



SOMMAIRE

- INTRODUCTION	1
- PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	2
- Présentation du lieu du Stage	3
- Les principales méthodes du dosage des médicaments.....	5
- Méthodes Immunologiques	5
- Méthodes dites « Manuelles »	6
- Méthodes Colorimétriques	7
- Électrophorèse Capillaire (EC)	7
- HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	8
- La Rifampicine	17
- Suivie thérapeutique de la Rifampicine	19
- Choix et validation d'une méthode	22
- PARTIE PRATIQUE	31
- MATERIEL ET METHODE	32
- Objet et domaine d'application	32
- Matériel	32
- La chromatographie liquide a haute performance Shimadzu/DAD	32
- Description de la HPLC SHIMADZU/DAD.....	37
- Produits	38
- Phase Mobile	38
- Pré-colonne	38
- Colonne	38
- Préparation des échantillons	39
- Conditionnement de l'analyse	40
- RESULTATS ET DISCUSSION	41
- Optimisation de la méthode analytique	41
- Validation de la méthode analytique	43
- Spécificité/ sélectivité	43
- Linéarité	44
- La fidélité : Répétabilité	45
- Justesse	46
- Limite de détection	46
- Limite de Quantification	46
- Dosage de La Rifampicine	47
- Discussion	49
- Conclusion	50



INTRODUCTION

L'utilisation d'une méthode de dosage correctement validée, offrant des résultats fiables et interprétables de façon satisfaisante, est un pré-requis non seulement avant toute étude pharmacocinétique, toxicocinétique et tout au long du développement d'un médicament, mais aussi lors de son utilisation en clinique.

Au moment où on introduit une nouvelle technique ou un nouvel analyseur dans un laboratoire, il est important de le tester pour en connaître la qualité, les performances et les comparer aux exigences cliniques actuellement admises, l'ensemble de ces processus permet de constituer le dossier de validation des méthodes.

Cette validation est une exigence technique de la norme NF EN ISO/CEI 17025 définie comme suit : "La validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies."

A cet effet, les problèmes liés à la qualification de l'équipement analytique et au prétraitement de l'échantillon, seront abordés. Par conséquent, pour s'assurer de la fiabilité des résultats d'une méthode nouvelle ou modifiée, il est essentiel de passer par la validation de cette dernière.

De nombreuses techniques ont été développées pour le dosage des médicaments, notamment les méthodes chromatographiques (chromatographie liquide à haute performance « HPLC », chromatographie en phase gazeuse) et les méthodes immunologiques. L'HPLC reste la technique d'excellent choix. En effet, elle permet la séparation qualitative et quantitative des molécules et par la suite l'identification des médicaments avec une large précision et performance.

L'objectif de mon travail est de développer et valider une méthode de dosage de la **RIFAMPICINE** par HPLC qui soit simple, sensible et rapide pouvant être appliquée en routine.



PARTIE **BIBLIOGRAPHIQUE**

PRESENTATION DU LIEU DU STAGE

Dans le cadre du projet de fin d'étude en deuxième année Master, j'ai effectué un stage de 5 mois dans le laboratoire de pharmacotoxicologie, du laboratoire central des analyses médicales, au centre hospitalier universitaire (CHU) Hassan II de Fès. Le but de ce projet est la Validation de méthode du dosage de la Rifampicine par HPLC.



Figure 1 : Laboratoire d'analyses CHU HASSAN II

Le laboratoire central des analyses médicales se compose de :

- o Salle de réception
- o Salle de prélèvements
- o Laboratoire de biochimie/Pharmacotoxicologie
- o Laboratoire d'hématologie
- o Laboratoire de bactériologie /Immunologie
- o Laboratoire de parasitologie
- o Laboratoire de génétique
- o Laboratoire d'anatomie pathologique

Voici l'organigramme de l'unité de pharmacologie au laboratoire de pharmacotoxicologie

Organigramme de l'unité de Pharmacotoxicologie de CHU – HASSAN II de Fès

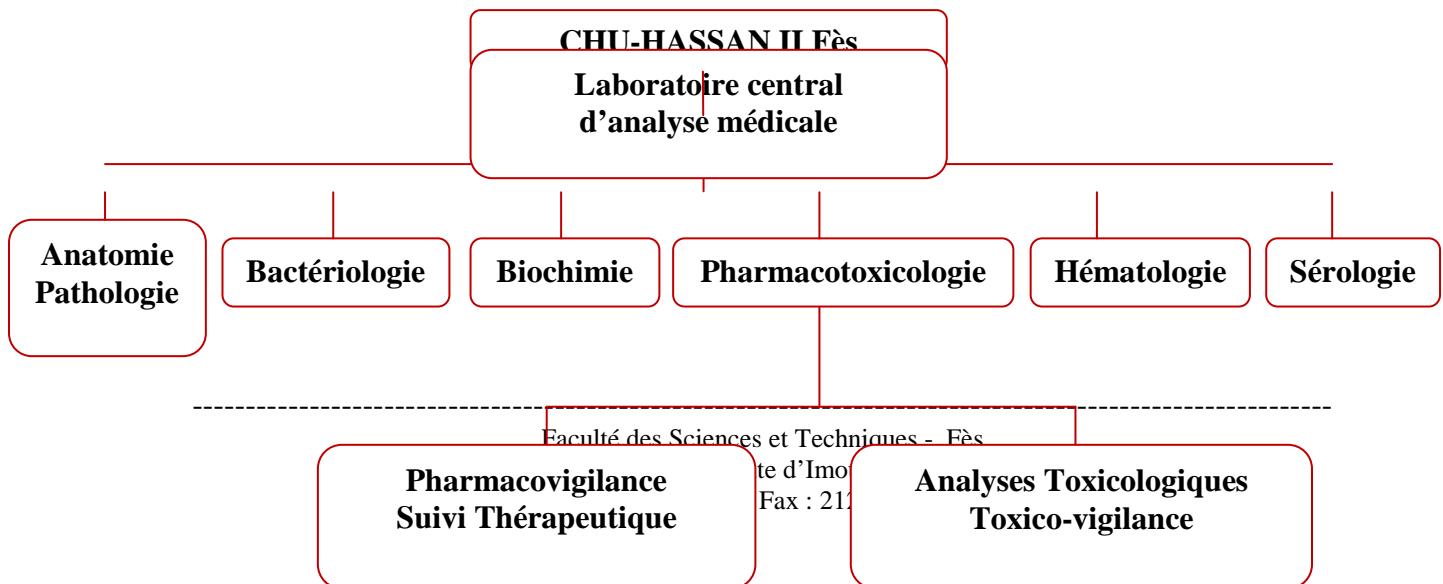




Figure 2 : organigramme de l'unité de pharmacotoxicologie de CHU- Fès

1- LES PRINCIPALES METHODES POUR LE DOSAGE DES MEDICAMENTS :

Les méthodes du dosage des médicaments peuvent être séparées en deux grands groupes : les méthodes immunologiques et les méthodes chromatographiques

A- Méthodes immunologiques :

Principe général:

Utilisation d'anticorps (poly ou mono clonaux) dirigés contre le médicament à doser.
Méthode utilisant la réaction antigène (médicament)/anticorps en quantité limitée.
Faisant appel à des courbes d'étalonnage

- La méthode EMIT(**E**nzyme **M**ultiplied**I**mmuno-**a**ssay **T**echnique)

Dosage Immuno-enzymatique, c'est-à-dire le marqueur est une enzyme :

Le médicament entre en compétition pour l'anticorps avec un antigène marqué par l'enzyme. Le site enzymatique est masqué lors de la liaison avec l'anticorps, l'enzyme est active sur son substrat quand l'antigène est à l'état libre et la lecture est obtenue dans l'UV par la réduction de nicotinamide di-nucléotide (NAD), cofacteur de la réaction, qui se transforme en NADH absorbant à 340 nm.

- plus il y a de médicament dans l'échantillon :
- plus la quantité d'enzyme active sera importante
- plus la quantité de substrat hydrolysé sera importante,
- plus l'absorbance dans l'ultra-violet sera élevée.
- Méthode très bien adaptée aux dosages de petites molécules,

- La méthode CEDIA (**C**loned **E**nzyme **D**onor**I**mmuno-**A**ssay):

Il s'agit du même principe que la méthode EMIT, sauf que l'enzyme utilisée est une enzyme bactérienne scindée en deux fragments inactifs par génie génétique : un fragment enzyme accepteur (EA) et un fragment enzyme donneur (ED), l'association spontanée de ces deux fragments donne une enzyme active.

- la méthode FPIA (Fluorescence PolarizationImmuno-Assay) :



Le traceur est marqué avec un fluorophore. Les médicaments libres qui sont sous forme de petites molécules qui tournent plus vite, ils vont alors dépolariser la lumière, ainsi que les complexes anticorps-traceur ne la dépolarisent pas car ils sont gros et tournent lentement. L'intensité lumineuse est mesurée de la lumière dépolarisée.

- Les Avantages des Méthodes Immunologiques :

- pas de préparation de l'échantillon
- faible volume d'échantillons (50-100 µl)
- rapide, rendu quotidien des résultats
- mise en œuvre simplifiée: calibration limitée
- pas de personnel qualifié
- utilisable en urgence

- Inconvénients des Méthodes Immunologiques :

- spécificité: Ac utilisés
- pas assez spécifiques: risque de doser un ou des métabolites sans activité (ni toxicité)
- trop spécifiques: pas de dosage d'un métabolite qui pourrait être doué d'une activité thérapeutique
- sensibilité: limitée mais en général suffisante en suivi thérapeutique

B- Méthodes dites « manuelles » :

Considérées comme méthodes de référence

- Permettent de doser séparément : médicament +métabolite (s)
- Nécessitent une préparation plus ou moins complexe de l'échantillon : phase pré-analytique



-
- Pour beaucoup de médicaments (β bloquants, antifongiques,...) ,seules méthodes disponibles.

Phase pré-analytique

- But: extraire du milieu biologique (sérum) les molécules d'intérêt.
- Méthodes +/- longues et complexes:
- précipitation des protéines : acide; méthanol. Simple, rapide, mais peu spécifique.
- extraction : plus longue, mais plus spécifique.

C- Méthodes Colorimétriques :

De moins en moins utilisées

Basées sur la réaction du médicament avec un réactif dérivé coloré
ex: dosage des salicylés avec le réactif de Trinder

sur l'absorbance de la molécule à une longueur d'onde spécifique:

- ex : dosage de la chloroquine à 343 nm
- Sensibilité limitée
- Spécificité limitée

D- Électrophorèse Capillaire (EC) :

- Principe : Séparation des molécules en fonction de leur charge et de leur masse dans un capillaire sous l'influence d'un champ électrique
- DéTECTEURS EC: UV-Visible, Fluorescence , (spectromètre de masse)
- Domaines d'applications: molécules chargées (ex: pralidoxime), molécules hydrophiles (ex: antibiotiques, pénicilline et dérivés)
- Avantages EC :
 - Phase pré-analytique très simple, voir Absente
 - Temps d'analyse court (<10min)
 - Méthode très résolutive, spécifique
- Inconvénients EC :
 - Très mauvaise sensibilité (UV-Vis)
 - peu d'application en suivi thérapeutique

E- HPLC (High Performance Liquid Chromatography) :



La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification.

La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse.

A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire, régularité de cette phase...).

a- Principe :

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

b- Notions fondamentales :

La phase stationnaire est un support plus ou moins poreux recouvert d'un gel (liquide greffé) qui a les propriétés désirées pour retenir les molécules de solutés.

La phase mobile ou éluant est un liquide qui entraîne les solutés à travers la colonne.

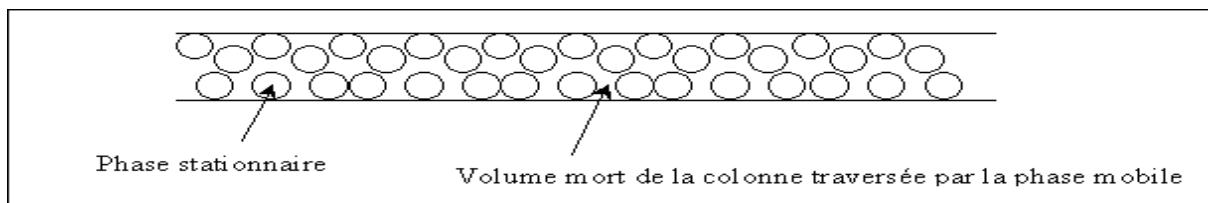


Figure 3 : description de la Phase Stationnaire

❖ Notion de temps

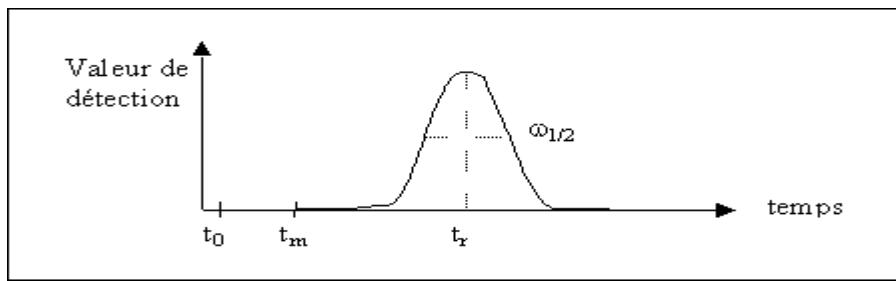


Figure 4 : Exemple d'un pic

- t_0 est le temps du début de l'injection
 - Le temps mort t_m est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile)
 - Le temps de rétention t_r est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne. C'est le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort de la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée. La surface du pic est fonction de la quantité du constituant dont il est la trace.
 - Le temps de rétention réduit t'_r est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit :

$$t'_{-x} = t_x - t_m$$

❖ Notion de concentration :

- Le coefficient de partage K :

À un instant donné, le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et C_s dans la phase stationnaire. Leur rapport à l'équilibre est appelé coefficient de partage K

$$K = \frac{Cs}{Cm}$$

Ce coefficient est fonction de 3 types d'affinités :

- celle entre le soluté et la phase mobile
 - celle entre le soluté et la phase stationnaire
 - celle entre les phases mobile et stationnaire

- Le facteur de capacité K' est le rapport de la quantité d'un soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

$$K' = \frac{Cs \times Vs}{Cm \times Vm} = K \times \frac{Vs}{Vm}$$



V_s : volume de la phase stationnaire

V_m : volume de la phase mobile ou volume mort

K' est aussi le rapport du temps passé par un soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile.

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

❖ Notion d'efficacité :

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. L'efficacité est mesurée par :

- le nombre de plateaux théoriques N_{th}

$$N_{th} = 5,54 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2$$

t_r : temps de rétention

w 1/2 : largeur du pic à mi-hauteur

Remarque :

N_{th} est très utilisé en HPLC. Pourtant il serait plus judicieux d'utiliser N_{eff} (nombre de plateaux effectifs) puisqu'il dépend vraiment du temps passé dans la phase stationnaire.

$$N_{eff} = 5,54 \left(\frac{t_r - t_m}{w_{1/2}} \right)^2$$

Expérimentalement t_m est difficile à déterminer d'où l'utilisation de N_{th}.

- La hauteur équivalente à un plateau théorique : HEPT, qui est défini comme :

$$HEPT = \frac{L}{N_{th}}$$

L : Longueur de la colonne

N_{th} : Nombre de plateaux théoriques

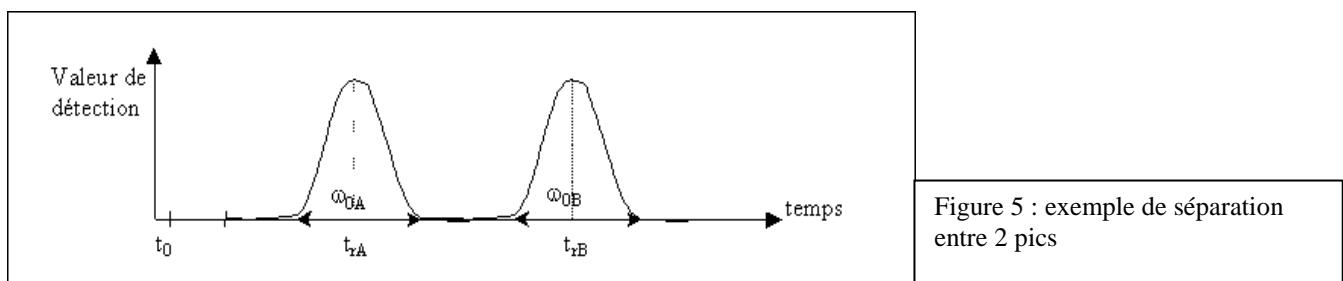


Quels sont les facteurs d'élargissement des pics ?

- La diffusion turbulente : l'élargissement est expliqué par le fait qu'il existe différents chemins parcourus par les molécules d'un soluté. La longueur des chemins n'étant pas la même, elles ne mettent pas toutes le même temps pour traverser la colonne : le pic s'élargit. Ce phénomène est fonction des particules et de la régularité du remplissage.
- La résistance au transfert de masse : l'élargissement est expliqué par l'accumulation de phase mobile dans les anfractuosités du support. Les molécules qui y diffusent vont moins vite que celle qui n'y diffuse pas.
- La diffusion longitudinale. Ce phénomène diminue plus la vitesse de la phase mobile augmente. Dans la pratique cette diffusion est négligeable en HPLC.

En conclusion l'efficacité calculée d'une chromatographie, représentée par la HEPT, est fonction de la vitesse de la phase mobile donc du débit, et de la qualité (régularité, remplissage) de la phase stationnaire.

❖ Qualité de Séparation :



• La sélectivité (a)

Elle est définie comme le rapport des temps de rétention réduits

$$\alpha = \frac{t'_{rB}}{t'_{rA}}$$

a est toujours > 1 car on choisit $t'_{rB} > t'_{rA}$

• La résolution (R)

Elle quantifie la qualité de la séparation en caractérisant le fait qu'il y ait ou non chevauchement de 2 pics contigus.

$$R = \frac{(t'_{rB} - t'_{rA})}{(\omega_{0B} - \omega_{0A})}$$

$R < 1$: mauvaise résolution

$1 < R < 1,4$: résolution acceptable

$1,4 < R < 1,6$: résolution optimale



$R > 1,6$: résolution trop bonne car le temps d'analyse est rallongé

Remarque :

- Si les pics sont gaussiens $w_0 = 1,7 w 1/2$
- Il est parfois utile d'exprimer cette résolution en fonction de la sélectivité et de l'efficacité du dernier des 2 pics étudiés

$$R = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{K_B^*}{1 + K_B^*} \times \sqrt{N_{th}} = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \sqrt{N_{eff}}$$

❖ Notions de Pression :

A l'intérieur d'une colonne la phase mobile frotte sur les parois de la colonne mais aussi sur les particules de phase stationnaire. Ces frottements définissent la résistance à l'écoulement.

Les particules de phase stationnaire sont sphériques. Si l'on divise leur diamètre par 10, on diminue leur surface d'un facteur 100 et leur volume d'un facteur 1000. On peut donc placer dans la colonne 1000 fois plus de particules et donc augmenter de 10 fois la surface en contact avec la phase mobile. La résistance à l'écoulement est donc augmentée.

En conséquence, pour maintenir le débit constant dans la colonne il faut augmenter la pression plus la granulométrie de la phase stationnaire est faible.

En HPLC on travaille, en tête de colonne, à des pressions entre 20 et 150 bars

c- Les différentes modes de séparation :

Il existe différents modes de séparation en chromatographie en phase liquide :

- l'adsorption
- le partage (80% des séparations)
- l'échange d'ions
- l'exclusion

Les trois premiers types utilisent la polarité des solutés pour les séparer.

d- Polarité de Chromatographie :

- **Polarité d'une molécule**

La polarité d'une molécule est une notion intrinsèque. Certaines molécules étant dissymétriques, les électrons ne sont pas uniformément répartis autour d'elles. De ce fait il existe un moment dipolaire permanent qui crée un champ électrique local. Ces molécules sont dites polaires.

• **Interactions entre molécules**



Dans la nature, les molécules ne sont pas isolées. Entre elles il existe différents types d'interactions :

- les interactions diélectriques ou ioniques
- les liaisons " hydrogène "
- les forces de Van Der Waals

• **Notion de polarisabilité**

Sur certaines molécules isolées qui ne possèdent pas de moment dipolaire permanent, un champ électrique peut créer un champ dipolaire induit, en déformant les orbites électroniques ou en modifiant la position relative des atomes. Ces molécules sont dites polarisables.

• **Application à la chromatographie**

Il existe des échelles de polarité, mais de manière on utilise la notion de polarité comme une donnée comparative entre molécules. On dit que tel composé est plus polaire ou moins polaire qu'un autre. De même on dit que la phase mobile et la phase stationnaire sont polaires, peu polaires ou apolaires.

Pour qu'il y ait séparation chromatographique de composés, il faut que leurs molécules interagissent de manières différentes avec au moins une des phases (stationnaire et mobile). Ces phases doivent avoir des polarités différentes.

On peut appliquer la règle "qui se ressemble s'assemble" à l'ensemble soluté - phase stationnaire.

- Si la phase stationnaire est polaire, les composés polaires seront plus retenus que les composés non polaires.
- Si la phase stationnaire est apolaire, les composés apolaires seront plus retenus que les composés polaires.

Polarité de phase

A l'origine, les colonnes étaient remplies de silice (phase stationnaire polaire). Elle doit sa polarité aux groupements silanols Si-OH qui sont polaires. Pour que la séparation soit efficace, la phase mobile doit alors être peu polaire. L'ensemble "phase stationnaire polaire et phase mobile peu polaire" forme la chromatographie à polarité de phase normale.

Par la suite, les particules de silice (support) ont été enrobées de paraffine en C 18 pour faire une phase apolaire. Dans ce cas, pour que la séparation soit efficace, la phase mobile est polaire (généralement à base d'eau). L'ensemble "phase stationnaire apolaire et phase mobile polaire" forme la chromatographie à polarité de phase inversée.

Aujourd'hui, les phases stationnaires sont greffées chimiquement pour la plupart sur de la silice sphérique et calibrée.

Composition de la phase mobile

Dans la pratique, chaque séparation nécessite une polarité de la phase mobile qui lui est propre. Chaque solvant ayant une polarité donnée, on ajuste la polarité globale de la phase mobile en mélangeant plusieurs solvants miscibles. A cette composition de phase mobile correspond une force éluante qui caractérise le pouvoir d'entraîner les solutés.

Il faut ajuster la force éluante en fonction des solutés à séparer. Pour cela, on peut utiliser un solvant pur ou un mélange de solvants : on dit travailler en mode isocratique.

Dans certains cas il est utile de faire varier la force éluante au cours de l'analyse. Si le mélange de différents solvants varie au cours de la séparation, on réalise alors un gradient d'élution, car la meilleure force éluante pour le début de l'analyse n'est pas forcément adaptée pour une bonne séparation des solutés sortant en fin de chromatogramme.

Ces 2 modes sont utilisés pour des analyses en chromatographie à polarité de phase normale ou inversée.

e- Appareillage :

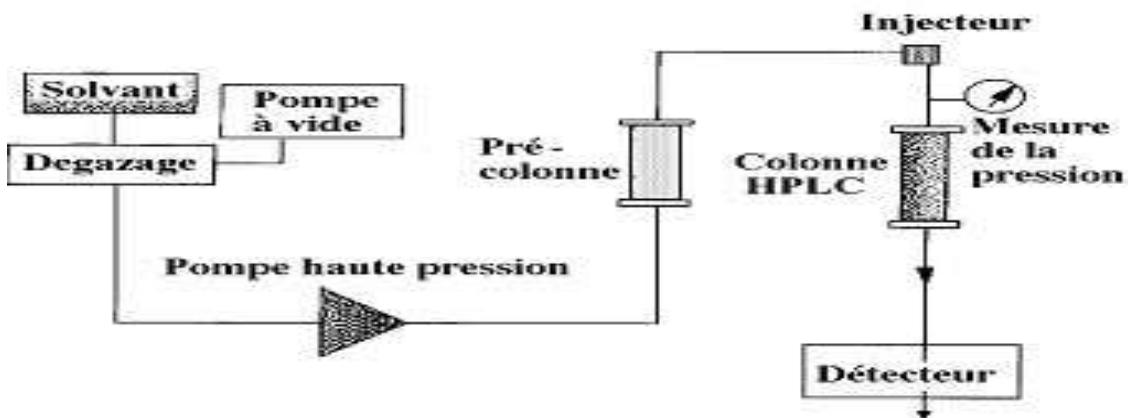


Figure 6 : Schéma décrivant le fonctionnement de l'HPLC

La phase mobile est pompée à partir d'une bouteille et parcourt en permanence le chromatographe : l'injecteur, la colonne dans le four et le détecteur. La température du four est maintenue constante.

Le signal du détecteur est amplifié et enregistré.

- **Réservoir de la phase mobile (solvant)**

Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. S'il est nécessaire le dégazage peut se faire par agitation puis conservation du solvant sous atmosphère d'hélium.

- **Pompe**

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux. Actuellement les paramètres d'une pompe sont

- * débit : 0,01 à 10 mL/min
- * stabilité < 1% (<0,2% pour des chromatographies d'exclusion diffusion)
- * pression maximale > 350 bars

Certaines sont pilotées par informatique (bien utile lors de l'utilisation de gradient d'élution).

- **Injecteur**

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 μ L...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne.

Vanne à boucle d'échantillonnage

Elle possède 2 positions. La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe (load), la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique (inject).

Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue.

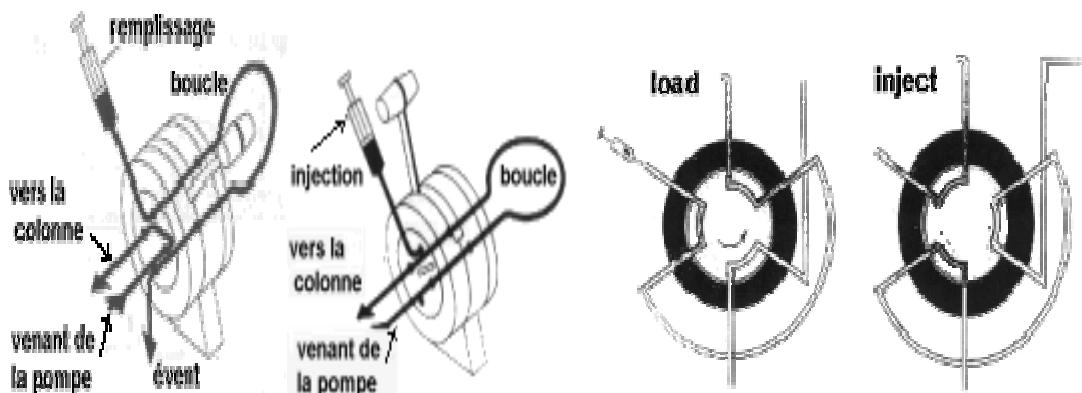


Figure 7 : Schéma décrivant le fonctionnement de l'injecteur

- **Colonne**

En mode analytique, les colonnes en inox ont généralement un diamètre interne de 4,6mm. La longueur est de 5, 10, 15, ou 25cm. Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) a une granulométrie de 3, 5, ou 10 μ m. Le diamètre interne d'une colonne est usuellement de 4 ou 4,6 mm. Si des substances pures doivent être collectées en fin de chromatogramme des colonnes de gros diamètre seront nécessaires.

- **Détecteur :**

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Pour détecter, on utilise différents phénomènes physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. Généralement, on compare le signal obtenu pour la phase mobile et le soluté à celui de la phase mobile seule.

Le détecteur le plus utilisé en HPLC est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne.

Il existe d'autres détecteurs :



- réfractomètre différentiel
- UV à barrette de diodes
- Electrochimique
- fluorimétrique...

Ainsi que différents types de couplage :

- Spectrométrie infrarouge
- Spectrométrie de masse
- Résonance Magnétique Nucléaire...

• **Intégrateur :**

La chromatographie est une méthode de séparation utilisée en vue d'un dosage. Il faut donc avant tout chercher à séparer correctement les pics avant de les intégrer. Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic.

La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de 2 paramètres :

- * la largeur attendue des pics
- * le seuil d'intégration (sensibilité)

La largeur de pic est à peu près prévisible en fonctions de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Elle détermine la fréquence d'échantillonnage du signal. Le pic est alors découpé en tranches. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic.

2- LA RIFAMPICINE

:

La RIFAPMPICINE a été découverte en 1959 dans un laboratoire à Milan par un groupe de chercheurs italiens, dirigé par le Dr Maria Teresa Timbal (1925-1969) et le professeur Piero Sensi (1920 -) analysant les bactéries dans un sol de la Côte d'Azur. La rifampicine est enregistrée au nom des deux.

- **Identification :**

1. DCI : Rifampicine
2. Classe pharmaco thérapeutique : Antibiotique antituberculeux
3. PM:823
4. Formule chimique : C43H38N4O12
5. Classe clinique : Dérivé semi synthétique de la rifamycine SV

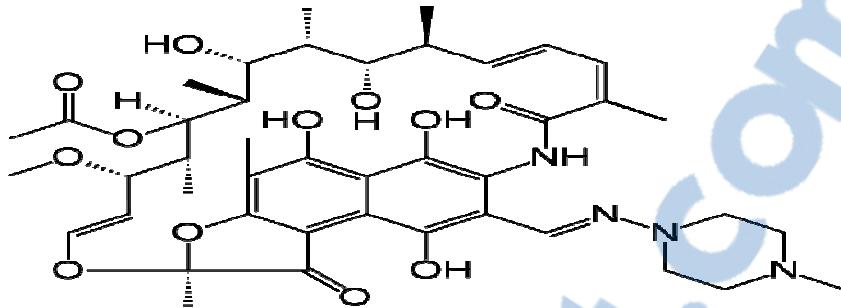


Figure 8 : la molécule de la RIFAMPICINE

C'est un antibiotique de la famille des rifamycines, utilisé habituellement dans le traitement de la tuberculose, ainsi que la prévention de la méningite bactérienne contagieuse.

- **Formes Galéniques et voies d'administration :**

- RIFADINE® : gélule à 300mg, suspension buvable à 2% et lyophilisat pour solution injectable à 600mg
- RIMACTANE® : gélule à 300mg

En association avec les antituberculeux majeurs, isoniazide et pyrazinamide(RIFANTER®) et isoniazide(RIFANAH®, comprimés)

Voie d'administration : orale ; intraveineuse

- **Indications, posologie et périodicité d'administration :**

- Indications :

- ❖ En association, traitement ou prophylaxie des tuberculoses pulmonaire et extra-pulmonaire
- ❖ Traitement des infections à mycobactéries atypiques.
- ❖ Seul ou en association, traitement de la lèpre ou de la brucellose.
- ❖ Prophylaxie des méningites à méningocoques
- ❖ En association, traitement des infections graves à bactéries GRAM positif ou GRAM négatif.

- Posologie et périodicité d'administration :

Traitements de la Tuberculose :

- Voie intraveineuse (une perfusion/J)
- Nouveau-né : 10mg /1kg/j
- Enfant (1mois_7ans): 15mg/kg/j
- Adulte : 10mg/kg/j
- Voie orale : (une prise/j)



- **Propriétés Pharmacodynamiques :**

Le Mode d'Action de la RIFAMPICINE est la formation d'un complexe stable avec la RNA polymérase des bactéries.

Elle agit en se liant à l'ARN polymérase des bactéries et en inhibant ainsi la transcription des ARN messagers.

- **Activité antibiotique :**

La **RIFAMPICINE** est très active sur :

- les bactéries à Gram positif : staphylocoques (*S. aureus* et *S. epidermidis*) et streptocoques (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*),
- certaines bactéries à Gram négatif : *N. meningitidis* et *H. influenzae*,
- des bactéries à multiplication intracellulaire : mycobactéries (complexe tuberculosis, *Mycobacteriumleprae*), *Legionellasp*, *Brucella* sp.

3- SUIVIE THERAPEUTIQUE DE LA RIFAMPICINE

a- **DEFINITION GENERALE DU SUIVIE THERAPEUTIQUE**

Appelé aussi monitoring thérapeutique, c'est une spécialité clinique pluridisciplinaire visant à améliorer la prise en charge du patient en ajustant individuellement la dose des médicaments pour lesquels le bénéfice clinique du suivi thérapeutique a été démontré dans la population générale ou dans la population particulière.

Il intervient dans le traitement des sujets à risque et pour les médicaments à intervalle thérapeutique étroit.

C'est une aide précieuse pour ajustement posologique dans les situations délicates.

Elle se base à l'hypothèse qu'il existe une relation entre la concentration sanguine et la réponse d'un médicament qu'il s'agisse d'un effet thérapeutique ou des manifestations toxiques.

b- **SUIVIE THERAPEUTIQUE DE LA RIFAMPICINE**

- **Justification du suivi thérapeutique pharmacologique**

Le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) est inutile en cas de tuberculose à germe sensible aux antibiotiques, chez des patients ne présentant pas de pathologie intercurrente.

Toutefois, si 2 mois après le début de la maladie, les cultures de bacille de Koch(BK), sont encore positives, le patient est «non répondeur » et le suivi devient nécessaire.

Dans les situations suivantes ou il existe un risque de **sous-dosage**, le suivi est utile afin de s'assurer que les concentrations sont efficaces:

- Infection à **MycobacteriumAvium**ou à germe multi résistant
- Méningite tuberculeuse



- Patients VIH positif chez lesquels existe une réduction de l'absorption gastro-intestinale des médicaments antituberculeux et où l'incidence d'infections à **MycobacteriumAvium** est plus élevée. De plus les antiprotéases peuvent entraîner une modification des concentrations plasmatiques de RIFAMPICINE.

Interactions médicamenteuses : administration concomitante d'antifongiques imidazoles (diminution des concentrations plasmatiques de RIFAMPICINE où pyrazinamide diminution de l'AUC de la RIFAMPICINE).

Suspicion de mauvaise observance :

Dans les situations suivantes où il existe un risque *d'accumulation* et d'apparition d'effets toxiques, le suivi est utile afin de s'assurer que les concentrations ne sont pas trop élevées :

- ✓ Dysfonctionnement hépatique
- ✓ Insuffisance Rénale
 - le suivi est également utile en cas de **pathologie grave associée**
 - Chez l'enfant, le STP serait nécessaire quelle que soit la situation clinique.
 - L'intérêt du STP dans les infections à germe de GRAM positif n'est pas connu
 - Pharmacocinétique :

➤ Absorption et biodisponibilité :

- Biodisponibilité à jeun : la biodisponibilité absolue est comprise entre 90 et 95% chez l'adulte. Chez l'enfant (3-36 mois), la biodisponibilité de la RIFAMPICINE ingérée sous forme de solution buvable est voisine de 50%, d'où la nécessité éventuelle d'ajustement posologique afin d'obtenir des concentrations plasmatiques comparables à celles obtenues après administration intraveineuse.

Après administration répétées, par voie orale, les concentrations maximales (Cmax) moyennes avoisinent 14 µg/ml et 18 µg/ml pour des prises uniques quotidiennes respectivement de 600mg et 900mg. Le délai d'obtention du pic (Tmax) est 1,62 ± 0,5 h pour une dose orale de 600mg, l'AUC est égale à 57,2 ± 13,4 µg/ml.

- Influence de l'alimentation : la résorption est retardée en présence d'aliments.
- Alimentation riche en hydrate de carbone : la Cmax est diminuée d'au moins 20% chez 33 à 56% des patients et le Tmax est allongé de 20% alors que l'AUC est peu modifiée.
- Alimentation riche en graisses : les travaux de Zent et Al. N'ont pas mis en évidence de différences significatives concernant les Cmax, Tmax et AUC lorsque la RIFAMPICINE est administrée à jeun ou avec un repas riche en graisses. Toutefois,



des travaux plus récents mentionnent une diminution de la Cmax de 36%, un doublement du Tmax et une AUC non modifiée.

- Effet du premier passage hépatique : un effet de premier passage hépatique a été mis en évidence. Cet effet est saturable dès que les doses sont >450mg, d'où une augmentation non-linéaire des concentrations plasmatiques en fonction des doses.

➤ Distribution :

la RIFAMPICINE est liée à 80% aux protéines plasmatiques, principalement à l'albumine.

Le volume de distribution ($V_d=1.16\text{ l/kg}$) traduit une bonne diffusion tissulaire. La RIFAMPICINE est présente à forte concentration (100 fois les taux sériques contemporains) dans la bile car elle subit un recyclage entérohépatique. Sa diffusion est faible dans l'os compact et plus importante dans l'os spongieux et la membrane synoviale. Elle diffuse bien dans le liquide pleural (les concentrations dans le liquide pleural sont bactéricides en cas de pleurésie) et le tissu pulmonaire. Sa bonne diffusion intracellulaire explique des concentrations intramacrophagiennes deux fois supérieures aux concentrations sériques.

Elle ne diffuse pas dans le LCR ($CLCR = 1/6$ concentrations sériques, soit $0.8-2.4\mu\text{g/ml}$). En cas d'inflammation, le passage dans le LCR pourrait garantir une efficacité en cas de méningite tuberculeuse.

Le passage placentaire est important. Les concentrations dans le sang du cordon sont voisines de 33 à 50% des concentrations sériques maternelles.

La RIFAMPICINE passe peu dans le lait maternel

➤ Elimination :

- a- Métabolisme : la Cl totale est de $200-300\text{ ml/min}$.

La demi-vie d'élimination plasmatique est de 1.5 à 3h.

La Rifampicine est un fort inducteur enzymatique hépatique puissant qui active son propre métabolisme.

Les concentrations sériques se stabilisent définitivement vers la deuxième semaine. Ceci touche d'avantage les concentrations résiduelles(6,8h) que la Cmax . L'auto induction métabolique existe quelle que soit la voie d'administration mais un métabolisme intestinal s'y rajoute après administration orale, signant la rôle du CYP3A à ce niveau

Au niveau hépatique, la RIFAMPICINE est fortement métabolisé sous l'influence du cytochrome P450 (CYP3A4). Elle est désacétylée en métabolites actifs : la désacétyl RIFAMPICINE, la 3-formyl-rifamycine et la rifampicine quinone. Elle existe également un métabolite secondaire : la N-déméthylrifampicine.

4- Choix et Validation d'une Méthode

Le but de la validation d'une méthode d'analyse est de démontrer qu'elle correspond à L'usage pour lequel elle est prévue.



Ensemble des opérations nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé.

a- Histoire de la validation analytique

La validation analytique est une vérification de la conformité des conditions d'exécution aux procédures, elle tient compte notamment des résultats obtenus avec les échantillons de contrôle. Les premières publications sur la validation analytique remontent à 1985, à la suite de rencontres entre l'industrie pharmaceutique américaine et les états unis d'Amériques.

Dès 1986, un premier texte officiel est publié dans le pharmacopoeial forum intitulé : « current concept for the validation of compendialassays ». En 1989, l'USP Convention (United State pharmacopoeial Convention) publie, dans son 9^{ème} supplément, « validation of compendialmethods, 1225 », texte officialisé dans cette même pharmacopée le 1^{er} janvier 1990.

En 1992, la SFSTP (société française des sciences et techniques pharmaceutiques) publie, dans STP pharma pratiques, un guide pour la validation analytique. Cette proposition a connu un succès beaucoup plus vaste puisqu'il présent les recommandations réglementaires communément admises et appliquées dans l'industrie pharmaceutique nationale et une démarche statistique pour la validation d'une procédure analytique.

Le sujet est ensuite repris par L'ICH (International Conference on Harmonisation) qui publie en 1994 un premier document sur les définitions, « Validation of analyticalprocedure : Terminology and definitions (Q2A) ». Cette publication est complétée en 1996 par une seconde publication (Q2B) expliquant comment on peut conduire une validation analytique « Validation of analyticalprocedure : Methodology ».

En 1996, Le laboratoire national de chimie (laboratory of the GovernmentChemist " LGC") a élaboré un guide pour la méthode interne de la validation, il comprend une discussion sur les exigences liées à l'accréditation de laboratoire.

En 2000, L'Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (Food and Drug Administration "FDA") a développé deux lignes directrices de l'industrie: un pour la validation des méthodes analytiques et l'autre pour la validation des méthodes bio-analytiques.

En 2005, "AOAC" INTERNATIONAL a publié un document technique pour la vérification des méthodes d'analyse pour l'accréditation ISO 17025.

b- Description d'une méthode d'analyse

- Schéma général représentant les principales étapes d'une analyse
- Définir une méthode d'analyse consiste à décrire chacune de ses étapes, indissociables les unes des autres, en précisant pour chacune d'elles les opérations élémentaires qu'il faut réaliser
- Il existe de très nombreuses méthodes de mesure. Le choix de l'une d'entre elles va guider le choix de la méthode de traitement qui sera préalablement appliquée à l'échantillon analytique (= prise d'essai)
- Le traitement de l'échantillon analytique constitue en règle générale l'étape clef de la méthode d'analyse : elle contient la majeure partie de l'erreur analytique et représente un facteur limitant en termes de rapidité et d'automatisation.



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.

On a pour habitude de regrouper ces opérations élémentaires en quelques étapes principales, telles qu'elles sont représentées sur la **figure 9** où il est rappelé que l'analyse chimique s'insère dans une procédure analytique et que celle-ci devra être également validée pour atteindre l'information chimique recherchée.

Pour la mesure, on dispose d'un très grand nombre de méthodes qu'on trouvera décrites dans des ouvrages généraux, des ouvrages consacrés à un domaine d'application particulier ou dans les très nombreux ouvrages, plus spécialisés, qui permettent d'approfondir l'étude de telle ou telle méthode. Mais il est important de remarquer ici que la méthode d'analyse correspond à une combinaison choisie des différentes étapes, que ces étapes sont interdépendantes et qu'il faut les prendre globalement en compte, s'il s'agit par exemple de valider la méthode.

La méthode choisie pour l'étape de traitement de l'échantillon analytique est en particulier étroitement liée au choix qui aura été fait pour la méthode de mesure et, si l'on est confronté au choix d'une méthode d'analyse, la réflexion devra donc simultanément porter sur ces 2 étapes, en ayant bien conscience du verrou que l'étape de traitement de l'échantillon constitue pour l'analyse.

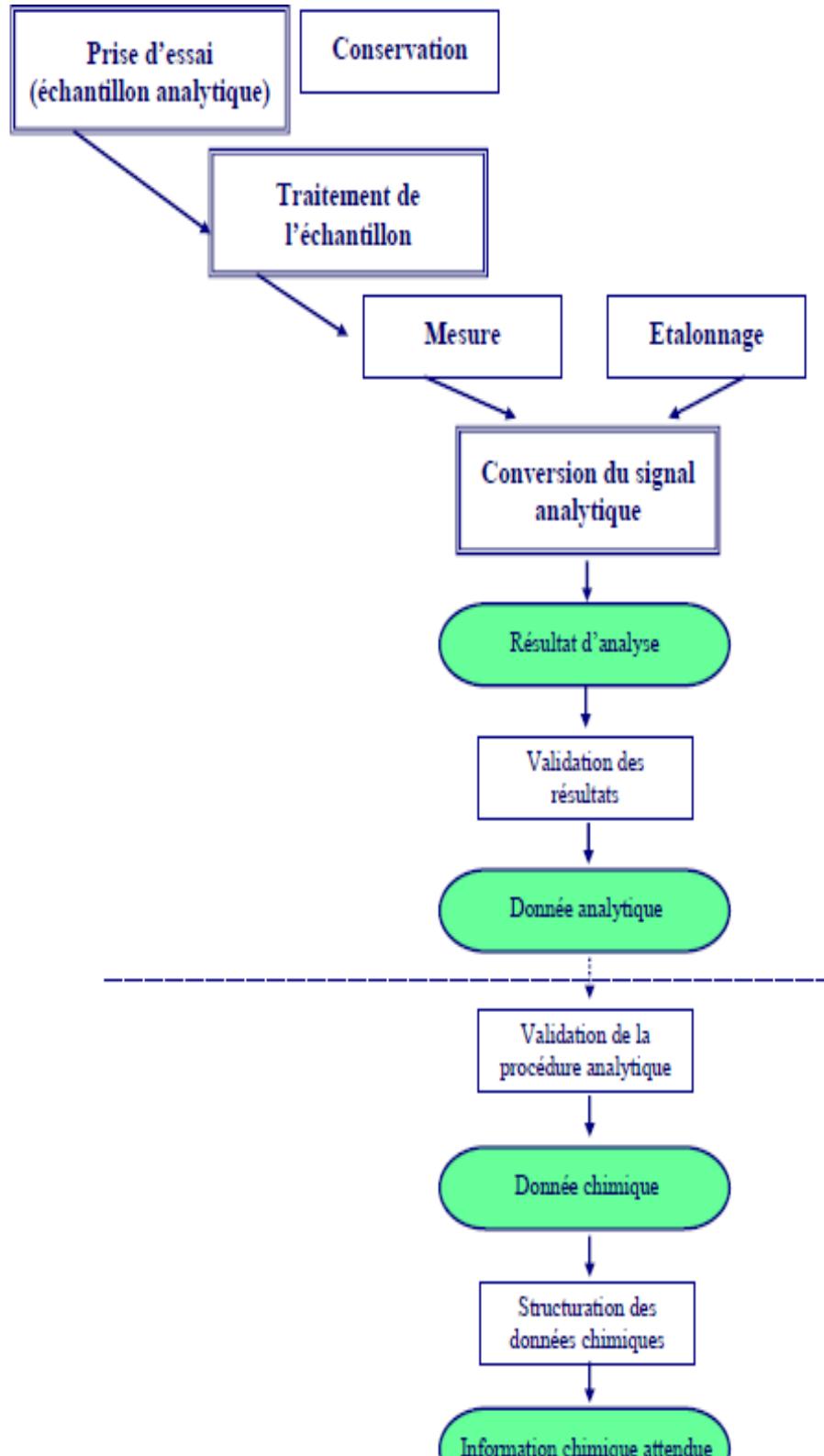


Figure 9 : les Etapes de la validation de méthode



c- Performances et critères de choix d'une méthode d'analyse

- Limites de détection et de quantification

La limite de détection d'une méthode d'analyse est la plus petite quantité d'analyte qui peut être détectée mais pas nécessairement quantifiée comme une valeur exacte

La limite de quantification est la Quantité la plus faible d'analyte dans un échantillon qui peut être déterminée quantitativement avec une fidélité et une exactitude appropriée

- Justesse ; exactitude et reproductibilité

Etroitesse d'accord entre la valeur trouvée et la valeur acceptée soit comme valeur conventionnellement vraie soit comme valeur de référence

La reproductibilité exprime la variabilité inter laboratoires (études collaboratives) habituellement appliquées à la standardisation de la méthodologie

- fidélité (répétabilité)

Etroitesse d'accord entre une série de mesures obtenues dans des conditions prescrites à partir de prises d'essais multiples provenant d'une même échantillon homogène

La répétabilité exprime la fidélité évaluée dans des conditions opératoires identiques et dans un court intervalle de temps

- Domaine de linéarité et sensibilité

Capacité dans un intervalle donné d'obtenir des résultats de dosage directement proportionnels à la concentration ou à la quantité d'analyte dans l'échantillon

- Robustesse

Capacité du protocole de rester non affectée par des variations faibles mais délibérément introduites dans les paramètres de la méthode; fournit une indication sur sa fiabilité dans des conditions normales d'utilisation



- Spécificité, rapidité et aptitude à l'automatisation

Capacité de la méthode de permettre une évaluation non équivoque de l'analyte en présence de composants qui sont susceptibles d'être présents

- Coût (investissement et fonctionnement)

Il est bien évident que rechercher l'exactitude du résultat aura un certain coût :

- Pouvoir disposer d'une méthode juste demandera un investissement non négligeable pour l'étudier, en vue de sa validation... ou alors on fera appel, si elle existe, à une méthode de référence qui ne sera pas forcément la mieux adaptée à l'environnement du laboratoire, si l'on doit en particulier effectuer de grandes séries d'analyses. Mais la justesse ne sera pas forcément une nécessité, si l'on peut se contenter de valeurs relatives destinées à être comparées entre elles dans le cadre d'une étude particulière menée au sein du laboratoire.

- De même, la répétabilité a un prix, qui se traduit le plus souvent dans l'achat de matériel de précision et d'instruments de mesure plus sophistiqués. Or cette recherche de la précision n'a souvent pour but que d'obtenir une variance attachée à la répétition des analyses telle que les effets qu'on veut mettre en évidence ne soient pas masqués.

C- Validation d'une méthode d'analyse

- Objectifs : avoir une méthode juste (sans biais) et connaître sa fidélité (répétabilité)
- Moyens : estimation puis élimination du biais de la méthode
- DEMARCHE
 1. Préparation d'un Echantillon de Référence Interne du Laboratoire (ERIL)
 2. Estimer le biais
- par rapport à une méthode de référence
- par rapport à un échantillon de référence
- au moyen d'une analyse inter-laboratoires
 3. Eliminer le biais ==> Recherche des causes d'erreurs
- éviter les erreurs liées à la réponse instrumentale
- S'affranchir des effets de matrice : méthode des ajouts dosés et des dilutions
- Optimiser la méthode de traitement de l'échantillon analytique.

Tout laboratoire, en particulier lorsqu'il doit pratiquer de grandes séries d'analyses, va choisir, en fonction des objectifs qui lui sont assignés et des moyens dont il dispose, sa propre méthode : ce n'est pas forcément une méthode de référence ou la méthode qui serait éventuellement retenue pour trancher, en cas de litige.

- **Objectifs d'un laboratoire d'analyse**



Pour choisir une méthode d'analyse, de nombreux critères devront être pris en compte, par exemple le nombre et la cadence des analyses qu'on va effectuer, la capacité d'investissement du laboratoire et les moyens humains dont il dispose, mais le but essentiel sera toujours de produire au moindre coût une donnée que personne ne puisse contester : un résultat d'analyse validé, appelé donnée analytique.

Atteindre cet objectif nécessite, d'une part, de s'assurer de l'exactitude de la méthode choisie, d'autre part, de réduire le nombre de répétitions des analyses destinées à produire une même donnée. Dans ce but, on va préparer un échantillon de référence du laboratoire qui sera utilisé tout d'abord pour étudier et valider la méthode puis, comme étalon, pour mettre en place un système de contrôle interne de la qualité des analyses.

- Principales étapes d'une validation

i. Préparation de l'échantillon de référence du laboratoire (ERL)

Cet échantillon doit représenter une "moyenne" des échantillons qui seront ultérieurement reçus par le laboratoire en vue d'une analyse, moyenne en ce qui concerne la teneur de l'analyte ou des analytes recherchés, moyenne aussi en ce qui concerne la composition de la matrice. S'il s'agit par exemple de mesurer une pollution des sols par les métaux lourds, on préparera l'échantillon de référence du laboratoire à partir d'un grand nombre d'échantillons prélevés sur différents sites plus ou moins pollués, à différents horizons ; ils seront broyés et intimement mélangés les uns aux autres pour obtenir un échantillon homogène, dont il faudra d'ailleurs tester l'homogénéité. On s'assurera ensuite des conditions de conservation de cet échantillon pour qu'il ne subisse pas de modifications dans l'espace (homogénéité) et dans le temps (contaminations, Réactions diverses, etc.).

ii. Estimation du biais de la méthode

Pour une méthode de référence qui est sensée donner le résultat juste T , on écrit qu'un résultat d'analyse x_i peut être modélisé sous la forme :

$$x_i = T + e_i \quad \text{où } e_i \text{ représente l'aléa expérimental.}$$

Il est bien évident qu'ayant choisi pour le laboratoire une méthode M différente de la méthode de référence, elle ne permettra d'atteindre, en répétant les analyses, qu'une valeur T_M qui contient certes le résultat juste mais en même temps, peut-être, un biais éventuel B_M propre à la méthode.

Le modèle devient donc alors :

$$x_i = T + B_M + e_i \quad (T_M = T + B_M) \quad (1)$$

Il est nécessaire d'évaluer ce biais pour l'éliminer si possible, ou du moins le corriger. En effet, en cas de litige commercial, voire juridique, c'est une méthode de référence ou, à défaut, toute autre méthode convenue entre les parties ou désignée par le tribunal qui sera réputée donner le résultat juste et donc retenue pour trancher.

Ainsi, connaître une méthode, la valider, n'est pas seulement mesurer sa fidélité à travers une estimation de l'écart-type, mais évaluer aussi sa justesse en appréciant son biais éventuel.

Le but de la validation ne sera pas ici, au moins dans un premier temps, de normaliser la méthode choisie pour en faire une méthode de référence mais de s'assurer que les données produites seront acceptées.

Comment évaluer le biais de sa méthode ? La première solution, immédiate si l'on dispose d'une méthode de référence, est de répéter celle-ci sur ERL pour déterminer T . Puis on répète les



analyses avec la méthode M pour obtenir TM : (TM - T) représente alors le biais de la méthode ; il est nul si la méthode est juste.

S'il n'existe pas de méthode de référence, une autre façon de procéder est de se procurer un matériau de référence certifié (MRC) auprès d'organismes tels que le NIST (National Institute of Standards and Technology) aux USA ou le BCR (Bureau Communautaire de Référence) en Europe.

On va rechercher un MRC pour lequel il existe bien sûr une valeur certifiée de la teneur en l'analyte qu'on souhaite déterminer, cette valeur théorique T_c – obtenue par consensus entre un ensemble de laboratoires – étant considérée comme conventionnellement vraie. Mais le MRC doit aussi présenter une matrice aussi proche que possible de ERL car on sait qu'un effet de matrice peut venir perturber la mesure de l'analyte. Enfin, s'il existe plusieurs MRC possibles, on choisira celui qu'on pense devoir être retenu en cas d'expertise. La recherche d'un MRC convenable sera facilitée par l'utilisation de banques de données, comme par exemple la banque COMAR développée en France par le BNM (Bureau National de Métrologie).

Ayant trouvé un MRC adapté, on lui applique n fois la méthode M pour déterminer une teneur moyenne M_T ainsi qu'une valeur estimée s_2 de la variance. On va ensuite comparer M_T à c_T , par un test de conformité, en calculant :

$$t_{obs} = \frac{|\bar{T}_M - T_c|}{\sqrt{\frac{s^2}{n}}} \quad (2)$$

On admettra, pour une probabilité choisie, que la méthode est juste si t_{obs} est supérieur à une certaine valeur $-\alpha$ 1t, par exemple 1,96 pour une probabilité $P = 1 - \alpha$ de 0,95.

En l'absence d'une méthode de référence ou d'un matériau de référence certifié, il reste encore possible de participer à une analyse inter-laboratoires qui utiliserait ERL ou un matériau de même nature.

Et enfin, en cas d'impossibilité, il sera toujours possible d'appliquer à ERL différentes méthodes d'analyse, de comparer les résultats entre eux et de les interpréter pour essayer de comprendre laquelle de ces méthodes pourrait être considérée comme donnant un résultat juste ; c'est par rapport à cette dernière qu'on mesurera le biais de la méthode M.

Si, à la suite de cette première étude, on constate que la méthode M choisie par le laboratoire présente un biais, on va essayer de l'éliminer en procédant à une recherche systématique des causes d'erreurs.

iii. Recherche des causes d'erreurs et corrections possibles

Cette recherche se fait dans l'ordre inverse de celui de la chronologie habituelle de l'analyse car on va partir du milieu de mesure le plus simple pour aller au plus compliqué. En effet, on s'intéresse tout d'abord, sur des étalons – le plus souvent des solutions étalons –, aux erreurs qu'on peut commettre dans l'interprétation du signal analytique puis, sur le milieu de mesure – dans la plupart des cas, une solution de mesure –, aux perturbations éventuelles du signal analytique par des effets de matrice ; on s'intéresse enfin à l'erreur que peut apporter l'étape de traitement de l'échantillon analytique. 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 est classique, par exemple, en spectrométrie d'absorption atomique, d'utiliser un étalon externe de concentration CE dont on mesure



périodiquement le signal SE pour calculer ensuite, par une simple règle de trois que propose tous les logiciels, la concentration CM d'une solution de mesure donnant un signal SM :

$$C_M = S_M \cdot \frac{C_E}{S_E} \quad (3)$$

Cette façon de faire suppose bien entendu qu'il existe une relation linéaire entre signal et concentration. Or chacun sait que le domaine de linéarité de la méthode de mesure, peut être très restreint, particulièrement dans le cas d'une atomisation électrothermique. Il s'agit donc en premier lieu d'avoir parfaitement déterminé le domaine de linéarité de la méthode pour l'analyte considéré. C'est seulement après qu'on construit, dans ce domaine, la droite d'étalonnage ; ces deux opérations sont réalisées successivement, indépendamment l'une de l'autre, car il est facile de montrer que la meilleure détermination de la pente de la droite d'étalonnage passe par une répétition des mesures mais à deux niveaux de concentration seulement, choisis aux bornes du domaine de linéarité. Malheureusement on constate que, pour déterminer les paramètres a_0 et a_1 de la droite d'étalonnage $S = a_0 + a_1 C$ représentée sur la figure 5, on se contente trop souvent d'effectuer une régression linéaire simple du signal analytique mesuré sur la concentration des solutions étalons. Or il est connu qu'en effectuant une régression aux moindres carrés pour calculer les coefficients a_0 et a_1 du modèle, la pente a_1 de la droite étant par définition la sensibilité de la méthode d'analyse dans son domaine de linéarité, la variance estimée de a_1 est :

$$s^2(a_1) = \frac{s_r^2}{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2} \quad (4)$$

expression dans laquelle s_r^2 représente la variance résiduelle, C_i la concentration de la solution étalon (i) et \bar{C} la moyenne des concentrations des solutions utilisées. Si S_i représente le signal analytique mesuré pour la concentration C_i et \hat{S}_i la valeur prédicta par le modèle, c'est-à-dire par la droite d'étalonnage, pour la même concentration :

$$s_r^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (S_i - \hat{S}_i)^2}{n-2} \quad (5)$$

On voit bien sur la formule (4) que, pour diminuer la variance sur l'estimation de a_1 , il faut rendre le plus grand possible le dénominateur, ce qui veut dire choisir C_i le plus éloigné possible de \bar{C} ; \bar{C} représentant le centre du domaine de linéarité (la valeur moyenne des C_i), on aura donc intérêt à choisir des concentrations situées aux bornes de ce même domaine. Cela peut être aussi démontré de façon plus générale, lorsqu'on s'intéresse à l'organisation optimale de la collecte des données.



PARTIE PRATIQUE

A-

MATERIEL ET

METHODES :

OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Cette procédure décrit la technique de dosage chromatographique de la RIFAMPICINE. Elle concerne les techniciens, les attachés, les internes, les biologistes du laboratoire de pharmacologie.

MATERIEL



- **LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE**



Figure 11 : l'HPLC SHIMADZU/DAD

La chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), mais on trouve plus fréquemment l'abréviation anglaise HPLC (*high performance liquid chromatography*) depuis les années 1990, est une technique de séparation analytique en fonction de l'hydrophobicité et préparatrice des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. Pour certains, HP signifie « haute pression ».

- **Principe :**

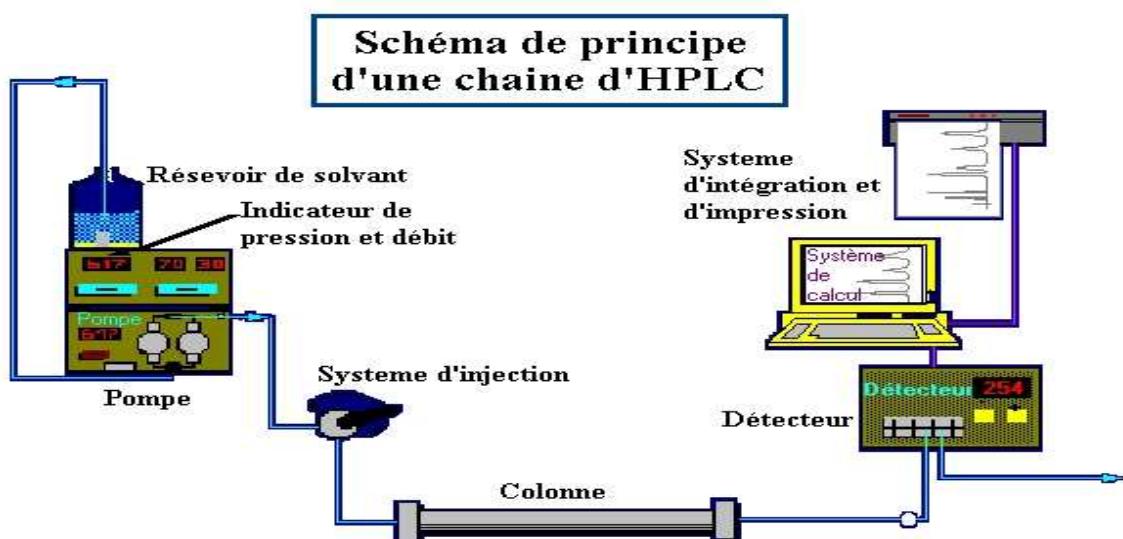




Figure 12 : schéma décrivant le principe de fonctionnement de l'HPLC

L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelée phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie (les « grains » sont de très petite taille). Le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système. Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. En effet, pour un même volume de phase stationnaire la surface d'échange augmente si les « grains » qui la composent sont de diamètre plus petit. Les pics obtenus sont plus étroits donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés, on peut donc bien les différencier), le seuil de détection est également plus bas (des pics étroits et hauts sont plus faciles à isoler du bruit de fond que des pics larges et bas).

La combinaison de ces attributs - rapidité et résolution élevées - conduit à l'appellation « haute performance ».

Les solvants utilisés sont des combinaisons miscibles d'eau et de divers liquides organiques (alcools, acétonitrile, dichlorométhane...).

Souvent, la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'analyse, c'est le mode dit « gradient » ou « élution graduée » (en opposition au mode « isocratique », pour lequel la composition de la phase mobile reste la même tout au long de l'analyse). Par exemple, sur une colonne apolaire, en utilisant un mélange eau/méthanol comme phase mobile, les composants les plus hydrophobes sont élus avec une concentration élevée en méthanol alors que les composants plus hydrophiles sont élus préférentiellement avec une concentration faible en méthanol. Selon la nature de la phase stationnaire, on commencera par une concentration élevée en méthanol ou le contraire.

- Appareillage et Fonctionnement :

a- Pompe :

C'est la partie qui sert à stocker l'éluant et à l'injecter sous pression dans la colonne. Elle est composée de :

- Deux pistons alternatifs
- Réservoirs de phase mobile
- Électrovannes
- Amortisseur de pulsations
- Système de purge et d'amorçage
- Capteur de pression
- On utilise une pompe pour une élution isocratique ou plusieurs pour une élution par gradient.



b- Injecteur :

Des tubes en acier inoxydable, en Teflon, en PEEK ou en silice fondu permettent de relier la ou les pompes à l'injecteur chromatographique. Il y a plusieurs types d'injecteurs :

- Boucle d'injection : permet la répétabilité du volume d'injection
- Injecteur seringue
- Extraction sur phase solide en ligne

c- Colonne :

Elle dépend du type de chromatographie en phase liquide que l'on veut faire et donc de la nature et du nombre de composés que l'on veut séparer. Il peut y avoir plusieurs colonnes parallèles. Il y a donc plusieurs types de chromatographies en phase liquide :

- *CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION* :

Dans cette chromatographie, la phase stationnaire consiste en une matière solide à grand pouvoir d'adsorption, tel que l'oxyde d'aluminium, les silicates de magnésium, les gels de silice.

Les composants sont simplement plus ou moins retenus à la surface de la phase stationnaire par adsorption physique. C'est une technique qui prend en compte la polarité des composants.

- *CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE* :

Dans cette chromatographie les analytes sont séparés en fonction de leur affinité avec les phases stationnaire et mobile. L'affinité dépend de la polarité des analytes et des phases. En mode normal la phase stationnaire est polaire, en mode inverse elle est apolaire. Il y a deux types de chromatographie de partage :

- ✓ *liquide - liquide* : la phase stationnaire consiste en une très fine couche de liquide répartie par adsorption physique à la surface du matériau support le plus inerte possible. Les composants sont séparés comme dans une extraction liquide-liquide, sauf que la répartition des composants se fait lors du passage dans la phase liquide et non par agitation.
- ✓ *liquide - solide ou liquide - phase greffée* : la phase stationnaire consiste en une espèce organique liée par des liaisons chimiques à la surface des particules du matériau support

- *CHROMATOGRAPHIE PAR ECHANGES D'IONS* :

La phase solide est une résine insoluble munie de groupes fonctionnels capable de dissocier. Ce sont, habituellement, des groupes « acide sulfonique » (SO_3H) pour les échangeurs de cations et « ammonium quaternaire » ($\text{N}(\text{R})_3$) pour les échangeurs d'anions.

- *CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION SÉRIQUE* :

Les composants sont séparés selon leur dimension moléculaire. La phase stationnaire est composée d'un matériau poreux (petites particules de silice ou de polymères), les molécules dont le diamètre



est supérieur à celui des pores ne peuvent pénétrer et ne sont pas retenues. La durée de séjour dans la colonne augmente lorsque la taille des analytes diminue.

- **CHROMATOGRAPHIE CHIRALE :**

Cette technique de chromatographie consiste en la formation de liaisons non covalentes entre les énantiomères du substrat et l'absorbant chromatographique chiral donnant des complexes diastéréoisomères ayant des affinités de liaisons différentes. Elle sert donc en particulier à séparer des énantiomères.

d- DéTECTEUR :

Il existe plusieurs types de détecteurs :

- DéTECTEUR à absorption UV ou visible
- DéTECTEUR à indice de réfraction
- DéTECTEUR UV à barrette de diodes (DAD)
- DéTECTEUR à fluorescence
- DéTECTEUR de type spectromètre de masse (MS)
- DéTECTEUR évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL)
- DéTECTEUR électro-chimique (DEC)

e- DifféRENTES phases stationnaires :

- Phase Normale :

- Les colonnes en phase normale sont des colonnes dont la phase stationnaire est polaire et acide.
- La phase normale la plus utilisée est à base de gel de silice : à sa surface se trouvent des groupes silanols (-OH) et des groupes siloxanes (-O-). Ces groupes permettent à la silice de retenir les composés à analyser par des liaisons hydrogènes.
- Cette phase sert ainsi principalement à séparer des composés polaires.

- Phase Inverse :

La base d'une phase inverse est une phase normale sur laquelle des chaînes alkyles (ou autres selon la polarité recherchée) ont été greffées au niveau des groupes silanols (*end-capping*). En général, la phase stationnaire est majoritairement composée de petites particules de silice sur lesquelles on a greffé des fonctions chimiques, le plus souvent de chaînes alkyles à 8 ou 18 atomes de carbones. Les fonctions silanols (Si-OH) qui subsistent engendrent des interactions hydrophiles parasites, qui rendent les résultats non reproductibles surtout pour les molécules basiques. Pour éviter cela, la surface de la silice est généralement recouverte par une fonction méthyle et les fonctions silanols ne sont plus libres mais sous la forme (Si-O-CH₃), c'est cette étape que l'on appelle « *end-capping* ».

Les fonctions chimiques utilisées pour le *end-capping* peuvent toutefois être de nature très diverses et les colonnes de dernières générations résistant à des pH extrêmes sont généralement *end-capped* avec des fonctions proposant un plus grand gène stérique, tel que le tert-butyle (Si-O-C(CH₃)₃).

- Selon le taux de greffage, on obtient une plus ou moins grande résolution.
- Cette phase stationnaire est dite « inverse » car de polaire et hydrophile (sans les « greffes »), la phase devient apolaire et hydrophobe.

- **Description de la Chromatographie Liquide A Haute Performance Shimadzu DAD :**

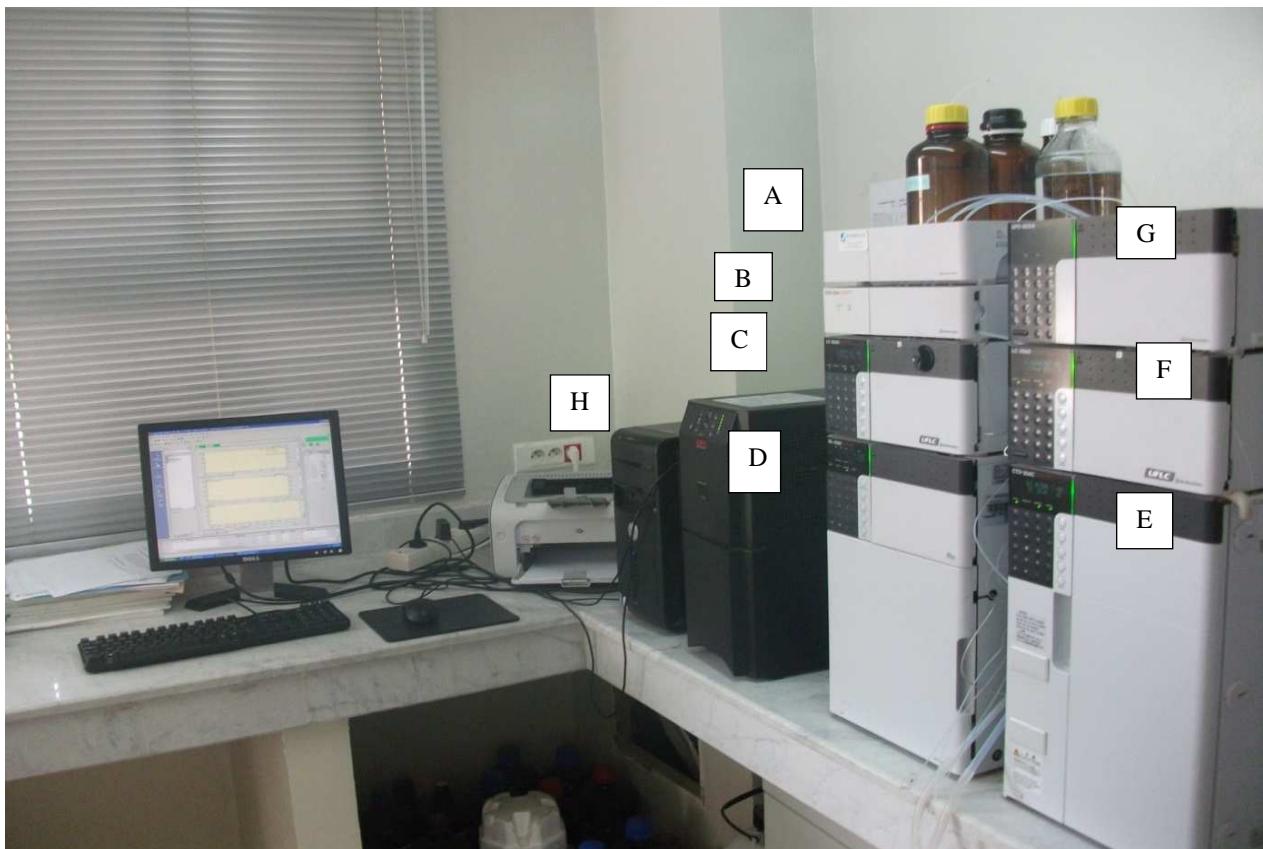


Figure 13 : description de l'HPLC SHIMADZU/DAD au laboratoire des analyses

- A : Solvants de la phase Mobile
- B : Dégazeur
- C : Pompe Quatéraire 1
- D : Injecteur automatique
- E : Colonne
- F : Pompe Quatéraire 2
- G : Detecteur : UV (D2) / Visible (W)
- H : Ordinateur qui contient le logiciel enregistreur



- **Produits :**

1. Rifampicine 1mg/ml (dans le méthanol) SM

5mg de la poudre RIFAMPICINE dans 5ml du méthanol

2. Solution de travail (10 μ g/ml) :

50 μ g de SM dans 4950 μ L de méthanol

3. Flacons d'injection de GC ou de l'AS100

- **Phase mobile :**

Mélange tampon phosphate SYMMETRY et acétonitrile 50/50

Acétonitrile pour HPLC

Tampon phosphate SYMMETRY:50mM, pH: 3.5

6g de NaH₂PO₄ anhydre dans 1 litre d'eau bi-distillé

On utilise l'Acide ortho phosphorique (H₃PO₄) pour ajuster le ph à 3.5

- **Pré colonne :**

SYMMETRY C18 WATERS



Figure 14 : pré-colonne SYMMETRY C18 WATERS

Il présente une meilleure finesse des pics

- **Colonne :**

SYMMETRY C8 WATERS (250x4.6)



Les colonnes Symmetry s'imposent toujours comme référence en matière de reproductibilité pour l'analyse des médicaments par HPLC, garantissent ainsi la conformité à long terme de vos méthodes chromatographiques.



Figure 15 : COLONNE C8 WATERS

- **Détecteur :**

Model : SPD_M20A

LAMP : D2(UV) & W(Visible)

Multi longueur d'ondes : 190 → 380 nm

PREPARATION DES ECHANTILLONS

- **Standards**

Dans des tubes Eppendorf® de 1.5ml mettre :

	Standards (µg/ml)			
	20	10	5	2.5
ST (ml)	400	200	100	50
Nacl 0.9% (ml)	200	200	200	200
Méthanol (ml)	_____	200	300	350

Tableau 1 : Préparations des standards

- **Traitements (sérum, patients et standards)**

- 200µL de sérum patient + 400µL de Méthanol
- Agiter tous les tubes 15 secondes au vortex
- Laisser au repos pendant 10 minutes
- Centrifuger 4 minutes à 10 000 tours/min



- Récupérer le surnageant dans les flacons pour injection dans la HPLC
SHIMADZU/DAD

CONDITIONNEMENT DE L'ANALYSE :

- TOTAL FLOW : 1.000ml/min
- INJECTION VOLUME : 50 µl
- Pump A pressure : 110 bar
- Pump B Pressure : 107 bar
- OvenTemperature : 30.0°C
- Cooler Temperature : 15.8°C
- Room Temperature : 22.1°C



B- RESULTATS ET DISCUSSION :

1- Optimisation de la méthode analytique:

Dans cette étape on a changé le mélange de la phase mobile dans la méthode proposée (45% acétonitrile, 55% tampon phosphate SYMMETRY « 50mM, pH : 3.5 ») à (50%acétonitrile , 50% tampon Phosphate SYMMETRY« 50mM, pH : 3.5 »), Après le dosage Il s'est devenu clair que ces caractéristiques sont les plus compatible a notre dosage. On a eu de très bons résultats, sans aucune impureté, ni aucune interférence et une meilleur séparation et identification des pics.

On a choisi la colonne SYMMETRY C18 WATERS qui est disponible au marché et peut doser certains autres médicaments que la RIFAMPICINE.

On a gardé la valeur du pH à 3.5 pour maintenir et prolonger la durée de vie de la colonne.

On a gardé l'acétonitrile car il présente l'avantage d'une plus faible viscosité et d'une meilleure transparence dans l'UV. Le débit 1ml/min permet d'éluer la RIFAMPICINE à un temps de rétention plus court (4.7min) que celui de 0.7ml/min dont le temps de rétention a été (11.5min).

En ce qui concerne la longueur d'onde : la RIFAMPICINE n'existe pas dans la bibliothèque des résultats, donc on ne savait pas à quelle lumière notre médicament absorbe, donc on a fait un balayage de 190nm à 380nm.

Voilà le chromatogramme de balayage des spectres :

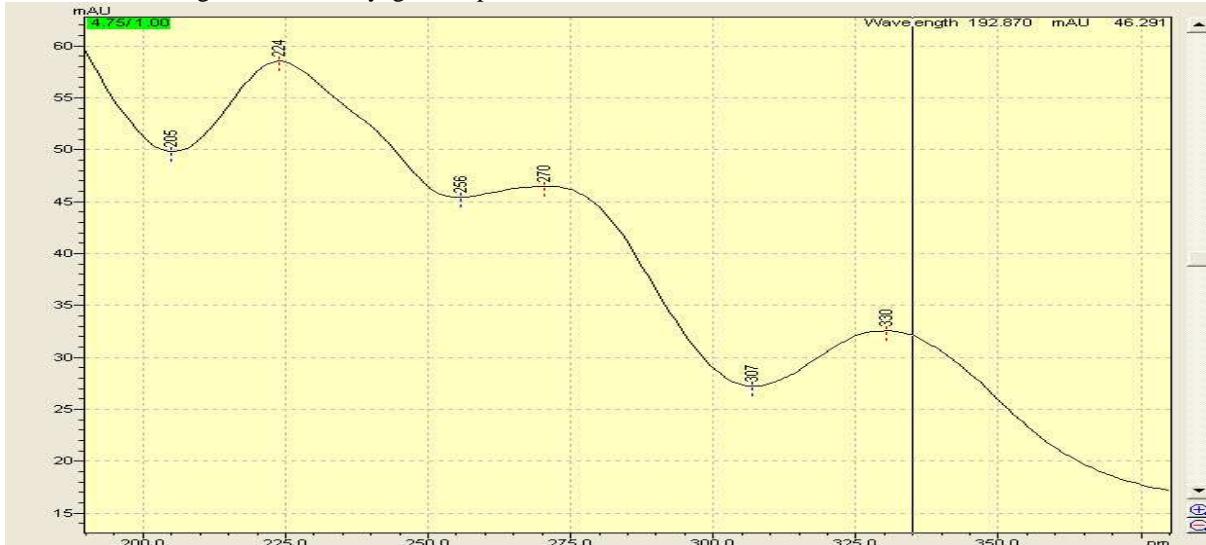


Figure 16 : Chromatogramme de balayage de longueurs d'ondes

A partir du chromatogramme nous pouvons apercevoir que le pic de la molécule RIFAMPICINE apparu aux longueurs d'ondes suivantes : 224nm ; 270nm et 335nm, mais pour les longueurs d'ondes : 224nm et 270nm il y a un risque d'interférence avec des molécules non-spécifiques dans le sérum et on a trouvé que la RIFAMPICINE peut être détectée clairement à 335nm sans aucune interférence.



Pour la Pureté du



Figure 17 : Chromatogramme de pureté du pic de la RIFAMPICINE

--- pic de la RIFAMPICINE

--- courbe de pureté

--- ligne de zéro

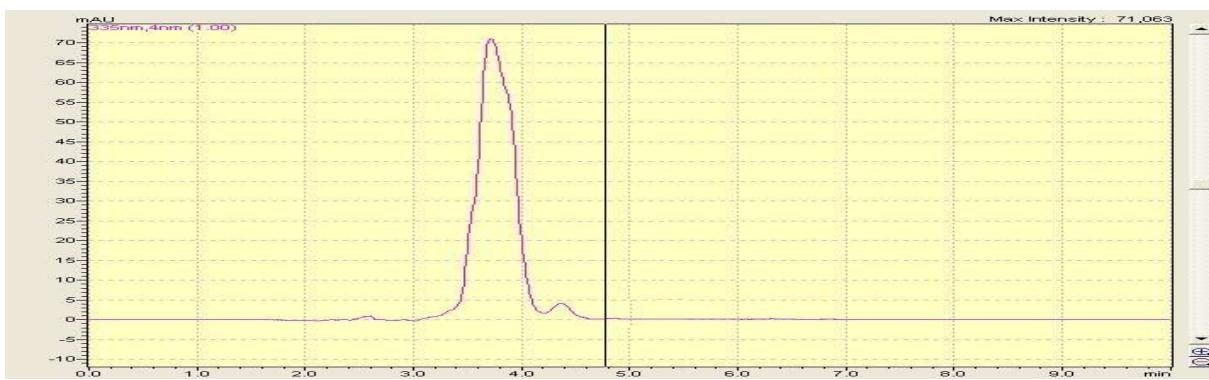
Depuis ce chromatogramme on remarque que la courbe de pureté se colle à la ligne du zéro: alors il ne y a pas d'impuretés détecté et l'index de la pureté du pic a une valeur qui tend vers « 1 »(Index= 0.999999) Alors on trouve que la RIFAMPICINE est détectée sans aucune impureté.

2- Validation de la méthode analytique :

Les résultats de la validation de la méthode optimisée sont évalués selon les critères suivants :

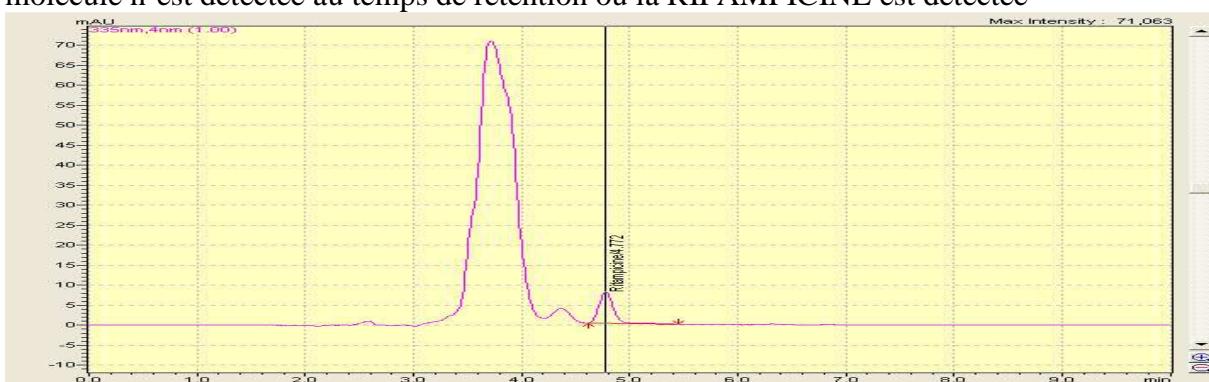
❖ Spécificité /Sélectivité :

Le chromatogramme suivant montre qu'il y a aucune interférence avec la molécule au temps de rétention de la RIFAMPICINE (4.7)



- 0 min → 3 min : temps mort
- 3 min → 4.3 : molécules non-spécifiques

Le dosage du blanc (qui ne contient pas la molécule de la RIFAMPICINE) montre que aucune molécule n'est détectée au temps de rétention ou la RIFAMPICINE est détectée



- 0 min → 3min : temps mort
- 3 min → 4.3 : molécules non-spécifique
- 4.5 min → 5 min : pic de la RIFAMPICINE

Ici on remarque que la RIFAMPICINE est détectée au temps de rétention 4.7 sans aucune interférence.

Alors on peut conclure que le pic de la RIFAMPICINE est bien spécifique et sélective.

❖ Linéarité :

Les résultats de la linéarité sont détaillés dans le tableau suivant, la courbe d'étalonnage présentée dans la figure démontre la moyenne des 3 mesures pour chaque point (quatre points), on a utilisé la concentration en fonction de l'aire de pic.



Tableau 2 : résultats de la linéarité

R^2 : Coefficient de corrélation ; CV : coefficient de variation ; Vo : valeur observée

Courbe de calibration	Pente	Origine	R^2	Concentration théorique $\mu\text{g/ml}$							
				2.5		5		10		20	
				Vo	Biais %	Vo.	Biais %	Vo.	Biais %	Vo.	Biais %
1	0,00003	0,2552	0,9998	2.500	0	5.000	0	10.0264	0,264	20.0904	0,452
2	0,00003	0,3256	0,9998	2.500	0	5.0668	1,336	9.7499	-2,501	19.1646	-4,177
3	0,00003	0,1557	0,9998	2.500	0	5.0876	1,752	9.6294	-3,706	19.4982	-2,509
Moyenne	0,00003	0,2445	0,9998	2.500		5.051466		9.8019		19.5844	
Ecart type	0,00000	0,069706	0,0000	0,0000		0,037372		0,166738		0,382839	
CV %	0,00000	28.5096	0,0000	0,0000		0,73982		1,0108		1,9548	
Biais %				0		1.02932		-1,981		-2,078	
Justesse%				100		98,97077		98,019		97,922	

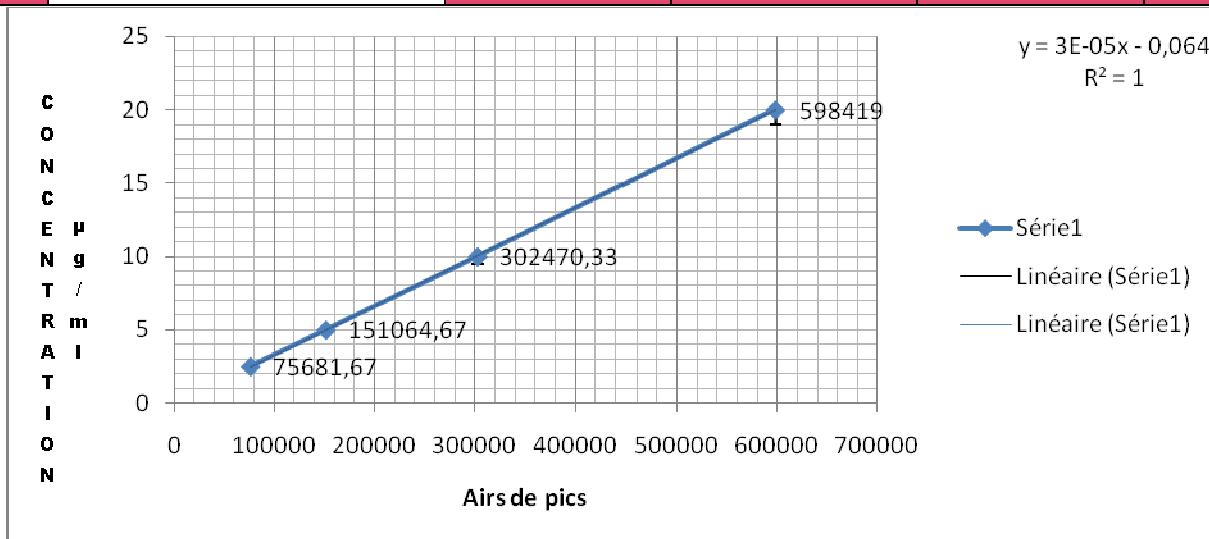


Figure 20 : Courbe d'étalonnage de linéarité (concentration en fonction d'aire de pic)

Les résultats obtenus démontrent une bonne linéarité : $Y = 0,00003X - 0,0647$ avec un coefficient de corrélation qui est égale à 1 ($R^2 = 1$).

❖ La fidélité : Répétabilité

Les procédés de fidélité sont déterminés à partir des valeurs intra-jour pour la Rifampicine. On les résume dans le tableau suivant :

Répétabilité



Niveaux (µg/ml)	Aire	Vo (µg/ml)	Biais %
2.5	73052	2.500	0.00
2.5	79145	2.500	0.00
2.5	74848	2.500	0.00
Moyenne	75681,67	2,500	0.00
Ecart type	2510.5766	0.00	
CV%	3.31728	0.00	
Justesse%			100
5	147729	5.000	0
5	151731	5.0668	1.336
5	153734	5.0876	1.752
Moyenne	151064,67	5.051466	1.02932
SD	2496.3982	0,037372	
CV%	1.65253	0.73982	
Justesse%			98,9725
10	316164	10.0264	0.264
10	299948	9.7499	-2.501
10	291299	9.6294	-3.706
Moyenne	302470,33	9.8019	-1.981
SD	10306.589	0.166738	
CV%	3.407	1,0108	
Justesse%			98,019
20	630720	20.0904	0,452
20	580192	19.1646	-4.177
20	584345	19.4982	-2.509
Moyenne	598419	19.5844	-2.078
SD	22903.097	0.382839	
CV%	3.82726	1.9548	
Justesse%			97.922

Tableau 3 : Résultats de la Répétabilité

La répétabilité est évaluée par le calcul du coefficient de variation. Ce dernier est inférieur à 20% confirmant que la méthode est répétable et bien précise.

❖ **Justesse :**

La justesse d'une méthode est déduite après avoir établi, la linéarité, la fidélité et la spécificité de la méthode, elle est déterminée par le calcul du biais% et du justesse%.

$$\text{Justesse} = 100 - | \text{Biais} (\%) |$$

$$\text{Biais} = \frac{V_o - V_s}{V_s} \quad \text{avec} \quad V_o : \text{moyenne des valeurs observées; } V_s : \text{valeur suggérée.}$$

La valeur moyenne de Biais % (inférieur à 20%) et de justesse % (supérieur à 80%) ont montré que la méthode est bien juste.

❖ **Limite de Détection / Limite de Quantification :**

On les a estimés en tenant compte la droite de régression $y = ax + b$, en traçant les concentrations théoriques en fonction de la moyenne des concentrations observées.

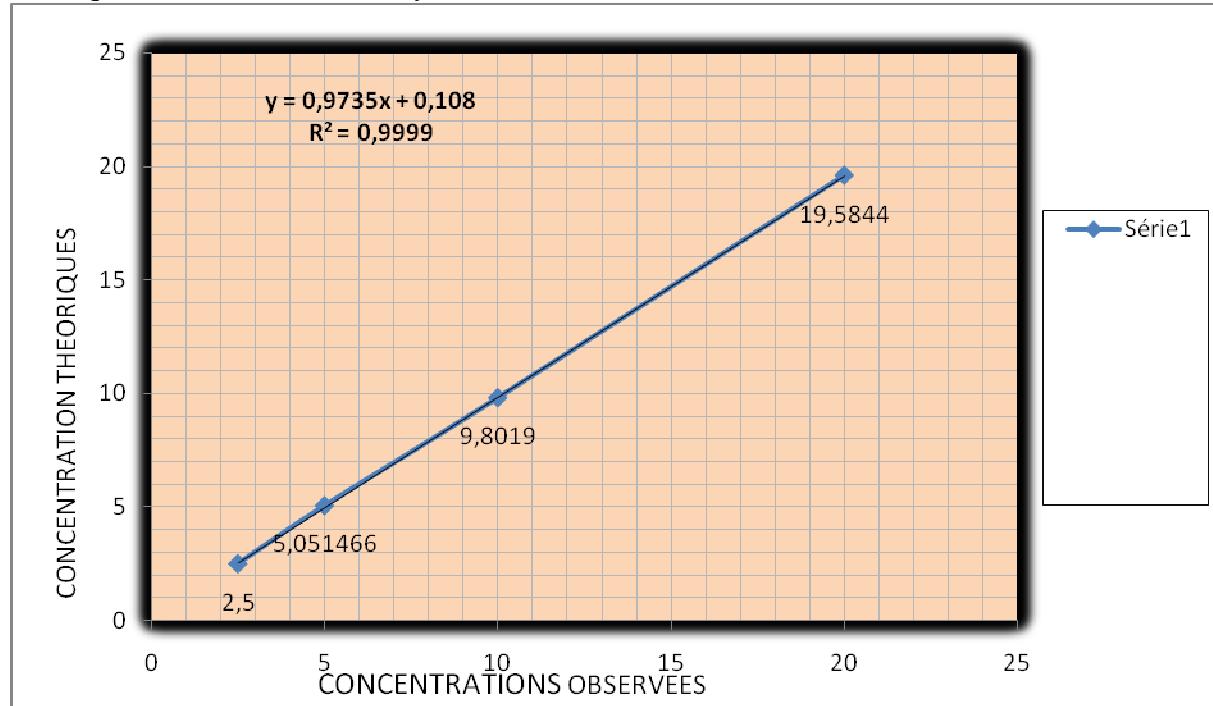


Figure 21 : Droite de régression (concentration théorique en fonction de concentration observée)

$$LDD = \frac{(b + (3 \times Sb))}{a} ; \quad LDD = 0.922484 \mu\text{g/ml}$$

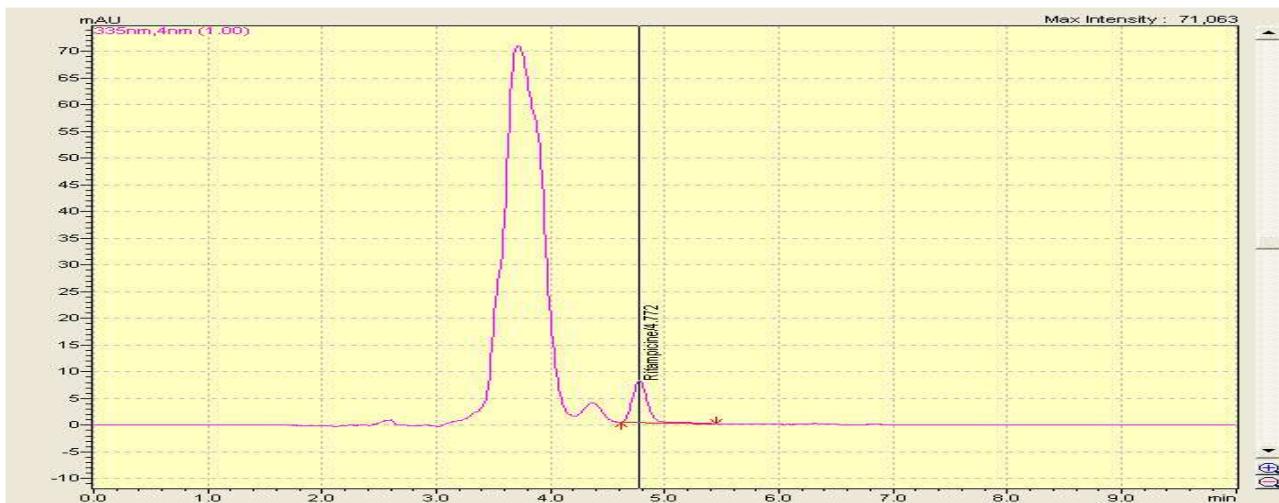
$$LDQ = \frac{(b + (10 \times Sb))}{a} ; \quad LDQ = 2.816088 \mu\text{g/ml}$$

Ces résultats peuvent que des petites concentrations de la molécule RIFAMPICINE peuvent être analysé.

3- DOSAGE DE LA RIFAMPICINE :

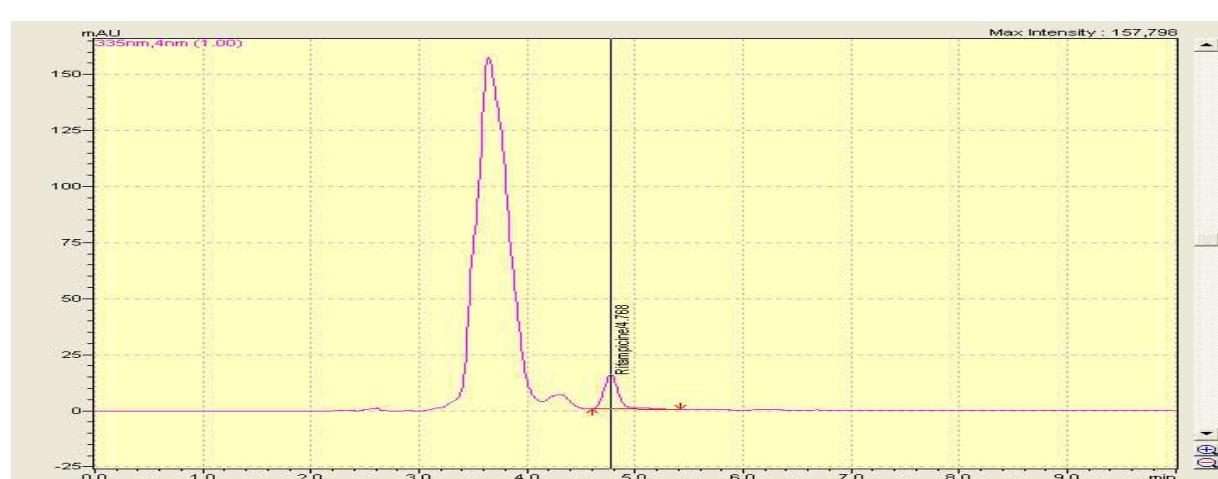
Les figures suivantes présentent les chromatogrammes des dosages du principe actif de la RIFAMPICINE à différentes concentrations :

- Rif 2.5 :



On Observe que le pic de la RIFAMPICINE apparaisse à TR : 4.772 avec un air de pic : 73052 ce qui traduit la concentration 2.5 µg/ml

- Rif 5 :



On Observe que le pic de la RIFAMPICINE apparaisse à TR : 4.78 avec un air de pic : 151731 ce qui traduit la concentration 5 µg/ml

- Rif 10 :

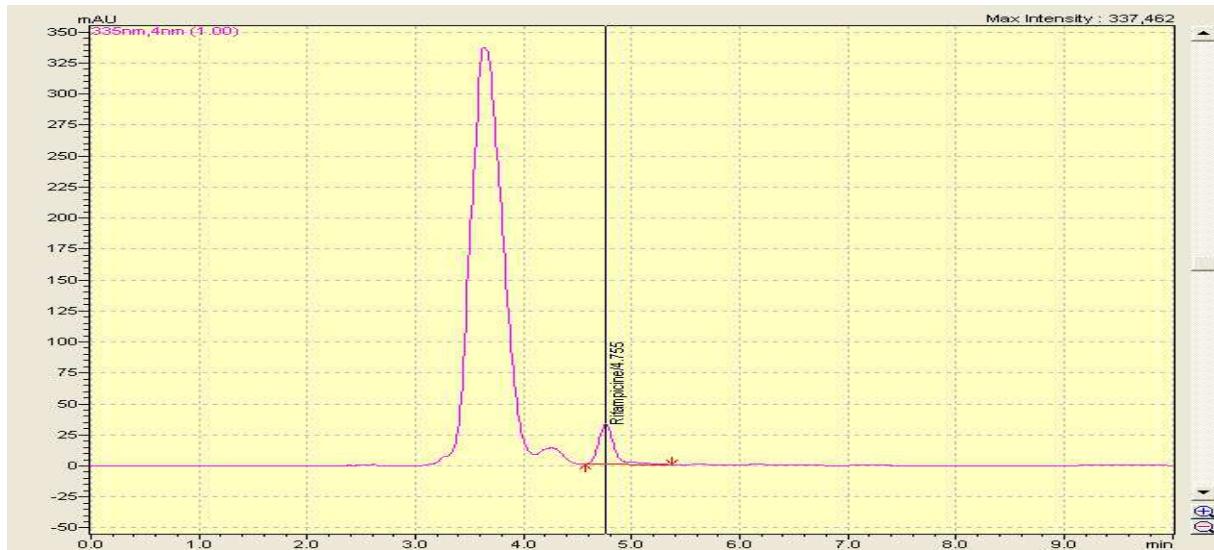


Figure 24 : CHROMATOGRAMME DU DOSAGE PLASMATIQUE DE LA RIFAMPICINE (10)

On observe que le pic de la RIFAMPICINE apparaisse à TR : 4.755 avec un air de pic : 73052 ce qui traduit la concentration 10 µg/ml

- Rif 20 :

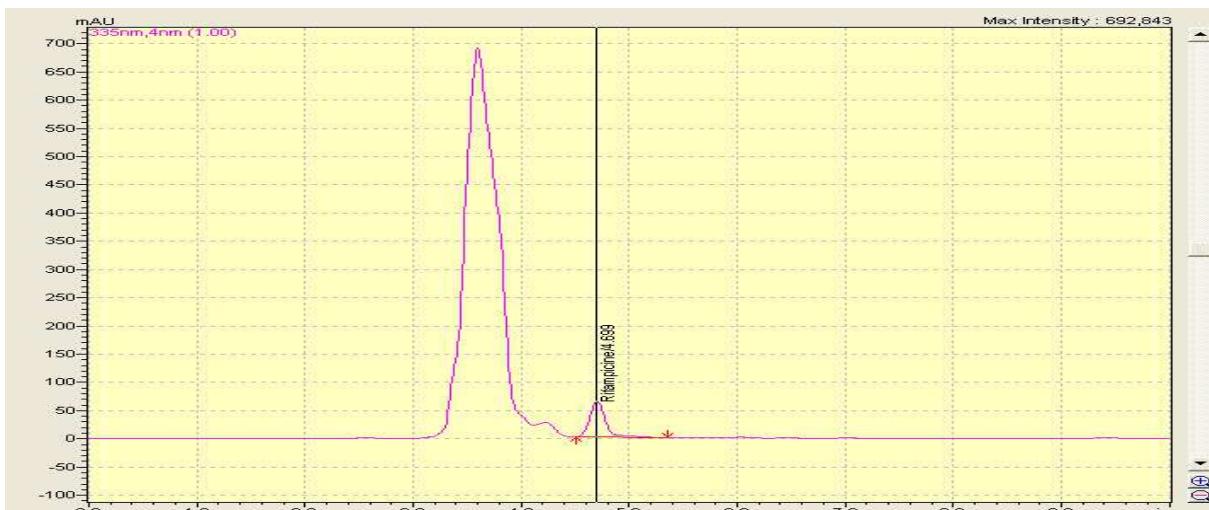


Figure 25 : CHROMATOGRAMME DU DOSAGE PLASMATIQUE DE LA RIFAMPICINE (20)

On observe que le pic de la RIFAMPICINE apparaisse à TR : 4.699 avec un air de pic : 580192 Ce qui traduit la concentration 20 µg/ml

4- DISCUSSION :

Tableau Présentant les résultats de tous les dosages :

Echantillons		Aires des pics et temps de retentions			
[µg/L]	Code	Aire du	TR	Moyenne	Moyenne



		pic		des aires	TR
2.5	R11	73052	4.772	75681,67	5.0063
	R12	79145	4.786		
	R13	74848	4.780		
5	R21	147729	4.768	151064,67	5.0063
	R22	151731	4.754		
	R23	153734	4.747		
10	R31	316164	4.755	302470,33	5.0063
	R32	299948	4.745		
	R33	291299	4.715		
20	R41	630720	4.699	598419,00	5.0063
	R42	580192	4.688		
	R43	584345	4.867		

Tableau 4 : Résultats de tous les dosages de la Rifampicine par HPLC

Dans ce Tableau On remarque que le temps de rétention reste relativement stable, le seul changement se manifeste en air de pics, qui se change en fonction de concentration

- En 2.5 µg/ml on a une moyenne d'aire de pic 75681,67
- En 5 µg/ml on a une moyenne d'aire de pic 151064,67
- En 10 µg/ml on a une moyenne d'aire de pic 302470,33
- En 20 µg/ml on a une moyenne d'aire de pic 598419,00

Grace à l'optimisation du dosage de la Rifampicine par HPLC, on peut conclure que, on a eu des résultats satisfaisants, et nous avons confirmé la fiabilité de la méthode du dosage analytique de la Rifampicine par HPLC que nous avons développée est mis en place dans le laboratoire des analyses de pharmacologie de CHU HASSAN II de Fès.



CONCLUSION

Durant notre étude au sein du laboratoire de pharmaco-toxicologie, nous avons remarqué que le développement et la validation de la méthode du dosage de la RIFAMPICINE par l'HPLC en phase inverse, a fourni des déterminations fiables, spécifiques, sélectives avec un temps d'analyse relativement court (temps de rétention est égale à 5.006 min), elles conviennent mieux aux exigences matérielles du laboratoire.

La fidélité et la justesse sont très bonnes puisque le coefficient de variation (CV%) et le biais sont $\leq 20\%$, ainsi que la linéarité de la courbe d'étalonnage est excellente, vu que la moyenne des coefficients de corrélation R^2 est relativement proche de zéro.

La limite de détection était de 0.922484 $\mu\text{g/ml}$ et la limite de la quantification était de 2.8160 $\mu\text{g/ml}$ ce qui permet d'analyser des faibles concentrations de la Metformine dans le sang.

Les caractéristiques de performance de ce dosage rendent la méthode appropriée pour le suivi thérapeutique pharmacologique de la RIFAMPICINE en diminuant sa gravité des effets indésirables, et aussi pour une meilleure adaptation de la dose administrée.

Le bilan de ce projet s'avère extrêmement positif, d'une part pour le laboratoire à travers les résultats cités ci-dessus, et d'autre part, dans un contexte personnel, j'ai eu l'occasion de développer et valider une méthode réalisée, pour la première fois, ici au sein du CHU Hassan II de Fès.



REFERENCES

- [1] Décrets, circulaires, bonne pratiques, normes, articles de revues
- [2] Suivie thérapeutique de la RIFAMPICINE : suivie thérapeutique pharmacologiques @2004 Elsevier SAS ; Anne Limosin, Serge Bouquet, Chantal le Guellec , Elisabeth Rey , Nicolas Venisse
- [3] Principe et Vocabulaire pour la validation de méthode. Max Feinberg
- [4] Validation and Qualification in Analytical Laboratories – L. Huber – Interpharm / CRC 1999
- [5] L'assurance qualité dans les laboratoires agro-alimentaires et pharmaceutiques – M. Feinberg, coordonnateur – Ed TEC&DOC 2001
- [6] Analytical method validation and instrument performance verification – Ed Chung Chow Chan, H. Lam, Y.C. Lee, X.M. Zhang – John Wiley&Sons, 2004
- [7] Validation of chromatography data systems – Meeting business and regulatory requirements – R.D. McDowall – Ed Royal Society of Chemistry, 2005
- [8] Method validation in pharmaceutical analysis – a guide to best practice – Ed J. Ermer and J.H. McB. Miller – Wiley- VCH, 2005
- [9] [10] Définition de la validation de méthode et outils associé- Jérôme Vial 2006