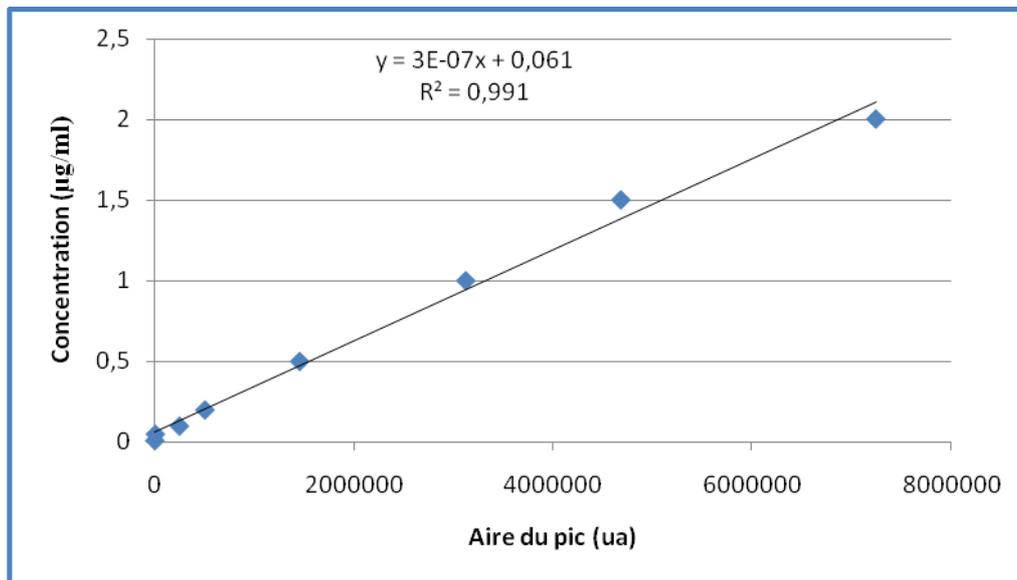


Figure 11 : Courbe de linéarité d'une gamme s'étendant entre 0,01 et 2 $\mu\text{g/ml}$

Un coefficient de détermination à 99%, satisfait largement nos attentes, vu que le seuil de toxicité est de 1,6 $\mu\text{g/ml}$, ces données nous poussent à écarter les intervalles les plus larges, et de choisir l'intervalle de concentration s'étalant entre 0,01 et 2 $\mu\text{g/ml}$.

2-Sélectivité :

C'est l'aptitude d'une méthode à quantifier un analyte sans équivoque et à le séparer des produits de dégradation, des métabolites et des composés co-administrés. Pratiquement, ce critère est fondé sur une démonstration, dans un blanc matrice (plasma, urine), de l'absence de réponse au temps de rétention de l'analyte par comparaison avec une solution pure de l'analyte. Ainsi, on a analysé une phase mobile seule (figure 12), un plasma (figure 13), et un plasma contenant de la bupivacaïne (figure 14). Le premier pic ($T_r \approx 4\text{min}$) correspond aux éléments non spécifiques à la colonne. Le pic de notre molécule apparaît isolé à $T_r = 12,582\text{ min}$.

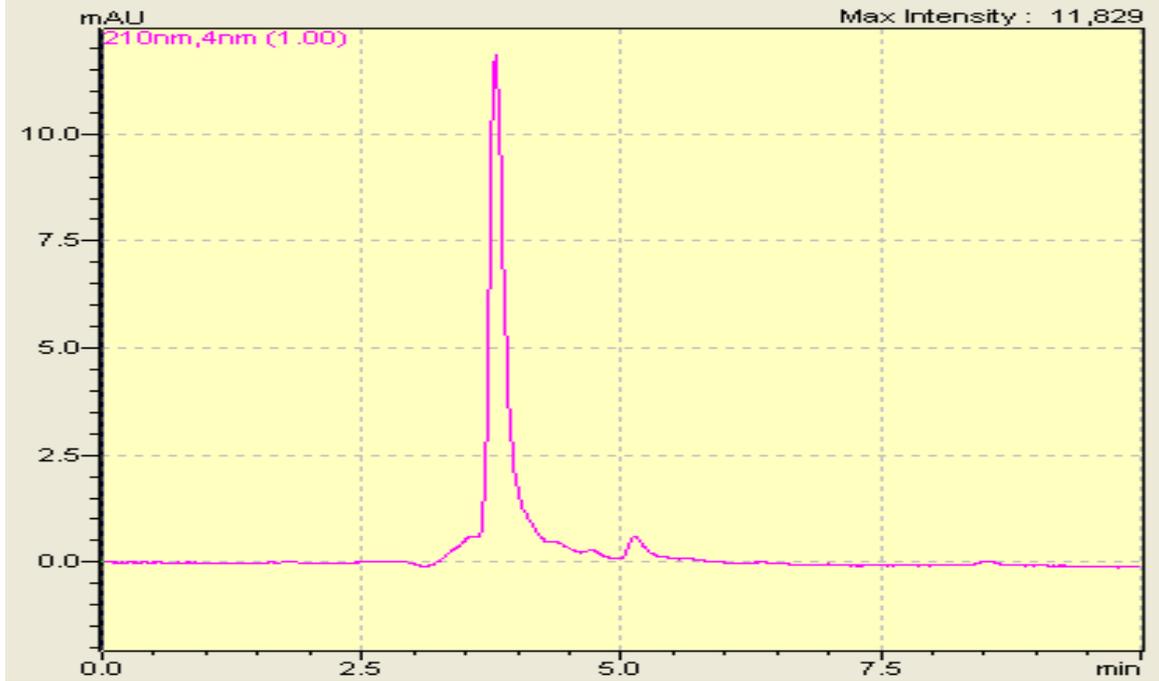


Figure 12 : Chromatogramme d'un blanc (phase mobile)

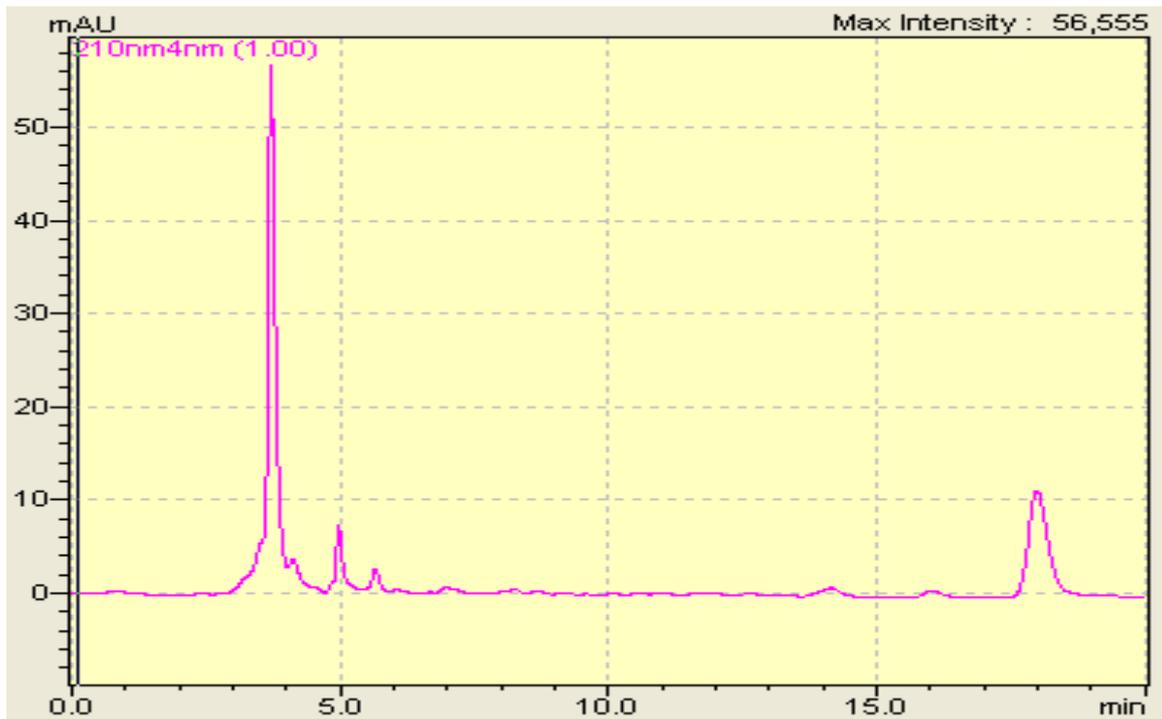


Figure13 : Chromatogramme d'un sérum (phase mobile+plasma)

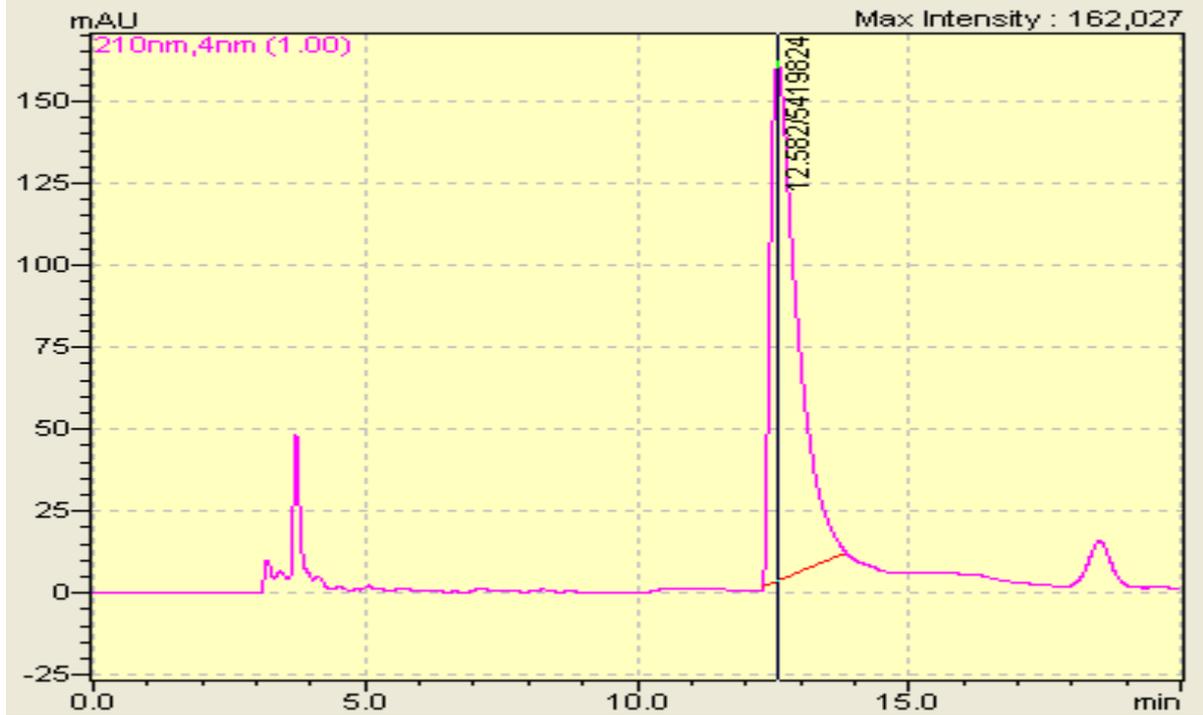


Figure14 : Chromatogramme d'un sérum contenant de la bupivacaïne à 1µg/ml

Conclusion :

La méthode est bien sélective car le pic de la bupivacaine est bien isolé à un temps de rétention $Tr = 12,582 \text{ min.}$

III-Validation au moyen du profil d'exactitude

Notre travail porte sur la validation d'une méthode de dosage de la bupivacaine dans une matrice biologique (plasma) par HPLC. C'est une méthode indirecte qui nécessite un étalonnage pour réaliser la quantification.

Le domaine de la validation s'étend sur l'intervalle [0,1-2 µg/ml] en fixant les limites d'acceptation à $\pm 15\%$ autour de la valeur de concentration introduite.

1-Plan expérimental de validation

↻ Plan d'étalonnage :

Le plan d'étalonnage comporte $p=3$ séries (jours) pour $m=4$ niveaux de concentration et $n=2$ répétitions/jour/niveau.

Séries	Niveaux	Concentration (µg/ml)	Aire (ua)
Jour 1	1	0,1	261617
	1	0,1	275411
	2	0,3	769794
	2	0,3	794619
	3	1	3226052
	3	1	3603421
	4	2	7562532
	4	2	8122174
Jour 2	1	0,1	225987
	1	0,1	254296
	2	0,3	747892
	2	0,3	775119
	3	1	3125204
	3	1	3291321
	4	2	7891646
	4	2	7954225
Jour 3	1	0,1	267584
	1	0,1	295127
	2	0,3	745917
	2	0,3	759623
	3	1	3294074
	3	1	3549841
	4	2	7654492
	4	2	7996987

Tableau 5 : Plan d'étalonnage, Les concentrations introduites sont exprimées en µg/ml et les aires en unité arbitraire.

☞ Plan de validation :

Le plan de validation se déroule en 3 jours c'est-à-dire on a $p=3$ séries. En ce qui concerne le nombre de répétitions $n=3$ répétitions/jour/niveau. Pour les niveaux de concentration, le plan comporte $m=5$ niveaux répartis sur le domaine de validation.

Séries	Niveaux	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Aire 1 (ua)	Aire 2 (ua)	Aire 3 (ua)
Jour 1	1	0,1	305236	250789	237757
	2	0,3	750666	810547	798327
	3	1	3127526	3250613	3450514
	4	1,5	4316859	4720523	4819527
	5	2	7502943	7152615	7004247
Jour 2	1	0,1	255043	249053	296720
	2	0,3	747858	716590	795478
	3	1	3118346	3170591	3216759
	4	1,5	4915243	4531212	4459213
	5	2	7260619	7526421	7122578
Jour 3	1	0,1	226547	265891	231568
	2	0,3	736235	752689	740746
	3	1	3092541	3325216	3514293
	4	1,5	4720985	4514953	4452799
	5	2	7523948	7105254	7394857

Tableau 6 : Plan de validation, les mesures instrumentales sont exprimées en (ua) et les concentrations de référence en $\mu\text{g/ml}$.

2-Modèle d'étalonnage

En vue de transformer les réponses instrumentales mesurées en concentrations par prédiction inverse, il faut sélectionner le modèle convenable d'étalonnage.

Pour choisir le modèle le plus adéquat qui est capable de produire une proportion suffisante de futures mesures qui se situeront à l'intérieur de la zone d'acceptabilité, nous avons généré plusieurs modèles reliant la surface du pic à la concentration. Les deux tableaux suivants regroupent les résultats statistiques de tous les modèles générés :

Modèles générés	Séries	Intercept	Pente	R ² (%)
0-max	1	0	3921177	99,75
	2	0	3961468	99,99
	3	0	3912870	99,90
Linéaire simple	1	-345862	4026840	99,30
	2	-425897	4069539	99,16
	3	-347950	4021653	99,47
Linéaire pondéré $\frac{1}{x}$	1	-182807	3835011	99,00
	2	-213720	3819919	98,70
	3	-176904	3820423	98,90
Linéaire pondéré $\frac{1}{x^2}$	1	-103086	3539381	97,60
	2	-126263	3495601	97,50
	3	-88234	3491606	97,00
$\sqrt{Y}=f(\sqrt{X})$	1	-208	2099	99,50
	2	-246	2121	99,50
	3	-206	2095	99,50
lny=f(lnx)	1	15	1,14	99,70
	2	15	1,17	99,80
	3	15	1,13	99,40

Tableau 7a: Résultats statistiques des modèles générés.

Modèles générés	Séries	Intercept	Coefficient a ₁	Coefficient a ₁₁	R ² (%)
Quadratique	1	-83979	2977565	494118	99,70
	2	-30129	2483831	746732	100,00
	3	-90265	2989198	486198	99,80
Quadratique pondéré $\frac{1}{x}$	1	-29623	2759781	596676	99,70
	2	-14388	2420765	776431	100,00
	3	-16214	2692500	625917	99,80
Quadratique pondéré $\frac{1}{x^2}$	1	9119	2487836	747586	99,60
	2	-3169	2342014	820132	99,90
	3	36568	2322016	831509	99,50

Tableau 7b: Résultats statistiques des modèles générés

A partir des données de plan de validation et en utilisant les différents modèles d'étalonnage, des concentrations sont calculées en retour par la prédiction inverse. Ces concentrations trouvées servent à calculer la valeur de biais relatifs, les coefficients de variation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire, paramètres combinés et nécessaires pour construire le profil d'exactitude en appliquant l'équation 16.

Les différents profils construits, utilisant les neuf modèles générés sont donnés par l'annexe n°1. Après avoir examiné soigneusement ces profils, nous avons sélectionné trois modèles qui répondent à nos attentes :

- Modèle linéaire simple ;
- Modèle racine carré ;
- Modèle logarithmique ;

Le choix est basé sur l'objectif de trouver des recouvrements par niveau, les plus proches possibles du 100%, avec un intervalle de tolérance le plus étroit et situé à l'intérieur des limites d'acceptabilité, pour avoir une méthode valide dans l'intervalle de concentration étudiée.

Donc parmi tous ces modèles, le modèle logarithmique s'avère plus ou moins proche du recouvrement souhaité. La figure 15 illustre son profil d'exactitude, dans ce cas on voit que la limite inférieure de l'intervalle de tolérance β -IT sort légèrement de la limite inférieure d'acceptabilité pour les deux premiers niveaux de concentration (0,1 $\mu\text{g/ml}$ et 0,3 $\mu\text{g/ml}$) et pour le quatrième niveau (1,5 $\mu\text{g/ml}$)

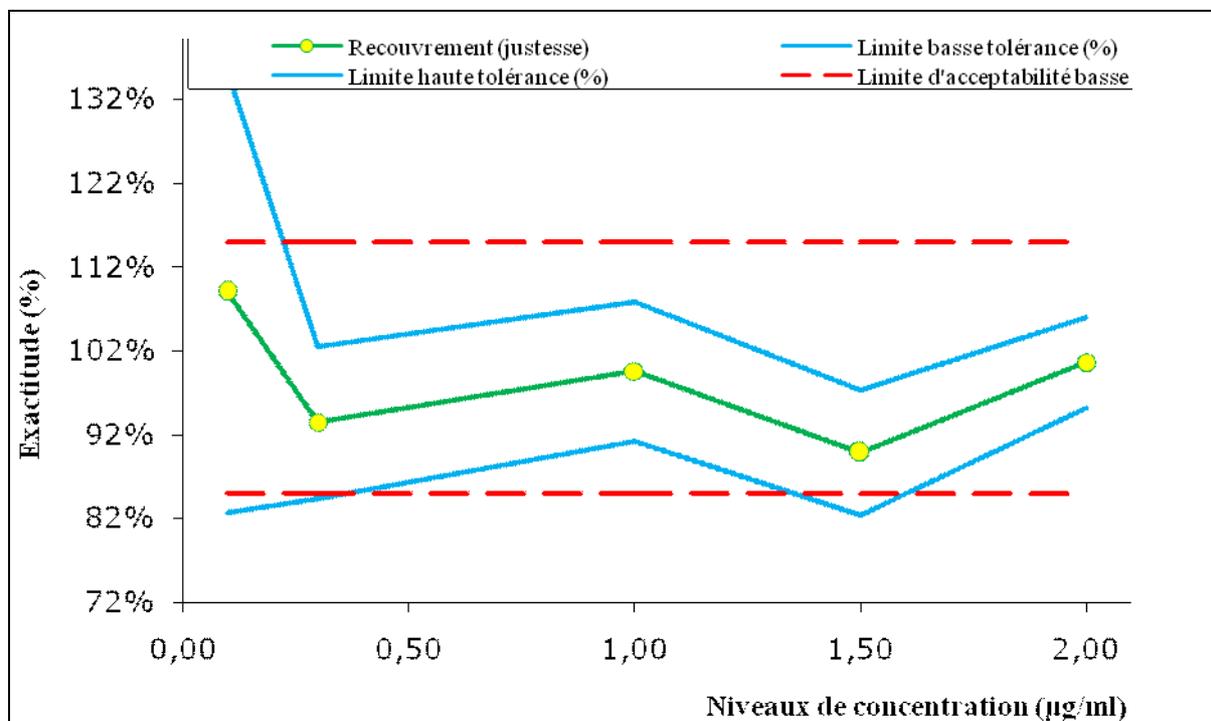


Figure 15 : Profil d'exactitude de la méthode de dosage de la bupivacaine dans le plasma, obtenu par un modèle logarithmique, représenté à partir des valeurs relatives par niveau $\beta=90\%$ $\lambda=\pm 15\%$.

Ce petit décalage est dû à l'effet de matrice donc il faut donc estimer un facteur de correction correspondant au biais de la méthode.

Pour faire ce calcul une équation de type $ax+b$ entre les concentrations théoriques et les concentrations calculées en retour est utilisée. La pente de l'équation entre les concentrations en retour et les concentrations théoriques correspond à l'inverse du facteur de correction considéré. La courbe de la figure 16 illustre ce calcul.

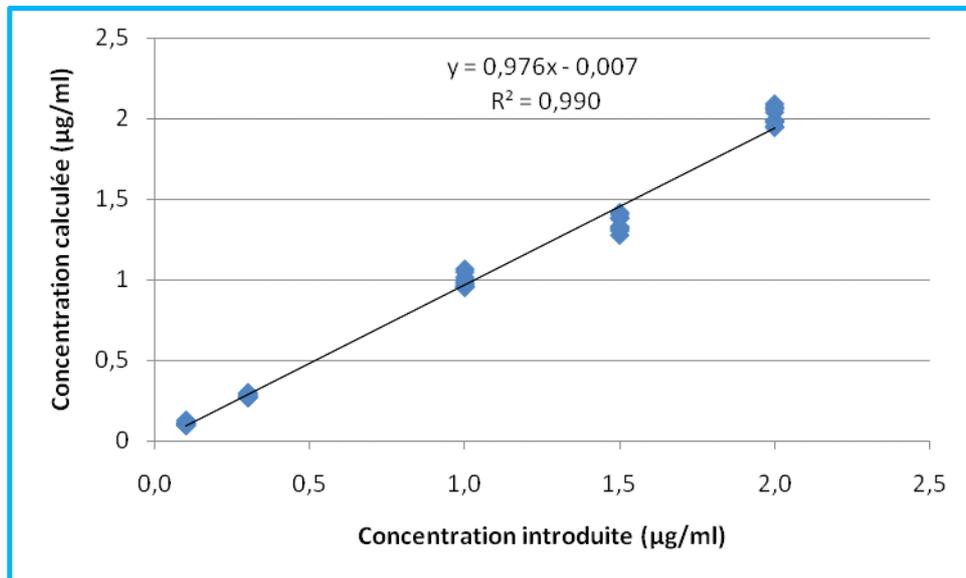


Figure 16 : Droite de régression entre les concentrations introduites et les concentrations en retour pour le modèle retenu (logarithmique).

L'équation de la droite est $(\text{Concentration calculée})=0,976*(\text{Concentration introduite})-0,007$

Le coefficient de détermination (r^2) est de 0,990.

Le facteur de correction (FC) à appliquer est donc de :

$$FC = \frac{1}{\text{pente}} = \frac{1}{0,976} = 1,025$$

Un nouveau calcul du profil d'exactitude est réalisé en tenant compte du facteur de correction. La correction est effectuée sur les concentrations calculées en retour. Le profil d'exactitude obtenu après correction est donné par la figure 17.

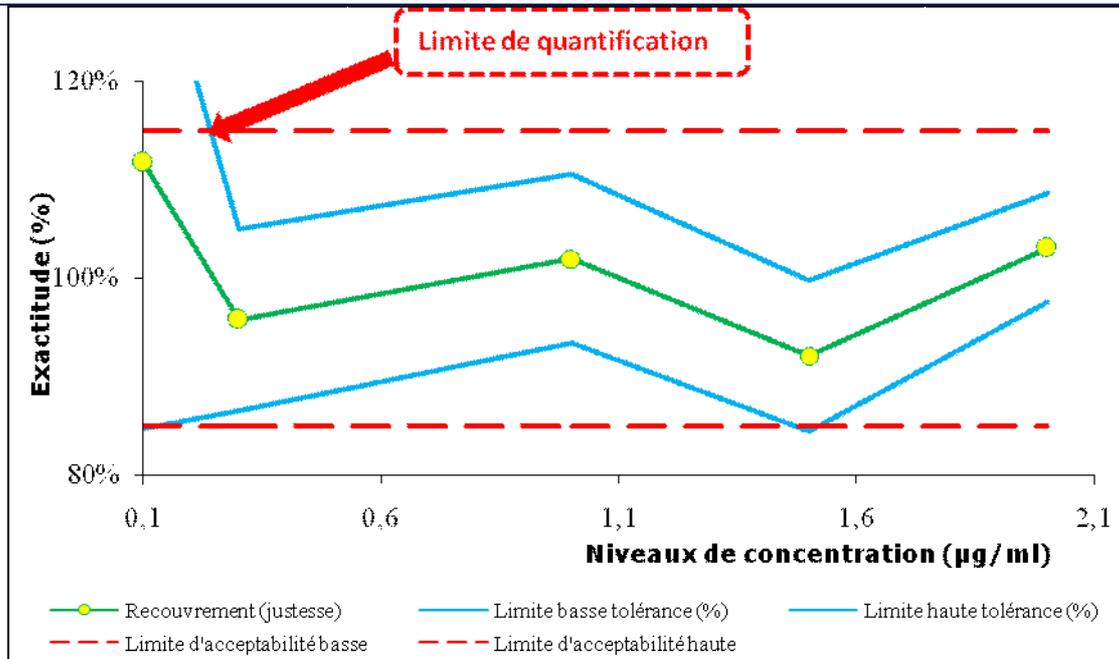


Figure 17 : Profil d'exactitude obtenu par un modèle logarithmique réalisé avec les données corrigées à partir des valeurs relatives par niveau $\beta=90\%$ $\lambda=\pm 15\%$.

Dans ce cas, on constate que la limite supérieure du β -IT coupe la limite supérieure d'acceptabilité aux alentours de $0,2 \mu\text{g/ml}$. Le point d'intersection est indiqué par une flèche rouge dans la figure n18.

- en dessous de $0,2 \mu\text{g/ml}$, l'analyste ne peut pas garantir que la méthode sera capable, en routine, de produire, en moyenne, au moins 90 % de résultats acceptables, c'est-à-dire situés à $\pm 15\%$ de la valeur vraie d'un échantillon ;
- au-dessus de $0,2 \mu\text{g/ml}$, les performances de la méthode deviennent acceptables. À partir de $0,3 \text{ mg/L}$, elle produit sans doute plus de 99 % de mesures acceptables.

Il faut signaler la présence d'un risque au quatrième niveau car la limite de tolérance coupe légèrement la limite d'acceptabilité.

3-Calcul de la justesse, de la fidélité et de l'intervalle de tolérance :

Le modèle retenu est le modèle logarithmique, les concentrations trouvées par prédiction inverse en utilisant ce modèle, sont présentées dans le tableau 8. Ces données vont servir à calculer les critères de validation et les intervalles de tolérance.

Niveaux	Concentration (µg/ml)	Concentrations calculées			Concentrations corrigées		
		xc ₁	xc ₂	xc ₃	xc ₁	xc ₂	xc ₃
1	0,10	0,125	0,113	0,094	0,128	0,116	0,097
	0,10	0,105	0,111	0,109	0,108	0,113	0,111
	0,10	0,100	0,129	0,096	0,103	0,132	0,098
2	0,30	0,275	0,283	0,267	0,282	0,290	0,274
	0,30	0,294	0,273	0,273	0,302	0,280	0,279
	0,30	0,290	0,299	0,269	0,298	0,306	0,275
3	1,00	0,962	0,960	0,952	0,986	0,984	0,975
	1,00	0,995	0,974	1,015	1,020	0,998	1,040
	1,00	1,049	0,986	1,066	1,074	1,011	1,092
4	1,50	1,276	1,417	1,384	1,308	1,452	1,418
	1,50	1,380	1,322	1,331	1,414	1,354	1,363
	1,50	1,406	1,304	1,315	1,440	1,336	1,347
5	2,00	2,073	1,978	2,091	2,124	2,027	2,143
	2,00	1,987	2,040	1,988	2,036	2,090	2,037
	2,00	1,951	1,946	2,059	1,999	1,994	2,110

Tableau 8 : Plan de validation. Concentrations calculées par prédiction inverse au moyen du modèle logarithmique et concentrations corrigées.

3-1-Calcul de la fidélité :

Le calcul de fidélité par niveau est résumé dans le tableau 9.

Niveaux de concentration	Concentration introduite (µg/ml)	Concentration calculée (µg/ml)	S _{rép}	CV _{rép} (%)	S _{FI}	CV _{FI} (%)
Niveau1	0,10	0,11	0,011	9,55	0,013	11,34
Niveau2	0,30	0,29	0,010	3,41	0,013	4,37
Niveau3	1,00	1,02	0,043	4,24	0,043	4,24
Niveau4	1,50	1,38	0,058	4,23	0,058	4,23
Niveau5	2,00	2,06	0,056	2,72	0,056	2,72

Tableau 9 : Critères de fidélité pour les cinq niveaux de concentration

D'après le tableau 9, on constate que les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire ne dépassent pas 4,37% sauf pour le premier niveau, qui ont respectivement comme valeurs 9,55 et 11,34%. Ils diminuent au fur et à mesure que la concentration augmente.

De même, on remarque que l'écart-type de fidélité dépend largement de la concentration ; il augmente avec elle et doit toujours être relié à la concentration où il a été estimé.

Mais, pour l'instant nous ne porterons pas de jugement sur les valeurs individuelles trouvées pour chaque critère, étant donné que, par principe, le profil d'exactitude va combiner la fidélité et la justesse et permettre un diagnostic global qui interviendra plus loin.

3-2-Calcul de la Justesse :

La justesse peut être alors calculée à partir des données du tableau 6, sous diverses formes, comme un biais moyen absolu ou relatif. Dans notre cas elle est évaluée à l'aide du taux de recouvrement moyen R %, le tableau 10 résume les critères de justesse :

Niveaux de concentration	Concentration introduite ($\mu\text{g/ml}$)	Concentration calculée ($\mu\text{g/ml}$)	Biais (%)	Recouvrement (%)
1	0,10	0,11	11,76	111,76
2	0,30	0,29	-4,22	95,78
3	1,00	1,02	2,00	102,00
4	1,50	1,38	-7,90	92,10
5	2,00	2,06	3,10	103,10

Tableau 10 : Critères de justesse pour les cinq niveaux de concentration

4-Calcul des intervalles de tolérance :

Le tableau 11 présente un récapitulatif des critères d'exactitude pour les 5 niveaux de concentration. La probabilité associée à l'intervalle de tolérance est de 90 % et les limites d'acceptabilité sont de 15 %, comme décidé auparavant.

Pour une concentration de référence égale à 0,1 ,90% des futures mesures se situeront entre 0,085 et 0,139 $\mu\text{g/ml}$; cet intervalle est dissymétrique car la méthode présente un biais de justesse de 11%. Si on passe en valeurs relatives, on obtient les limites de tolérance 85% et 139%. Or les limites d'acceptabilité sont entre 85% et 115%. La méthode n'est pas capable de produire au moins 90% de futures mesures entre les limites d'acceptabilité à ce niveau de concentration : elle n'est donc pas validée aux basses concentrations. Par contre, elle est valide pour les niveaux 2, 3 et 5.

Pour le niveau 4, il y a un risque de ne pas trouver les 90% des futures mesures dans l'intervalle d'acceptabilité car les limites basses de tolérance et d'acceptabilité se coïncident.

Probabilité tolérance (bêta)	90%				
Limite d'acceptabilité	15%				
Niveaux	1	2	3	4	5
Valeur cible ($\mu\text{g/ml}$)	0,1	0,3	1	1,5	2
Moyenne ($\mu\text{g/ml}$)	0,112	0,287	1,020	1,381	2,062
Ecart-type de répétabilité (S_r)	0,011	0,010	0,043	0,058	0,056
Ecart-type inter-séries (S_L)	0,007	0,008	0,000	0,000	0,000
Ecart-type de fidélité (S_{FI})	0,013	0,013	0,043	0,058	0,056
Intervalle de tolérance basse ($\mu\text{g/ml}$)	0,085	0,260	0,935	1,266	1,952
Intervalle de tolérance hausse ($\mu\text{g/ml}$)	0,139	0,315	1,105	1,497	2,172
Biais (%)	11,76	-4,22	2,00	-7,90	3,10
Recouvrement (%)	111,76	95,78	102,00	92,10	103,10
Intervalle de tolérance basse (%)	84,74	86,51	93,48	84,43	97,58
Intervalle de tolérance hausse (%)	138,77	105,05	110,52	99,77	108,62
Limite d'acceptabilité basse(%)	85	85	85	85	85
Limite d'acceptabilité haute(%)	115	115	115	115	115

Tableau 11 : Récapitulatif des critères d'exactitude pour les cinq niveaux de concentration

5-Calcul de la limite de quantification :

On a vu sur la figure 17 qu'il existe une concentration en dessous de laquelle au moins une des bornes de l'intervalle de tolérance sort des limites d'acceptabilité. Au-dessus de cette concentration, l'analyste peut garantir que la méthode quantifiera de façon acceptable les échantillons reçus. Assez naturellement, on peut proposer de désigner cette limite de concentration la plus basse comme la limite de quantification (LQ) de la méthode. Si on se réfère à la figure 17 et au tableau 11 récapitulatif des calculs, la LQ se situerait entre les niveaux 1 et 2.

La LQ peut être obtenue exactement si on connaît l'abscisse de ce point d'intersection entre la limite de tolérance et la limite d'acceptabilité.

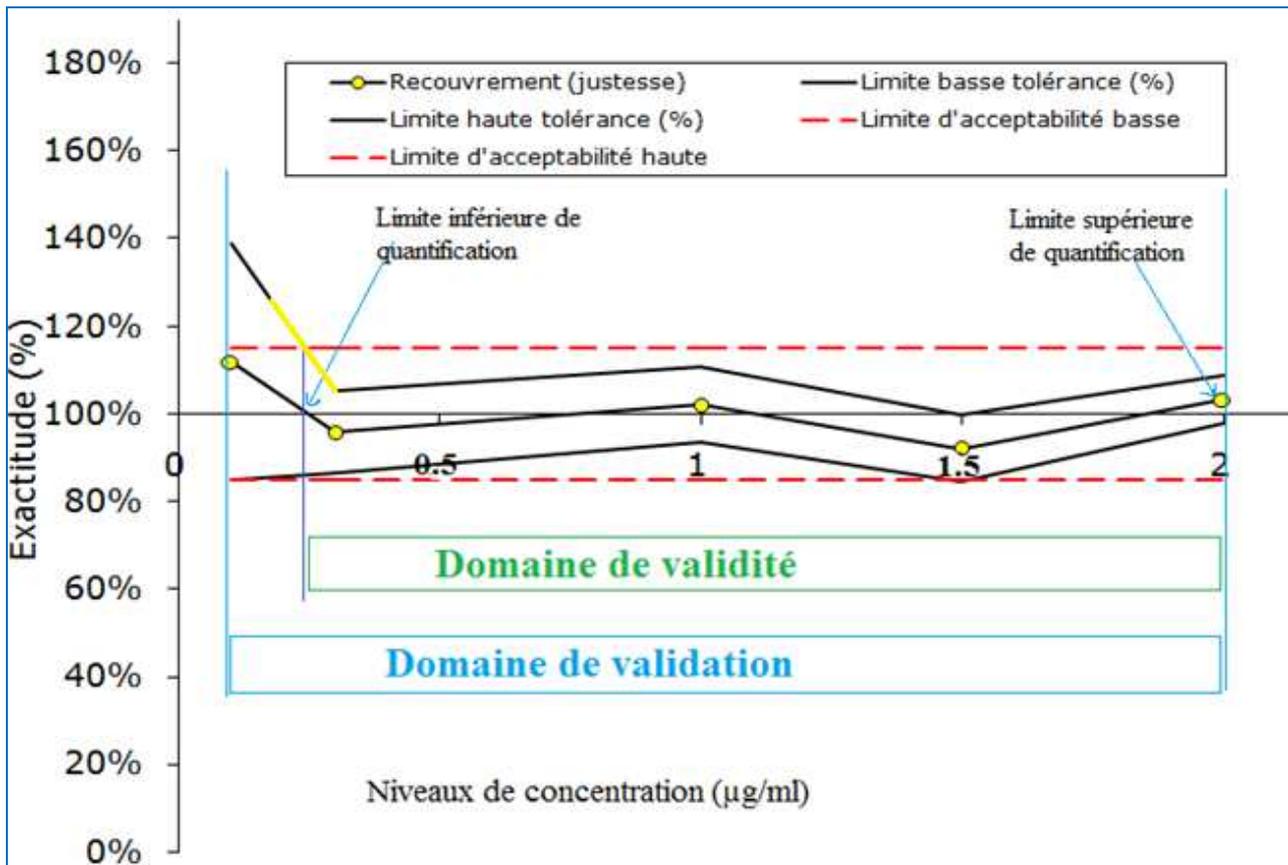


Figure 18 : Profil d'exactitude établi après l'introduction du facteur de correction sur les résultats de mesures, avec un intervalle de tolérance à 90 %, et un intervalle d'acceptabilité à 15 %.

Les calculs sont réalisés sur les valeurs absolues telles qu'elles sont représentées dans le tableau 11.

La LQ est le point d'intersection entre des droites qui sont respectivement la limite supérieure de l'intervalle de tolérance et la limite supérieure d'acceptabilité. L'égalité entre les équations des deux droites donne la LQ. Le tableau 12 résume le calcul.

Niveau	1	2
Concentrations	0,1	0,3
Intervalle de tolérance	0,139	0,315
Limite d'acceptation	0,115	0,345
Droite	pente	ordonnée
Intervelle de tolérance	0,88	0,051
Limite d'acceptation	1,15	0
Limite de quantification	0,189	

Tableau 12 : Calcul détaillé de la limite de quantification

On trouve que la LQ vaut finalement 0,189 µg/ml. C'est donc une valeur un peu plus petite que celle de 0,3 µg/ml. On peut alors dire que le domaine validé s'étend entre 0,189 et 2 µg/ml.



6-Estimation de l'incertitude de mesure :

A partir des données du tableau 11, on peut calculer l'incertitude de mesure à chaque niveau de concentration. Les résultats de calculs de l'incertitude-type, l'incertitude élargie et l'incertitude élargie relative sont résumés dans le Tableau 13. Ces résultats montrent que les valeurs relatives de l'incertitude ne dépassent 10% à l'exception du premier niveau de concentration (U=25%) ; résultat qui illustre bien l'idée que, qu'à proximité de la LQ, pour les concentrations les plus basses, l'analyste ne peut plus vraiment garantir l'acceptabilité de ses résultats.

Niveaux	Concentration introduite (µg/ml)	Incertitude type (µg/ml)	Incertitude élargie (µg/ml)	Incertitude élargie relative (%)
1	0,10	0,014	0,027	24,585
2	0,30	0,014	0,027	9,560
3	1,00	0,046	0,091	8,935
4	1,50	0,062	0,123	8,909
5	2,00	0,059	0,118	5,724

Tableau 13 : Incertitudes de la méthode de dosage de la bupivacaïne.



CONCLUSION

La méthodologie globale du profil d'exactitude appliquée pour valider la méthode chromatographique de dosage de la bupivacaïne dans le plasma humain est mieux adaptée aux enjeux de la validation, à savoir la satisfaction des besoins des services demandeurs tout en contrôlant le risque de laboratoire. Elle permet de décider la validité de la méthode seulement à partir d'une illustration graphique sans qu'aucun test d'hypothèse ne soit effectué.

Une méthode chromatographique a été sujet de validation analytique par l'approche du profil d'exactitude. Dans un premiers temps, nous avons pu démontrer la sélectivité de la méthode et déterminer l'intervalle de linéarité qui s'étend entre 0,01 et 2 µg/ml. Puis après la réalisation d'un plan expérimental de validation pour pouvoir estimer le biais, nous avons constaté que le recouvrement moyen est en sous-estimation légère, ce qui nous a poussés à introduire un facteur de correction (1,025) après génération de plusieurs modèles. Le modèle retenu est le modèle logarithmique qui donne des résultats très satisfaisants.

L'établissement des deux intervalles de tolérance basse et haute utilisant les paramètres statistiques tel que le biais relatif et le coefficient de variation de la fidélité intermédiaire pour une attente d'une proportion de 90% des résultats futurs soit comprise entre les limites d'acceptation de $\pm 15\%$, nous a permis de construire le profil d'exactitude.

Le profil d'exactitude construit à l'issue de ce travail caractérisant la méthode, est valide dans un intervalle de concentration allant de la limite inférieure de quantification, estimée égale à 0,189 µg/ml vers la limite supérieure de quantification à 2 µg/ml en prenant une attention particulière au niveau 4 de concentration présentant un risque léger près de 1,5 µg/ml. Tout en gardant à l'esprit qu'on espère avoir 90% des résultats futures de la méthode qui seront inclus entre les limites d'acceptation fixées à 15 % avec un risque léger aux alentours de 1,5 µg/ml.

En outre, les données de validations sont utilisées pour nous servir à estimer l'incertitude de mesure à chaque niveau de concentration. Les résultats trouvés sont très encourageants et nous poussent à élargir la validation de la méthode pour les autres anesthésiques locaux utilisés en chirurgie.



BIBLIOGRAPHIES

- [1] : Choix et validation d'une méthode d'analyse
Christian Ducauze, Arlette Baillet-Guffroy et Thanh X. Bui (page2)
- [2] : La méthode des plans d'expériences. GOUPY (J.). Dunod, Paris, France (1988).
- [3] : Validation des méthodes analytiques. Cadre réglementaire Normes et recommandations, Ph. Hubert, P. Chiap, J. Crommen Laboratoire d'Analyse des Médicaments, Université de Liège, Belgique.
- [4] : Définition de la validation de méthode et outils associés, Jérôme VIAL Laboratoire Environnement et Chimie Analytique de l'ESPCI, Journée de Formation Scientifique en Spectrométrie Atomique 14 Novembre 2006 - Paris
- [5] : De la validation des méthodes d'analyse à l'évaluation de l'incertitude des résultats de mesure Michèle Désenfant – Marc Priel – Cédric Rivier, Laboratoire National d'Essais BNM-LNE
- [6] : Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. *Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie*, DR-12-VMC, Québec, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, Édition : 9 juin 2009
- [7] : Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches, *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, C. Nivet, G. Muzard, L. Valat.
- [8] : FD V 01-000 (décembre 1999) Analyse des produits agricoles et alimentaires-Terminologie.
- [9] : Aide à la validation des méthodes en toxicologie et suivi thérapeutique. *Ann Toxicol Anal.* Dingeon B, Dreyfuss MF, Gaillard Y, Le Bouil A, Lhermitte M, Mazzega S et al. 2005;17(3/supplément 1):1-20
- [10] : Procédure générale de validation d'une méthode quantitative en toxicologie et suivi thérapeutique et pharmacologique. CHU AMIENS Picardie.
- [11] : Stratégie de validation de méthodes de dosage en bioanalyse en vue d'études pharmacocinétiques et toxicologiques. *Ann Toxicol Anal.* Nicolas O, Farenc C, Bressolle F. 2004;16(2):118-27.
- [12] : Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude, Max FEINBERG. Publication : 10/12/2012



[13] : Validation des procédures analytiques quantitatives. Harmonisation des démarches Partie I, STP Pharma Pratiques 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.(2003) 13(3), 101-138

[14]: Two-sided tolerance intervals for balanced and unbalanced random effects models. D. Hoffman, R. Kringle. J Biopharm Stat. (2005) 15(2), 283-293.

[15]: Beta-expectation and beta-content tolerance limits for balanced one-way ANOVA random model, Technometrics, R. Mee, (1984) 26(3), 251-254.

[16] : Development and Validation of a stability-Indicating HPLC Method for Determination of Bupivacaine in Human Plasma. Wael Abu Dayyih, Enas Alkhader, Eyad Mallah, Tawfiq Arafat (September 2013)

***Sites WEB :**

[17] : <http://www.e-sante.fr/bupivacaine-b-braun-0-25-2-5-mg/ml-solution-injectable-boite-20-ampoules-20-ml/medicament/383>

[18] : <http://www.inchem.org/>





ANNEXE N°1

Les différents profils construits à partir des modèles générés avec et sans correction :

