



Sommaire

INTRODUCTION	5
I. PRESENTATION DU CHU HASSAN II FES	6
II. APERÇU SUR LE LABORATOIRE DE PHARMACOTOXICOLOGIE	6
I. DESCRIPTION DE LA METFORMINE.....	9
II. LE SUIVI THERAPEUTIQUE PHARMACOLOGIQUE DES MEDICAMENTS :	12
1. Les objectifs du suivi thérapeutique pharmacologique :.....	12
2. Les indications pour le dosage sanguin et le suivi thérapeutique pharmacologique :	12
3. Intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique de la Metformine.	12
III. PRINCIPALES METHODES DU DOSAGE DES MEDICAMENTS	12
1. Méthodes immunologiques	13
2. Méthodes chromatographiques	14
IV. VALIDATION ANALYTIQUE	19
1. historique de la validation analytique :	19
2. . Objectif de la validation analytique	19
3. Les critères de la validation :	19
I. MATERIELS ET METHODES	23
1. Préparation des échantillons :	23



2.	Préparation des échantillons à injecter :.....	23
3.	Préparation de la solution mère :.....	23
4.	Préparation des solutions étalons :.....	23
5.	phase mobile :.....	24
6.	instrumentation :.....	24
7.	Optimisation des conditions chromatographiques	24
II.	METHODE DE VALIDATION :	25
III.	RESULTATS ET DISCUSSION :.....	26
IV.	APPLICATION CLINIQUE CHEZ LE MALADE SOUS TRAITEMENT	
	31	
	CONCLUSION	33



Introduction

Les méthodes analytiques sont indispensables pour quantifier les médicaments et leurs métabolites dans les prélèvements biologiques. Pour pouvoir être utilisées, ces méthodes doivent être validées. L'objectif de la validation est de produire des résultats fiables et reproductibles.

En effet, les données fournies sont cruciales lors de la réalisation d'études de pharmacocinétique, de bioéquivalence, de biodisponibilité ou encore au cours des études toxicologiques chez l'animal puis chez l'homme. La validation des méthodes en bioanalyse est une étape clé du développement de nouvelles molécules jusqu'à l'enregistrement auprès des autorités.

La maîtrise de la qualité des analyses est une préoccupation importante. La démarche à suivre ne se limite pas à la production de procédures dont le suivi assure la traçabilité totale des résultats, conditions nécessaires à l'accréditation. Elle intègre également la qualification de l'appareillage utilisé, son suivi et surtout la validation de la méthode de dosage qui permet de prouver que cette méthode répond bien aux besoins pour lesquels elle a été développée, avec la possibilité de la transférer dans un autre laboratoire.

Ceci impose une caractérisation précise des critères de la méthode :

Sélectivité, spécificité, exactitude, répétabilité, reproductibilité, linéarité, seuils de quantification et de détection, et robustesse.

Les systèmes analytiques sont aujourd'hui capables de générer une très grande quantité de données. Cette profusion d'informations parfois redondantes peut nuire à l'exploitation et à l'interprétation des données. La mise en œuvre d'outils mathématiques et statistiques avancés se révèle alors indispensable afin d'extraire l'information la plus pertinente.

L'objectif de notre travail est la validation de la méthode du dosage de la Metformine par l'HPLC.



Présentation du CHU Hassan II Fès

Le CHU Hassan II de Fès est considéré comme un fleuron du secteur de la santé au Maroc. Sa réalisation a nécessité 5 ans de travaux et un investissement global de 1,2 milliard de DH. Il permet la formation théorique et pratique des futurs professionnels médicaux, personnels paramédicaux et techniques de la santé. Il est construit sur deux tranches :

- 1^{ère} Tranche :



- Hôpital des spécialités (ABCDEF)
- Hôpital mère et enfant (G)
- Consultations externes (I)
- Laboratoire central d'analyse médicale (J)

- 2^{ème} Tranche :

- Centre d'Oncologie
- Centre de la médecine nucléaire

Aperçu sur le Laboratoire de pharmacotoxicologie

Le Laboratoire Central d'Analyses Médicales est situé au bâtiment J du Centre Hospitalier Universitaire Hassan II de Fès, conçu comme un pôle d'activité hospitalière comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales :



Fig1 : laboratoire central d'analyses médicales

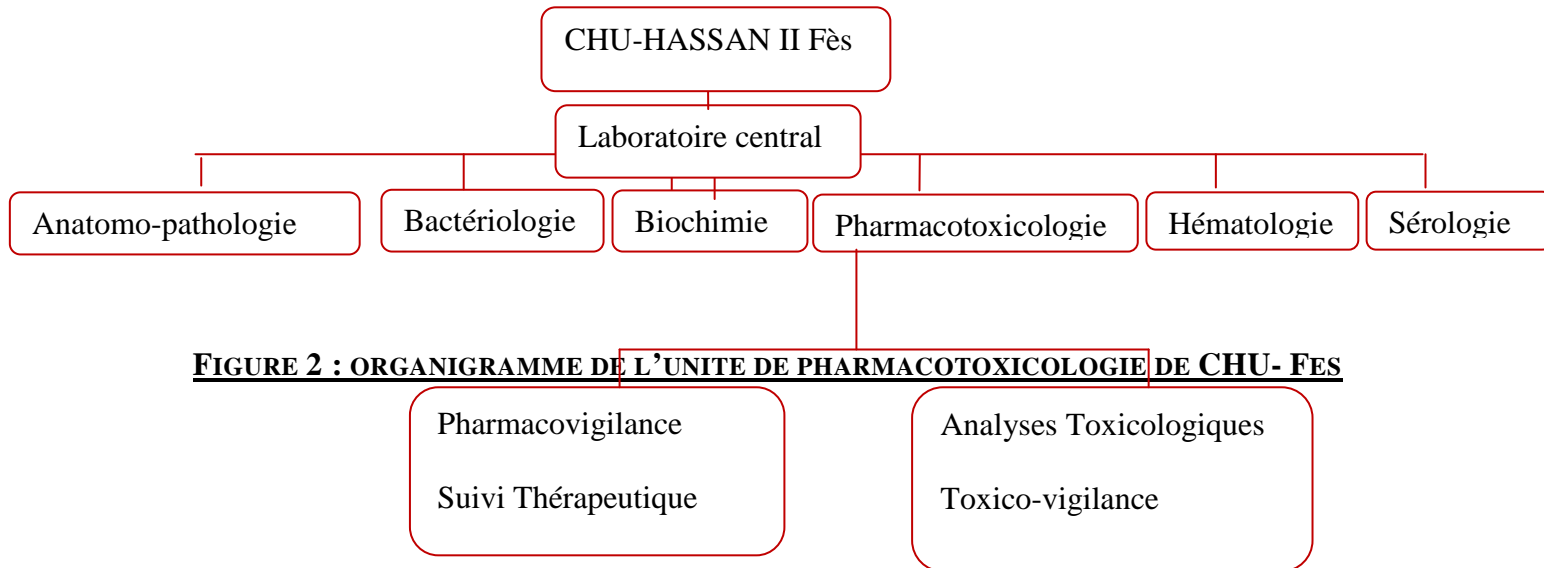
Il se compose de :

- Laboratoire de biochimie/Pharmacotoxicologie;
- Laboratoire d'hématologie;
- Laboratoire de bactériologie /Immunologie;
- Laboratoire de parasitologie;
- Laboratoire de génétique;
- Laboratoire d'anatomie pathologique.

La création d'un laboratoire central d'analyses médicales au sein du CHU est une première nationale. Cette conception adoptée récemment dans les laboratoires hospitaliers internationaux permet de :

- Optimiser les moyens techniques et le budget de fonctionnement du laboratoire;
- Offrir des plateaux techniques spécialisés de grande qualité ouverts à toutes les disciplines biologiques;
- Assurer une formation complète et de haut niveau aux résidents de biologie, de génétique et d'anatomie pathologique.

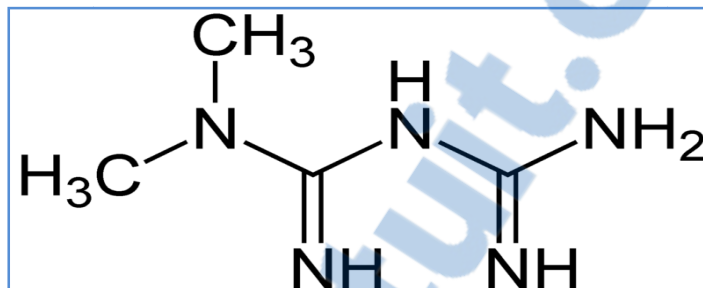
Avec son plateau technique performant, son équipe multidisciplinaire et motivée et sa situation privilégiée au sein d'un CHU qui est dotée d'une offre de soins de grande qualité et fortement diversifiée, le laboratoire peut jouer un rôle majeur au niveau de la région et même au niveau national.





I. Description de la METFORMINE

La Metformine est un biguanide possédant des effets anti-hyperglycémiant, réduisant la glycémie basale et postprandiale. Elle ne stimule pas la sécrétion d'insuline et, par conséquent, ne provoque pas d'hypoglycémie. La formule brute de la Metformine est $C_4H_{11}N_5$ soit une masse molaire de $129,1636 \pm 0,005 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. L'hydrochlorure de Metformin est soluble librement dans l'eau et est pratiquement insoluble dans l'acétone, l'éther et le chloroforme. Le pKa de Metformine est 12.4. Le pH d'une solution aqueuse de 1 % d'hydrochlorure Metformine est 6.68. [1]



Formule développée de la
Métformine

Mécanismes d'action

La Metformine est un agent anti-hyperglycémique qui améliore la tolérance de glucose dans les patients avec le diabète du type 2. Elle peut agir par l'intermédiaire de trois mécanismes:

- En réduisant la production hépatique de glucose, en inhibant la néoglucogenèse et la glycogénolyse ;
- Au niveau musculaire, en augmentant la sensibilité à l'insuline, en favorisant la captation et l'utilisation périphérique du glucose ;
- Enfin, en retardant l'absorption intestinale du glucose. [2]

Indication-posologie :

- La Metformine est le médicament le plus prescrit pour traiter les patients atteints de diabète de type 2, en particulier en cas de surcharge pondérale
- En monothérapie ou en association avec d'autres antidiabétiques oraux :
- La posologie initiale habituelle est de 500 mg ou de 850 mg de Metformine, 2 ou 3 fois par jour, administrés au cours ou à la fin des repas.
- En association avec l'insuline :
- La Metformine et l'insuline peuvent être associées afin d'obtenir un meilleur contrôle glycémique.
- La dose maximale recommandée de la Metformine est de 3 g/jour, en 3 prises distinctes.

Pharmacodynamie :



Classe pharmacothérapeutique : La metformine est un biguanide possédant des effets antihyperglycémiants, réduisant la glycémie basale et postprandiale. Il ne stimule pas la sécrétion d'insuline et, par conséquent, ne provoque pas d'hypoglycémie.

Le chlorhydrate de metformine peut agir par l'intermédiaire de trois mécanismes :

- En réduisant la production hépatique de glucose, en inhibant la néoglucogenèse et la glycogénolyse.
- Au niveau musculaire, en augmentant la sensibilité à l'insuline, en favorisant la captation et l'utilisation périphérique du glucose.
- Enfin, en retardant l'absorption intestinale du glucose.

Il Réduit le cholestérol total et le LDL cholestérol, ainsi que les taux de triglycérides.

- Efficacité clinique : L'étude prospective randomisée UKPDS a permis d'établir le bénéfice à long terme d'un contrôle intensif de la glycémie chez des patients adultes présentant un diabète de type 2 avec Une réduction significative du risque absolu de tout type de complication liée au diabète dans le groupe chlorhydrate de Metformine.
- Lorsque le chlorhydrate de Metformine a été utilisé en seconde intention en association avec un sulfamide hypoglycémiant, le bénéfice clinique n'a pas été démontré. De même en cas d'association avec l'insuline dans le traitement du diabète de type 1.

Pharmacocinétique:

- Absorption : Après une administration par voie orale de chlorhydrate de Metformine, le Tmax est atteint en 2 h 30, les concentrations plasmatiques à l'état d'équilibre sont atteintes en 24 à 48 heures et restent généralement inférieures à 1 µg/ml. La biodisponibilité absolue d'un comprimé de chlorhydrate de Metformine de 500 mg ou de 850 mg est environ de 50 à 60% chez le sujet sain. [3]
- L'alimentation diminue et ralentit légèrement l'absorption de Metformine.
- Distribution : La fixation aux protéines plasmatiques est négligeable. Le chlorhydrate de Metformine diffuse dans les érythrocytes qui constituent très probablement un compartiment secondaire de distribution et Le volume de distribution (Vd) moyen est compris entre 63 et 276 litres.
- Métabolisme : La Metformine est excrétée dans l'urine sous forme inchangée. Aucun métabolite n'a été identifié chez l'homme.
- Elimination : La clairance rénale de la Metformine est supérieure à 400 ml/min, ce qui indique une élimination par filtration glomérulaire et par sécrétion tubulaire de la Metformine.
- Après une administration orale, la demi-vie apparente d'élimination terminale est d'environ 6,5 heures.



- En cas d'altération de la fonction rénale on observe une augmentation des concentrations plasmatiques de chlorhydrate de Metformine.

Effets indésirables :

- **Effets indésirables très fréquents** : troubles digestifs, tels que nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales et perte d'appétit ;
- **Effets indésirables fréquents** : perturbation du goût ;
- **Effets indésirables très rares** : carence en vitamine B12 par malabsorption intestinale suffisante pour entraîner une anémie macrocytaire. Acidose lactique, très rare mais grave, en particulier si les reins ne fonctionnent pas correctement.

Les contre-indications :

- Insuffisance rénale chronique
- Insuffisance hépatocellulaire
- Grossesse
- Acidose lactique
- Tout état anoxie cellulaire
- Toute situation qui peut conduire à une altération de la fonction rénale [4]

Interactions avec d'autres médicaments :

- Associations faisant l'objet de précautions d'emploi à savoir :
- Les médicaments avec une activité hyperglycémique intrinsèque (par ex, les glucocorticoïdes) ;
- Les diurétiques et plus spécialement les diurétiques de l'anse qui peuvent augmenter le risque d'acidose lactique en raison de leur potentiel à réduire la fonction rénale.
- Associations déconseillées :
- Alcool : L'intoxication alcoolique aiguë est associée à un risque majoré d'acidose lactique, en particulier en cas de jeûne ou dénutrition, insuffisance hépatique.
- Produits de contraste iodés : Survenue éventuelle d'une insuffisance rénale, liée à l'injection intravasculaire de produits de contraste iodés, pouvant entraîner une accumulation de Metformine et exposer à un risque augmenté d'acidose lactique.





II. Le suivi thérapeutique pharmacologique des médicaments :

1. Les objectifs du suivi thérapeutique pharmacologique :

- permettre une adaptation posologique adéquate conduisant à une efficacité pharmacologique optimale
- prévenir les manifestations indésirables apparaissant au cours de certains traitements
- permettre une réduction du coût des traitements [5]

2. Les indications pour le dosage sanguin et le suivi thérapeutique pharmacologique :

- L'existence d'une relation réelle et déterminée entre les taux sanguins circulants et l'effet pharmacologique.
- L'intérêt de la connaissance de ces taux sanguin dans l'utilisation de ces médicaments.
- Une fenêtre thérapeutique étroite
- La possibilité de problème de compliance du patient.
- L'optimisation du traitement ne peut se faire sur la seule observation clinique. [6]

3. Intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique de la Metformine

- Le suivi thérapeutique pharmacologique de la Metformine a comme intérêt l'adaptation de la posologie afin de réduire la fréquence des effets indésirables ou toxiques liés à une posologie excessive
- le dosage de ce médicament peut donc :
- aider à ajuster la posologie de Metformine à la fonction rénale
- évaluer la compliance au traitement
- analyser rétrospectivement le lien entre la metformine et la genèse d'une acidose
- L'insuffisance rénale récente, même sévère, n'est pas déjà accompagnée d'une accumulation de la Metformine
- Seule l'insuffisance hépatique semble faire courir un danger dans l'accumulation de ce médicament
- Des troubles digestifs (nausées, diarrhée) on augmente la posologie très progressivement et en demandant au patient de prendre la metformine à la fin du repas.

III. PRINCIPALES METHODES DU DOSAGE DES MEDICAMENTS

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

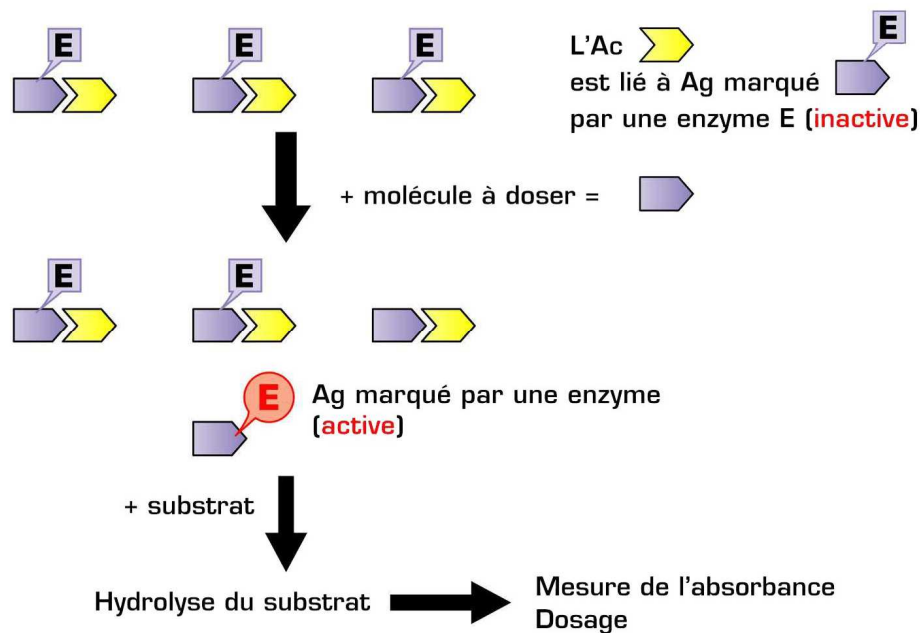
1. Méthodes immunologiques

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, [7]

La méthode EMIT: Enzyme Multiplied Immunoassay Technic

- 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.



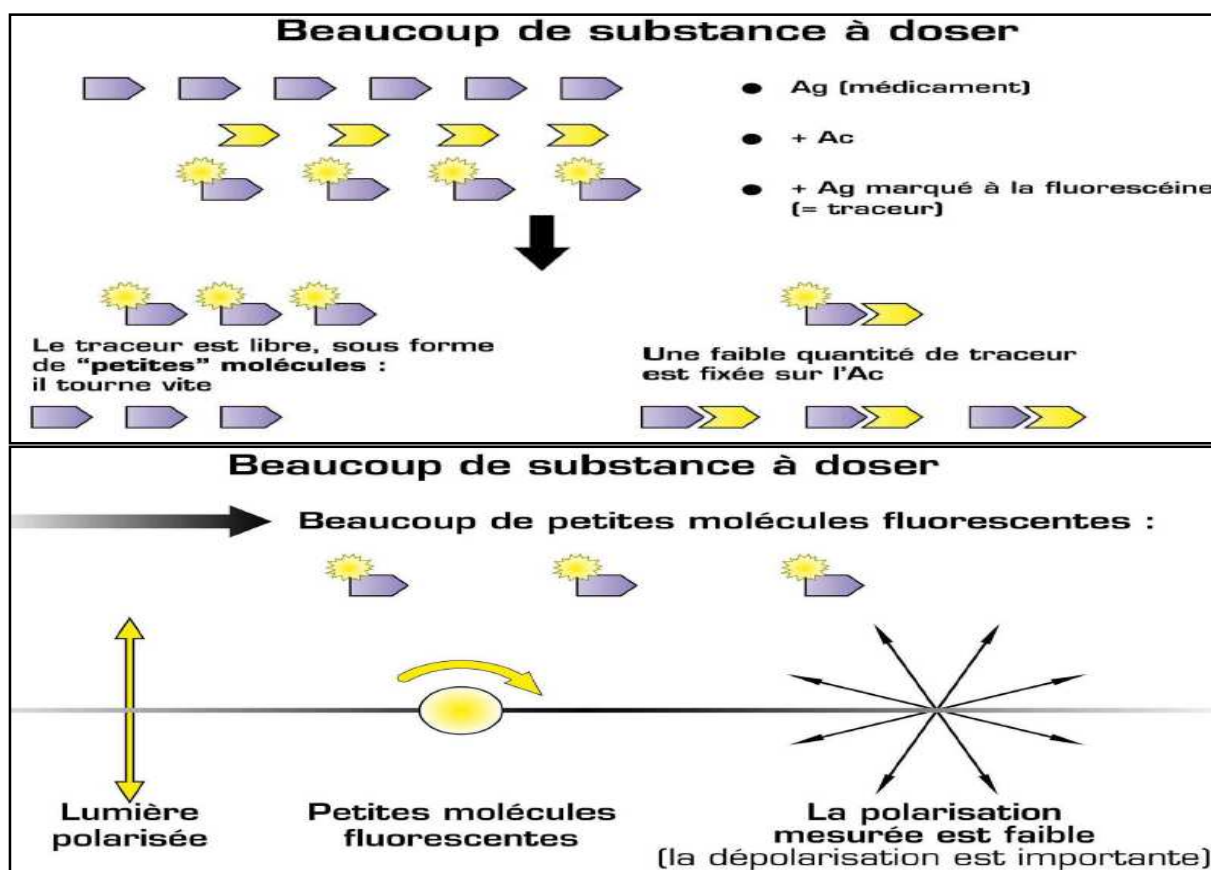
- plus il ya de médicament dans l'échantillon :
- plus la quantité d'enzyme active sera importante
- plus la quantité de substrat hydrolysée sera importante,
- plus l'absorbance dans l'ultra violet sera élevée.
- Méthode très bien adaptée aux dosages de petites molécules,

La méthode CEDIA: Cloned Enzyme Immuno Donor Assay

- 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. [8]

La méthode FPIA: Fluorescence Polarisation Immuno 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. [9]



Principe de la méthode FPIA

2. Méthodes chromatographiques

Il existe deux principales méthodes chromatographiques utilisées pour le dosage du médicament :

- La chromatographie en phase gazeuse (CPG) ;



- La chromatographie liquide de haute performance (HPLC).
- Dans les deux cas, le mélange à analyser se dilue dans un fluide appelé phase mobile qui l'entraîne à travers un tube appelé colonne remplie d'une phase stationnaire immobilisée. Cette dernière peut être soit sous forme de fine granulométrie (colonne remplie) ou sous forme d'un film mince (colonne capillaire). Alors, les constituants du mélange se répartissent suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.
- Un détecteur placé à la sortie de la colonne
- couplé à un enregistreur permet d'obtenir un chromatogramme présentant une suite de pics, plus ou moins grands, émergeant de la ligne de base qui correspond au tracé obtenu en l'absence de composé élué. Chaque constituant est caractérisé par son temps de rétention (temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond au maximum du pic). L'amplitude des pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté. [10]

a) La chromatographie en phase gazeuse

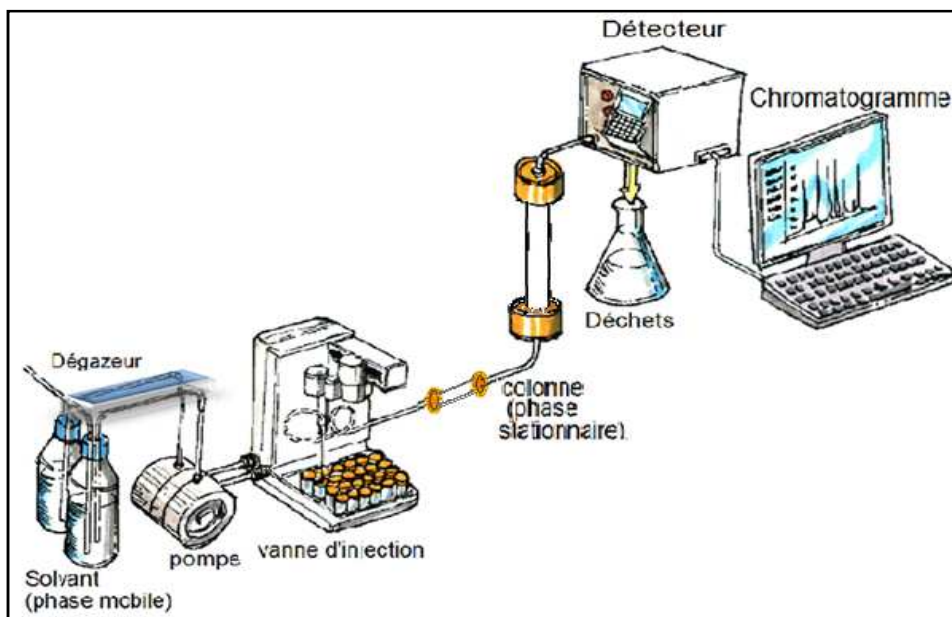
- La chromatographie en phase gazeuse est une technique de séparation des molécules. Elle est utilisée pour repérer les substances qui composent un mélange gazeux ou susceptibles de le devenir sans décomposition par chauffage.
- **Principe de la chromatographie en phase gazeuse**
- Les éléments gazeux ou volatils d'un échantillon sont placés dans un injecteur. Ils vont ensuite être emportés (phase mobile) par un gaz porteur qui va les amener dans la phase stationnaire pour qu'ils y soient séparés. Il s'agit bien souvent d'un liquide ou d'un solide. Plus un élément a d'affinité avec la phase stationnaire, plus il prendra de temps pour sortir de la colonne de chromatographie. Les éléments peuvent être identifiés mais aussi quantifiés. [11]

b) La chromatographie liquide à haute performance

- La chromatographie, méthode d'analyse physico-chimique, sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile). [12]
- Si les molécules à séparer sont éluées par une phase mobile liquide sur une phase stationnaire (solide ou liquide) on l'appelle chromatographie en phase liquide.

L'appareillage de l'HPLC se présente comme suit :

- Dans tout appareil de chromatographie liquide à haute performance on retrouvera toujours les éléments de base suivants :



- o un ou plusieurs réservoirs de phase mobile contenant soit des solvants purs soit des mélanges de solvants dans des concentrations connues.

- o un système

d'injection comportant une boucle d'échantillonnage calibrée (généralement une vanne RHEODYNE).

- o une colonne remplie, en acier inox, de quelques centimètres de long.
- o un détecteur permettant à la fois, de mettre en évidence la sortie des solutés de la colonne et de donner un signal proportionnel à la quantité de chacun de ces solutés, dans un mélange.
- L'utilisation d'un solvant pur ou d'un mélange de solvants de composition constante dans le temps correspond à une étude en mode ISOCRATIQUE.
- L'utilisation d'un mélange de solvants dont la composition est variable dans le temps correspond à une étude en mode GRADIENT.

Réservoir de phase mobile

- Un réservoir de solvant (éluant) qui contient la phase mobile en quantité suffisante.



- Dégazeur : il permet la désoxygénation du solvant ce qui permet d'éviter les risques de dégradation des échantillons ou de la phase stationnaire par oxydation.

Système de pompage

La pompe est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. (en mode ISOCRATIQUE ou en mode GRADIENT).

Vanne d'injection : c'est un injecteur à boucles d'échantillonnage permet d'introduire un volume exact d'échantillon, sans modifier la pression, dans le flux de la phase mobile

La colonne

Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Au delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées.

La colonne est souvent précédé pour augmenter sa durée de vie, d'une précolonne dite colonne de garde, courte de 1cm, qui retient les composés indésirables.

La phase stationnaire

- La phase normale:

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire.

Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête.

- La phase inverse :

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier.

- La phase mobile :

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

- si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale ;

- si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse.

Détecteurs

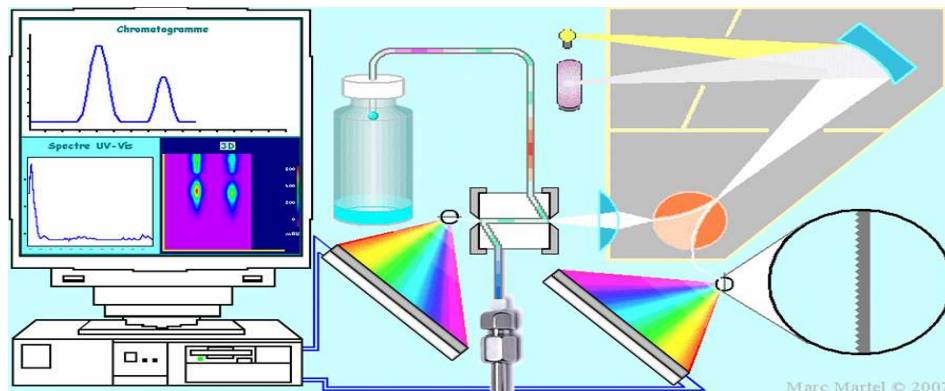
Le détecteur a pour but de fournir un signal électrique reflétant en continu les variations de composition de l'éluat en sortie de colonne ce qui permet de détecter le passage des composés successifs

a) Spectrophotomètre UV-Visible

La réponse de ce type de détecteur est fondée sur la loi de Lambert-Beer

$$A_{\lambda} = - \log \frac{I}{I_0} = \epsilon_{\lambda} l c$$

Avec: A: absorbance



I_0 : intensité du rayonnement incident
 I : intensité du rayonnement transmis
 ϵ : le coefficient d'absorption molaire en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$
 l : longueur du chemin optique(cm)

c : concentration du soluté dans l'effluent

- les détecteurs à longueur d'onde fixe. La longueur d'onde de 254 nm a été fixée par l'utilisation de la lampe à vapeur de mercure, qui a une raie d'émission maximale à 253,7 nm.
- Les détecteurs à longueur d'onde variable : sont utiles lorsque le maximum de sensibilité correspond à une longueur d'onde autre que 254 nm.
- Les détecteurs à barrette de diodes : Une barrette de diodes de quelques mm contient plusieurs centaines de diodes, chacune reçoit le rayonnement contenu dans un petit domaine spectral. Chacun des circuits élémentaires est exploré par un système pilote : par un micro-ordinateur. Ce système permet l'acquisition du spectre de l'échantillon en temps réel, une représentation en 3 dimensions (temps, absorbance, longueur d'onde) et une caractérisation des composés par leur spectre. [13]

FIGURE 3 :PRINCIPE DU DETECTEUR A BARRETTE DE DIODES



b) Détecteur à fluorescence

La fluorescence est le rayonnement émis par des composés comportant certains groupements fonctionnels, lorsqu'ils sont excités par une radiation lumineuse. Le rendement de la fluorescence est fonction des longueurs d'onde d'excitation et d'émission.

IV. VALIDATION ANALYTIQUE

INTRODUCTION :

Depuis toujours les analystes « valident » leurs méthodes en effectuant des séries de mesures plus ou moins bien organisées pour essayer de démontrer qu'elles conviennent à leurs objectifs. Bien sûr, celles et ceux qui sont dans des laboratoires accrédités savent que c'est insuffisant et qu'une validation doit être conduite selon une procédure expérimentale plus stricte où on parle de justesse, de reproductibilité, etc. La validation est devenue un élément majeur pour la démonstration de la compétence de ces laboratoires accrédités.

La validation analytique est une vérification de la conformité des conditions d'exécution des procédures, elle tient compte notamment des résultats obtenus avec les échantillons de contrôle. [14]

1. historique de la validation analytique :

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'Amérique. Dès 1986, un premier texte officiel est publié dans le pharmacopoeial forum intitulé : « current concept for the validation of compendial assays ». [15]
L'année suivante, 1987, une note explicative européenne sur la validation analytique (CEE III/ 844/87) est publiée. Cette note sera adoptée en août 1989.

Toujours en 1989, l'USP publie, dans son 9e supplément, « validation of compendial methods, page 1225 », texte officialisé dans cette même pharmacopée le 1er 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 a servi de support pour le développement du logiciel AVA (Qualilab, Orléans).

Le sujet est ensuite repris par L'ICH (International Conference on Harmonisation) qui publie en 1994 un premier document sur les définitions, « Validation of analytical procedure : 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 analytical procedure : Methodology ». [16]

2. . Objectif de la validation analytique

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

C'est l'ensemble des opérations nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exact et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé.

La validation est une étape importante du cycle de vie d'une procédure analytique qui permet de démontrer la fiabilité des résultats.

L'objectif de la validation est de donner des garanties quant à l'aptitude de la procédure analytique à quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à quantifier à l'avenir.

3. Les critères de la validation :

Sélectivité :

Aptitude d'un système de mesure, utilisant une procédure opératoire spécifiée, à fournir des résultats de mesure pour un ou plusieurs mesurandes, qui ne dépendent pas les uns des autres ou de toute autre grandeur existant dans le système en cours de mesurage. [17]



Spécificité :

Une méthode est spécifique si elle produit une réponse uniquement pour l'analyte d'intérêt.

Dans le cas des méthodes séparatives, on parle plutôt de sélectivité: capacité à différencier et quantifier l'analyte cible en présence d'interférents dans l'échantillon.

En pratique on fait une identification spectrale et temps de rétention des analytes, ça veut dire, on compare les spectres UV des molécules à une bibliothèque spectrale. [18]

Fidélité :

Fidélité = ensemble des caractéristiques de dispersion

La fidélité représente l'étroitesse de l'accord entre des résultats d'essais indépendants effectués sur différentes prises d'essais d'un même échantillon. [19] . Elle fournit des indications sur les erreurs liées au hasard, elle peut être évaluées à 3 niveaux :

➤ Répétabilité (même série d'analyses) :

L'essai de répétabilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour le même analyte dans des conditions identiques : même opérateur, même lots de réactifs, même instrument, même calibrateur.

En pratique, cet essai sera réalisé au cours d'une même série. Il est recommandé d'utiliser au moins deux niveaux de concentration. Les niveaux seront choisis en fonction des valeurs physiopathologiques et/ou de la réglementation. Le nombre de déterminations dépendra du système analytique, du coût des réactifs, ... Cet effectif devra être ~ 6. La valeur statistique des résultats obtenus dépend de ces effectifs.

➤ La fidélité intermédiaire (opérateur, ou jour, ou appareillage ... différent) :

L'essai de fidélité intermédiaire consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour le même analyte dans des conditions différentes: l'opérateur, les réactifs, l'appareillage, les calibrages et les gammes d'étalonnage, les jours peuvent être des données variables.

Il est recommandé d'utiliser au moins deux niveaux de concentration. Les niveaux seront choisis en fonction des valeurs physiopathologiques et/ou de la réglementation. 6 déterminations minimum sont nécessaires pour chacun des échantillons de validation.

➤ La reproductibilité (opérateur, jour et appareillage différents) :

L'essai de reproductibilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon dans différents laboratoires.

Justesse (biais) :

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 l'espérance mathématique des résultats d'essais – c'est-à-dire la valeur « la plus » probable qu'on peut estimer à partir des résultats obtenus – et la valeur de référence acceptée ;

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

$$\text{Biais} = \frac{V_o - V_s}{V_s}$$

$V_o - V_s$

Avec :

V_o : moyenne des valeurs observées;
valeur suggérée.

V_s :

Les notions de justesse et de fidélité sont illustrées par l'exemple d'un tir sur cible, représenté ici sur la figure 3. La différence entre un tir sur cible et une méthode d'analyse est que, pour cette dernière, on ne connaît pas le centre de la cible : il faut l'estimer ; on verra bientôt comment, lorsqu'on se propose de valider une méthode :

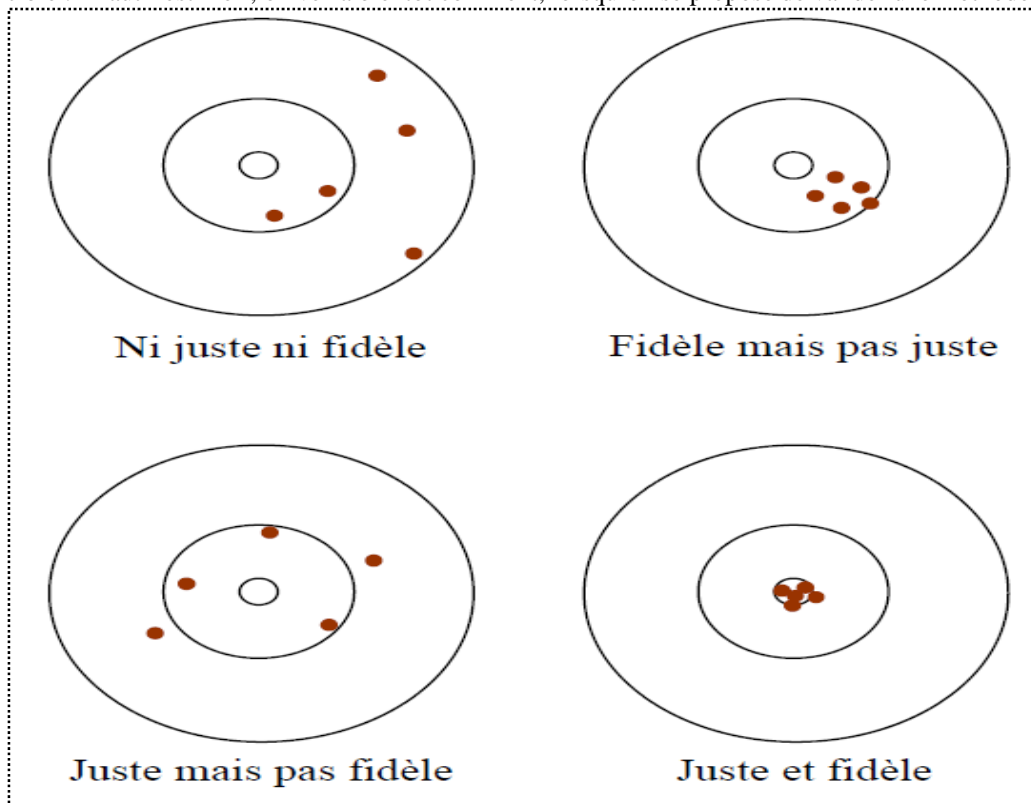


Figure 4 : Image des notions de justesse et de fidélité

Linéarité :

La linéarité d'une méthode est sa capacité, à l'intérieur d'un certain domaine, à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte à doser. Le test de linéarité va permettre de vérifier la validité du modèle de régression et de vérifier le domaine d'étalonnage pour en déduire les caractéristiques d'étalonnage. [20]

Limite de détection "LDD" :

Plus petite quantité d'analyte dont on puisse dire avec un niveau de confiance donné qu'il est présent dans l'échantillon C'est la plus petite quantité d'analyte pouvant être détectée dans l'échantillon mais pas nécessairement quantifiée.

la LDD s'effectue selon l'une des façons suivantes :

- pour une méthode chromatographique, on choisit n'importe quel point de gamme et on mesure le bruit de fond (hauteur) dans une zone sans pic de Chromatogramme, on multiplie le résultat par 3, ensuite on mesure la hauteur de pic de l'analyte sur le même chromatogramme puis on fait un produit en croix avec la concentration du point de gamme choisi.

Exemple : on a le point 25 mg/l, notre bruit de fond mesure 0,9 mAU et le pic de notre molécule mesure 377 mAU. La LDD est donc égale à $(0,9 \times 25)/377 = 0,06$ mg/l.





- b) elle peut être calculée en effectuant n mesures répétées du blanc, dans une même série, et on calcule l'écart type S, exprimé en concentration ^[17]. La LDD est donc calculée comme suite : $LDD = 3 \times S_B$
- c) Elle est estimée en tenant en compte la droite de régression $y=ax+b$:

$$LDD = \frac{(b + (3 \times S_b))}{a}$$

avec S_b = Ecart type de l'origine à l'ordonnée

Limite de quantification "LDQ" :

La limite de quantification est le niveau de mesure auquel la précision de la mesure sera considérée comme satisfaisante pour une détermination quantitative ;

En d'autres termes, la limite de quantification est la concentration qui peut être déterminée avec un coefficient de variation – appelé aussi déviation standard – et une justesse acceptables. C'est en fait la limite à partir de laquelle le résultat sera donné avec une probabilité considérée comme acceptable.

Elle est déterminée soit par essais de répétabilité et de la fidélité intermédiaire sur des concentrations de plus en plus faible. Soit obtenue à partir de l'estimation de l'écart-type du blanc : $LDQ = 10 \times S_{\text{blanc}}$.

Ou bien, également à partir de la droite de régression, donc :

$$LDQ = \frac{(b + (10 \times S_b))}{a}$$

Il est bien évident qu'en tout premier lieu, une méthode ne pourra être choisie qu'à la condition de pouvoir prendre des décisions ou de permettre d'effectuer des mesures aux niveaux de concentration attendus. Il n'est pas obligatoire pour autant de toujours rechercher la limite de détection ou de quantification la plus basse possible, ce qui supposerait un investissement plus coûteux. Or on ne doit pas perdre de vue que le choix d'une méthode d'analyse est guidé par la recherche d'un rapport coût sur bénéfice le plus petit possible. [21]

Robustesse :

La robustesse d'une méthode est sa capacité à maintenir ses performances lorsqu'elle est soumise à de petites variations fortuites des conditions expérimentales, telles celles susceptibles de se produire lors de sa mise en œuvre par un autre opérateur, sur un autre matériel ou dans un autre laboratoire.

Stabilité :

On distingue deux types de stabilité : la stabilité de l'analyte au cours des différentes étapes du pré-traitement et la stabilité de l'analyte dans l'échantillon biologique.

La stabilité d'un analyte dépend de ses propriétés physico- chimiques et des conditions de stockage et de conservation. Les stabilités des solutions mères et de travail des différents analytes doivent être vérifiées dans des conditions normales de laboratoire en termes de température, d'humidité et de lumière.



I. Matériels et méthodes

1. Préparation des échantillons :

Les prélèvements veineux sont recueillis sur tubes héparinés et centrifugés dans l'heure qui suit afin de limiter les échanges plasma-globules.

Après centrifugation et séparation, les culots globulaires sont lavés trois fois à l'aide d'une solution de NaCl 0.9% selon le protocole suivant :

-mettre le même volume de NaCl 0.9% que de culot globulaire.

-Agiter 30 secondes.

-centrifuger 5min à 3000 tours/min.

-Eliminer le surnageant

-renouveler l'opération 3 fois.

-Ne conserver le culot globulaire qu'après ce 3^{ème} lavage.

-congeler le plasma et le culot.

2. Préparation des échantillons à injecter :

Phase de déprotéinisation :

La phase de déprotéinisation s'effectue selon le protocole suivant :

-décongeler les échantillons patients

-Agiter les prélèvements 1 minute pour les homogénéiser

-prélever 500 µl de plasma ou 500 µl de culot globulaire de patient.

-ajouter 500 µl d'acétonitrile

-Agiter 15 secondes

-centrifuger 5min 10000tours/min

-récupérer 500 µl de surnageant

-ajouter 500 µl d'acide perchlorique

-vortexer 15 secondes

-centrifuger 5min 10000tours/min

-reprise de 100 µl du surnageant dans un flacon à injection.

3. Préparation de la solution mère :

On prépare la solution mère (SM) de 1 mg/ml, en ajoutant 5 mg de la poudre Metformine sur 5 ml de méthanol.

4. Préparation des solutions étalons :

On prépare une solution fille (SF) de 50 µg/ml, en diluant 100 µl de solution mère dans 1900 µl d'H₂O. A partir de cette solution fille, on prépare une gamme étalon à quatre concentrations (1, 2, 4, 8 µg/ml), les dilutions sont réalisées à l'aide d'un pool de sérum provenant d'individus ne recevant pas de Metformine, elle est préparée de la façon suivante :

P8 : 320µl SF + 1680 µl de sérum



P4 : 1000 μ l P8 + 1000 μ l de sérum
P2 : 1000 μ l P4 + 1000 μ l de sérum
P1 : 1000 μ l P2 + 1000 μ l de sérum.

5. *phase mobile* :

- L'acétonitrile qui est de qualité HPLC
- Le tampon phosphate SYMMETRY à pH= 3.8 préparé comme suit :
 - *6g de NaH₂PO₄ anhydre
 - *1 litre d'eau bi distillée. Le pH 3.8 est ajusté avec le H₃PO₄ 10%.

6. *instrumentation* :



Figure 5: Image de l'HPLC Shimadzu.

- 1 : Réservoir des solvants de la phase mobile
- 2 : Dégazeur
- 3 et 6 : Pompes quaternaire
- 4 : Injecteur automatique
- 7 : Colonne
- 5 : Détecteur UV-Visible
- 8 : Enregistreur

7. *Optimisation des conditions chromatographiques*

Le laboratoire de pharmacologie du CHU Amiens Picardie France, a validé une technique de dosage de la Metformine par HPLC. Ils utilisent un système chromatographique de type « WATERS », la phase mobile proposée est un mélange constitué de 50% d'acétonitrile et de 50% du tampon phosphate potassium « SYMMETRY » à pH=3.8. Ils utilisent une colonne « SYMMETRY C8 WATERS » (250 X 4.6) et une précolonne : « SYMMETRY C18 ». Le débit est de 0,5 ml/min, la température optimale est 40°C, alors que la détection est réalisée à 230 nm.



En comparaison avec les conditions chromatographiques qui existent au niveau du CHU Hassan II, on remarque qu'il y a une modification d'appareillage, une variation des conditions expérimentales, ce qui va donner des résultats inacceptable par la suite.

Dans le but d'optimiser ces conditions, on a pratiqué une grande série d'analyses selon les moyens dont on dispose, donc plusieurs essais ont été réalisés pour prouver que le protocole est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance aux résultats fournis dans le but de valider la méthode de dosage.

	Le protocole proposé	Le protocole développé	Tableau 1 : les différences changements entre le protocole du CHU Amiens Pica
Colonne	SYMMETRY C8 WATERS(CMX)	C18 PROTECOL	
Débit (ml/min)	0,5	1	
pH du tampon phosphate	3,8	7,3	
la température optimale	40°C	30°C	
Proportion du tampon phosphate	50%	62.5%	
Proportion d'acétonitrile	50%	37.5%	

Tableau 1 : les différences changements entre le protocole du CHU Amiens Pica

II. Méthode de validation :

La validation d'une méthode en bioanalyse comprend une succession de procédures afin de démontrer que la méthode utilisée permet de quantifier un analyte dans une matrice particulière pour une application précise.

La validation de notre méthode est basée sur la recommandation de la société française des sciences et techniques pharmaceutiques (SFSTP) et conférence internationale d'harmonisation (ICH). En conséquence, elle a été évaluée en termes de sélectivité, linéarité, répétabilité, fidélité intermédiaire, limite de détection et limite de quantification.

Optimisation de la méthode analytique :

Une optimisation de la méthode analytique était nécessaire vu le changement des conditions chromatographiques entre les deux CHU. Pour cela, plusieurs essais ont été réalisés :

Changement de la colonne SYMMETRY C8 WATERS type CMX qui n'est pas disponible sur le marché marocain par la colonne SYMMETRY C18 PROTECOL qui est par ailleurs disponible en grande quantités chez les différents fournisseurs et permettant de doser certain nombre de médicament, autres que la Metformine.



On a varié les proportions des concentrations des constituants de la phase mobile et de la température optimale selon le tableau n1 page 30, modification du pH du tampon de 3,8 (proposé par CHU AMIENS) à 7,3 ce qui permet de garder et prolonger la durée de vie de la colonne. L'augmentation du débit à 1ml/min au lieu de 0,5ml/min a permis d'éluer la Metformine à un temps de rétention plus court (5,4 min) que l'autre protocole qui a été à 16min.

Les modifications ont été réalisées dans le but de déterminer celles qui donnent une meilleure séparation des pics sans aucune impureté avec un temps d'analyse relativement court afin d'établir notre propre protocole de dosage de la Metformine.

III. Résultats et Discussion :

Validation de la méthode analytique :



Figure 6 : courbe représentative du manque d'impureté vis-à-vis le pic de la Metformine

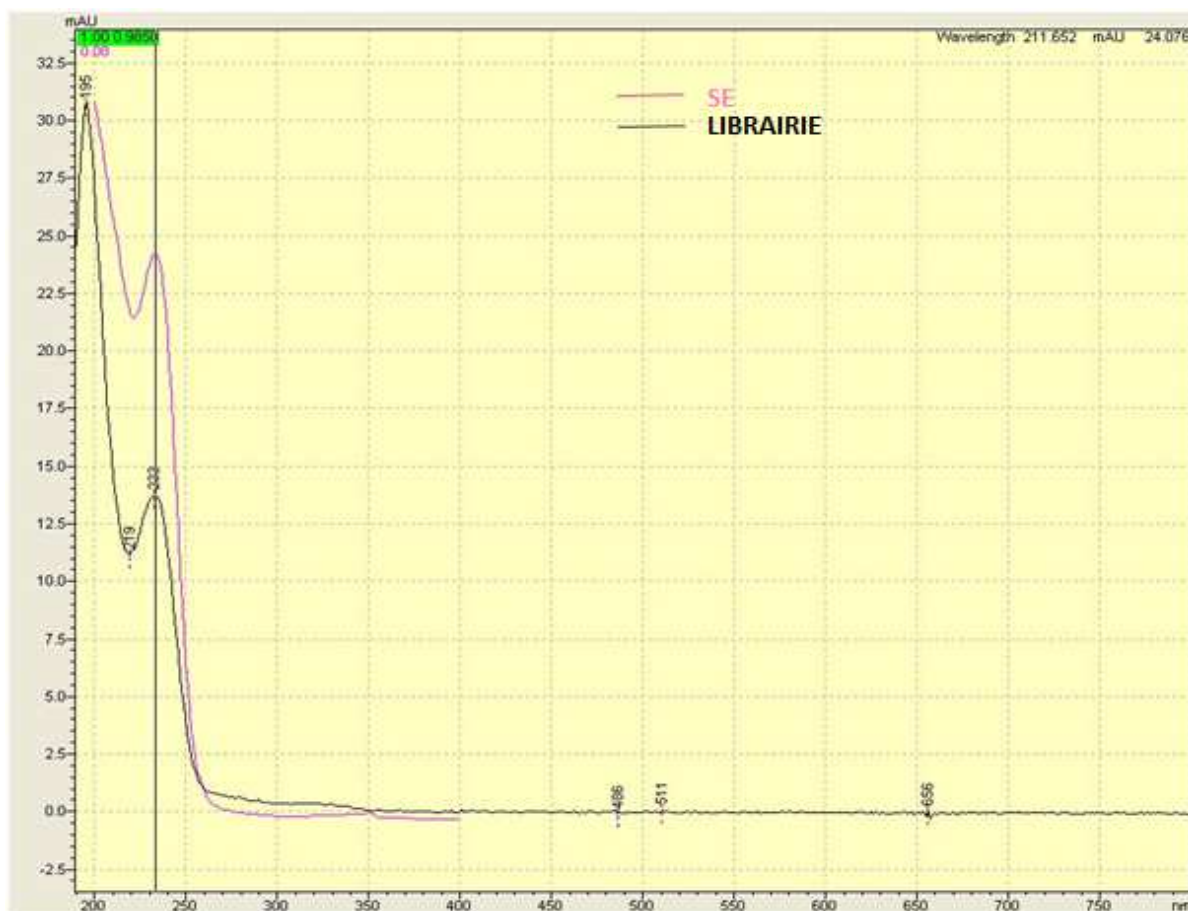


Figure 7 : Représentation spectrale de la molécule Metformine en comparaison avec celle de la bibliothèque

D'après la figure 7 on note bien qu'il s'agit de la molécule de Metformine, en effet la courbe obtenue est en très bon accord avec celle de la librairie avec une absorbance sur la même longueur d'onde 233nm ce qui prouve que la substance analysée au sein de la matrice est bien l'analyte recherché.

- **Spécificité/Sélectivité :**

L'examen de la sélectivité s'effectue sur l'analyse du blanc matrice démontre bien l'absence de réponse au temps de rétention de la Metformine (5.4min) par comparaison avec une solution pure de l'analyte :

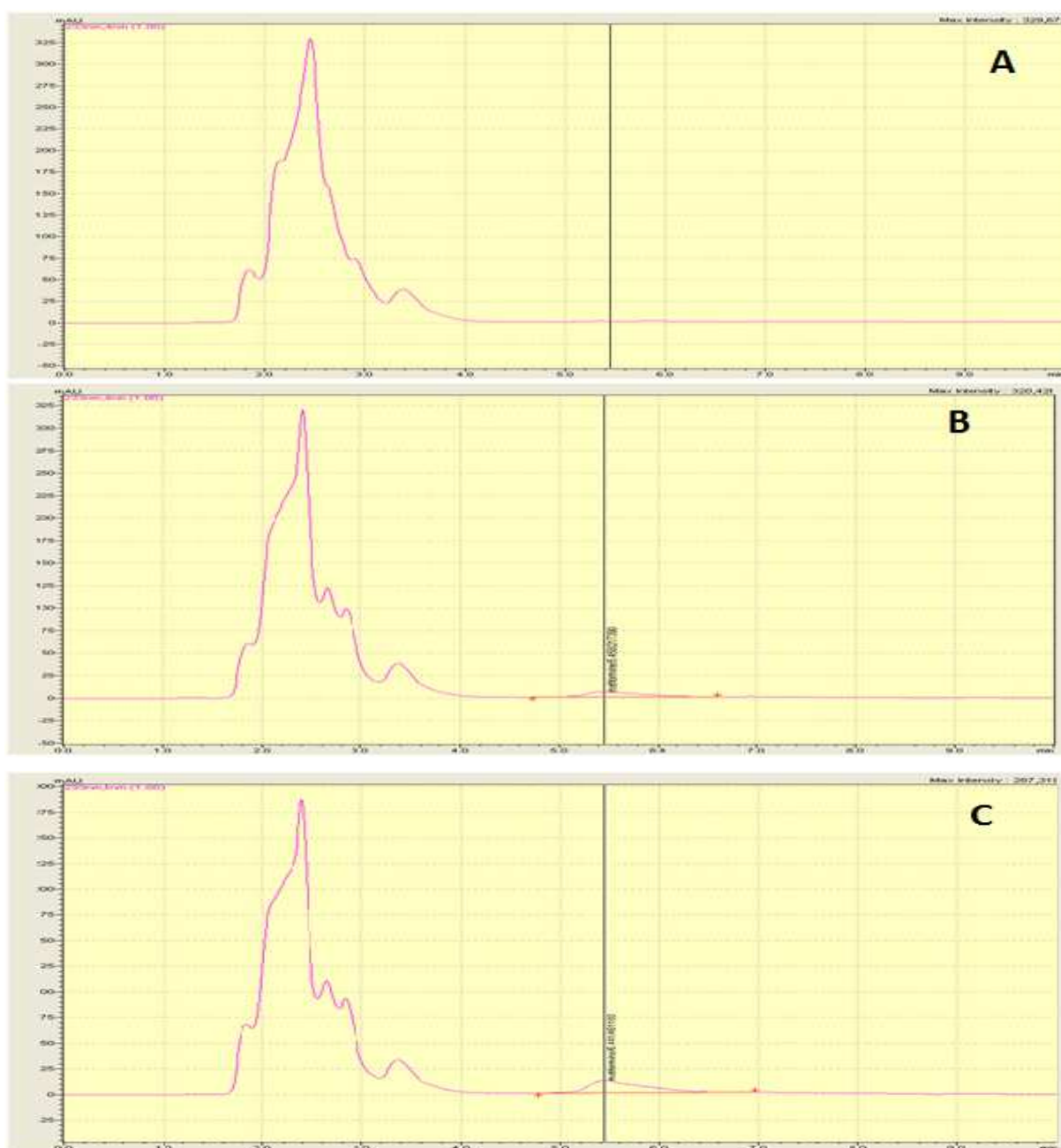


Figure 8 : A : Chromatogramme de blanc ; B : chromatogramme de metformine 4 μ g/ml ; C : chromatogramme de Metformine 8 μ g/ml

- **Linéarité :**

Nous avons utilisé quatre niveaux de concentration, répétée trois fois, à partir d'une même solution mère et analysée le même jour afin de déterminer l'exactitude des valeurs obtenues. La pente, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de corrélation ont été calculés :

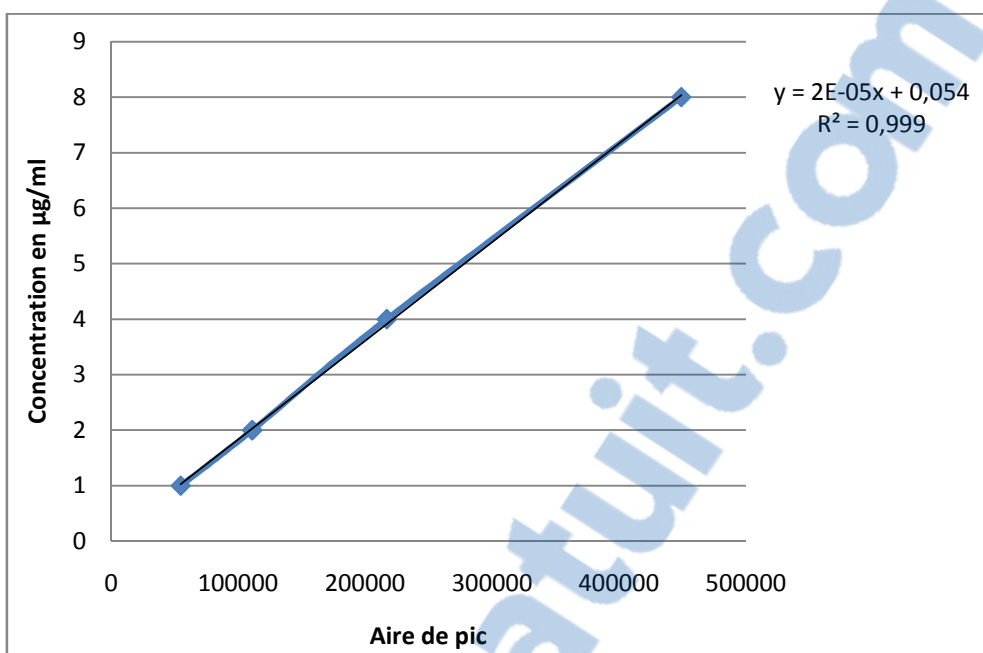


Figure 9 : Représentation graphique de la concentration en fonction de la moyenne des aires mesurées lors des essais d'étalonnage et de validation

Les résultats obtenus démontrent une bonne linéarité : $Y = 0,00002X + 0,0545$ avec un coefficient de corrélation qui se rapproche le plus possible de 1 ($R^2 = 0,9996$).

- **La fidélité : Répétabilité et fidélité intermédiaire :**

Afin d'évaluer la fidélité, la répétabilité et la fidélité intermédiaire, des calculs ont été effectués et les résultats correspondants figurent dans le tableau suivant :



		C ^o Théorique (1µg/ml)			C ^o Théorique (2µg/ml)			C ^o Théorique (4µg/ml)			C ^o Théorique (8µg/ml)		
		Air	VO (µg/ml)	Biais %	Air	VO (µg/ml)	Biais %	Air	VO (µg/ml)	Biais %	Air	VO (µg/ml)	Biais %
Répétabilité	1er Jour	R1	55 452,50	1,0461	4,6052	111 446,1000	2,0454	2,2679	220 115,8000	3,9848 - 0,3809	451 304,2000	8,1107	1,3842
		R2	54 252,90	1,0246	2,4643	110 747,8667	2,0329	1,6449	213 615,6000	3,8688 - 3,2811	446 378,1667	8,0228	0,2853
		R3	54 790,90	1,0342	3,4244	111 372,3000	2,0440	2,2021	219 695,8000	3,9773 - 0,5683	451 193,2000	8,1088	1,3595
		R4	54 672,50	1,0321	3,2131	111 036,5667	2,0380	1,9025	216 341,4000	3,9174 - 2,0649	448 473,4667	8,0602	0,7527
		R5	54 462,70	1,0284	2,8387	110 892,2167	2,0355	1,7737	214 978,5000	3,8931 - 2,6730	447 425,8167	8,0415	0,5190
		R6	55 032,90	1,0386	3,8563	111 157,4000	2,0402	2,0103	217 390,0000	3,9361 - 1,5971	449 208,9000	8,0733	0,9168
		Moyenne	54 777,40	1,0340	3,4003	111 108,7417	2,0393	1,9669	217 022,8500	3,9296 - 1,7609	448 997,2917	8,0696	0,8696
		Ecart type	388,66	0,0069		247,6437	0,0044		2 348,7193	0,0419	1 816,2397	0,0324	
		CV%	0,71	0,6708		0,2229	0,2167		1,0822	1,0667	0,4045	0,4017	
		Justesse%			96,5997			98,0331			98,2391		99,1304
Fidélité intermédiaire	2e Jour	R1	54 618,70	1,0312	3,1171	111 142,9650	2,0399	1,9974	215 733,3800	3,9066 - 2,3362	447 991,9633	8,0516	0,6453
		R2	54 573,36	1,0304	3,0362	111 176,8633	2,0406	2,0277	215 364,9600	3,9000 - 2,5006	447 704,7267	8,0465	0,5812
		R3	54 528,01	1,0296	2,9553	111 210,7617	2,0412	2,0579	214 996,5400	3,8934 - 2,6649	447 417,4900	8,0414	0,5172
		R4	54 482,67	1,0287	2,8743	111 244,6600	2,0418	2,0882	214 628,1200	3,8868 - 2,8293	447 130,2533	8,0362	0,4531
		R5	54 437,33	1,0279	2,7934	111 278,5583	2,0424	2,1184	214 259,7000	3,8803 - 2,9937	446 843,0167	8,0311	0,3890
		R6	54 391,99	1,0271	2,7125	111 312,4567	2,0430	2,1487	213 891,2800	3,8737 - 3,1581	446 555,7800	8,0260	0,3249
		Moyenne	54 505,34	1,0291	2,9148	111 227,7108	2,0415	2,0730	214 812,3300	3,8901 - 2,7471	447 273,8717	8,0388	0,4851
		Ecart type	77,44	0,0014		57,8924	0,0010		629,1969	0,0112	490,5500	0,0088	
		CV%	0,14	0,1343		0,0520	0,0506		0,2929	0,2887	0,1097	0,1089	
		Justesse%			97,0852			97,9270			97,2529		99,5149
	3e Jour	R1	54 346,64	1,0263	2,6316	111 346,3550	2,0436	2,1789	213 522,8600	3,8671 - 3,3225	446 268,5433	8,0209	0,2608
		R2	54 301,30	1,0255	2,5506	111 380,2533	2,0442	2,2092	213 154,4400	3,8605 - 3,4868	445 981,3067	8,0157	0,1968
		R3	54 255,96	1,0247	2,4697	111 414,1517	2,0448	2,2394	212 786,0200	3,8540 - 3,6512	445 694,0700	8,0106	0,1327
		R4	54 210,61	1,0239	2,3888	111 448,0500	2,0454	2,2697	212 417,6000	3,8474 - 3,8156	445 406,8333	8,0055	0,0686
		R5	54 165,27	1,0231	2,3079	111 481,9483	2,0460	2,2999	212 049,1800	3,8408 - 3,9800	445 119,5967	8,0004	0,0045
		R6	54 119,93	1,0223	2,2270	111 515,8467	2,0466	2,3302	211 680,7600	3,8342 - 4,1443	444 832,3600	7,9952	- 0,0595
		Moyenne	54 233,29	1,0243	2,4293	111 431,1008	2,0451	2,2545	212 601,8100	3,8507 - 3,7334	445 550,4517	8,0081	0,1006
		Ecart type	77,44	0,0014		57,8924	0,0010		629,1969	0,0112	490,5500	0,0088	
		CV%	0,14	0,1349		0,0520	0,0505		0,2960	0,2916	0,1101	0,1093	
		Justesse%			97,5707			97,7455			96,2666		99,8994



L'analyse des résultats du tableau ci-dessus montre bien que la méthode est répétable et bien précise, en effet la valeur du coefficient de variation est inférieure à 20%

- **La justesse :**

D'après les résultats obtenus au tableau, on remarque bien que la méthode est bien juste. En effet la valeur moyenne de la justesse est supérieure à 80% et la valeur moyenne du biais est inférieure à 20%.

- **La limite de détection et la limite de quantification :**

La limite de détection et la limite de quantification sont calculées à partir de la droite de régression (figure 7) en traçant les concentrations théoriques en fonction de la moyenne des concentrations observées :

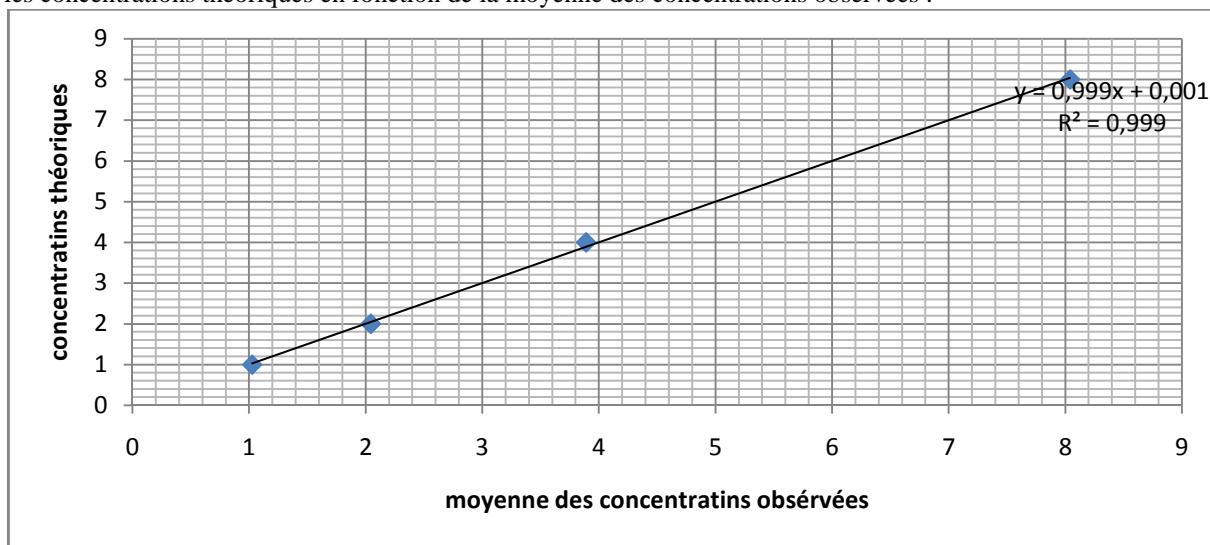


Figure 10 : droite de régression (concentration théorique en fonction de concentration observée)

$$LDD = \frac{(b + (3 \times Sb))}{a} ; \quad LDD = 0.0246 \mu\text{g/ml}$$

$$LDQ = \frac{(b + (10 \times Sb))}{a} ; \quad LDQ = 0.0906 \mu\text{g/ml}$$

IV. Application clinique chez le malade sous traitement

Pour une meilleure adaptation posologie des patients diabétiques traités par la Metformine, les prélèvements sont acheminés vers le laboratoire dans le but d'effectuer un dosage de cette molécule.

Les concentrations trouvées sont comparées à la zone thérapeutique connue du médicament :

- La concentration plasmatique \Rightarrow 0 à 1,35 $\mu\text{g/ml}$





- La concentration érythrocytaire \Rightarrow 0 à 1,65 $\mu\text{g/ml}$

• Résultats du dosage plasmatique :

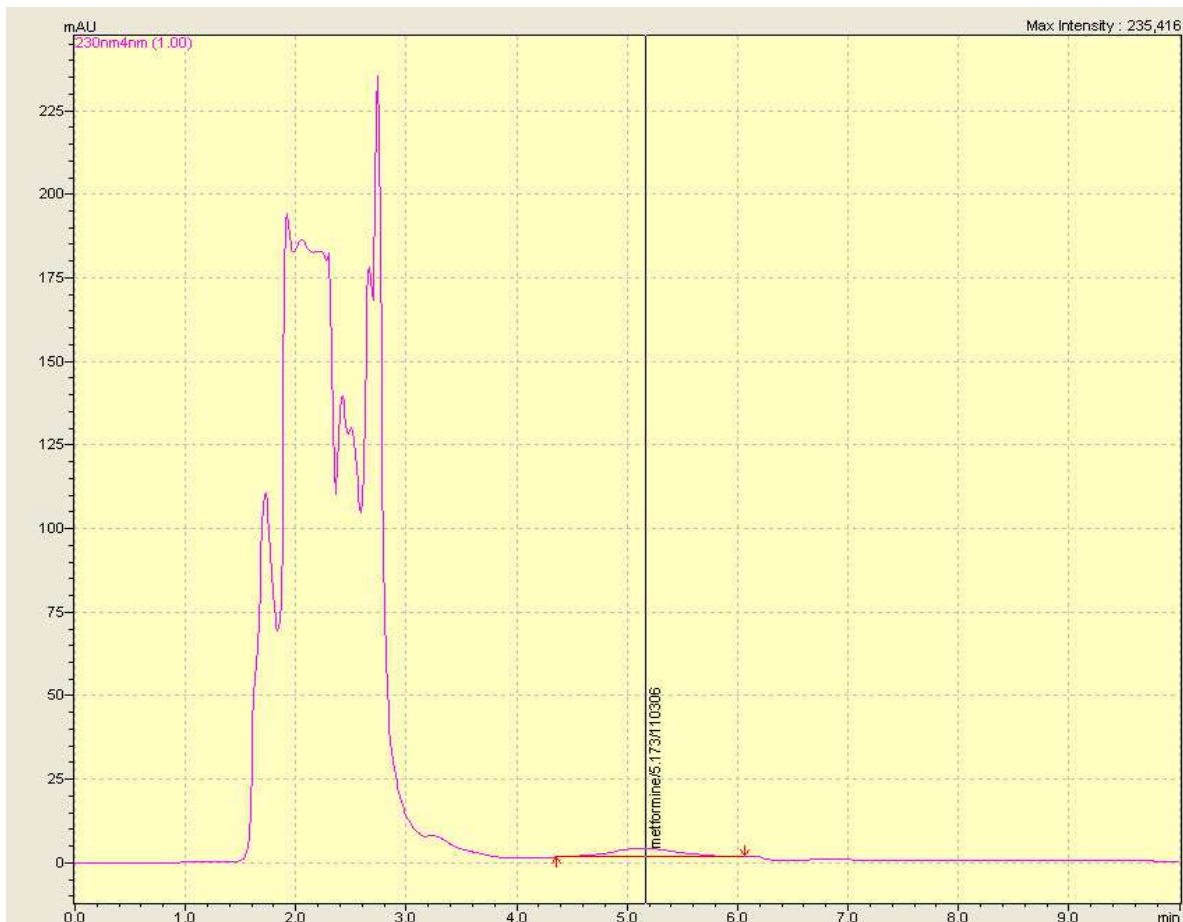


Figure 11 : chromatogramme d'un dosage plasmatique d'un patient traité par la Metformine

ID#	Name	Conc.	Units	Ret. Time	Channel	Area
1	metformine	2.06012	$\mu\text{g/mL}$	5.173	Ch1 230nm	110306

Tableau III : Résultats du dosage plasmatique du patient

• Résultats du dosage érythrocytaire :



Figure 12 : chromatogramme du dosage érythrocytaire du même patient

ID#	Name	Conc.	Units	Ret. Time	Channel	Area
1	metformine	1.29781	µg/mL	5.172	Ch1 230nm	69489

Tableau IV : Résultats du dosage érythrocytaire du patient

L'analyse de ces résultats montre bien qu'il faut diminuer la dose de la Metformine prescrite par le médecin afin d'éviter tout effet indésirable ; en effet la concentration plasmatique dépasse de loin la valeur maximale de la fourchette thérapeutique.

CONCLUSION

La validation de notre méthode de dosage s'appuie sur une étude au travers de caractéristiques quantifiées et vérifiées. Ces caractéristiques ont démontré la performance de la méthode et ainsi constituent la structure d'un dossier de validation de la méthode dans le cadre d'une démarche qualité.



Le choix de la **HPLC** convient donc parfaitement pour le dosage de la Metformine plasmatique et globulaire, apportant une grande sélectivité et permettant une analyse rapide. La Metformine est éluée en moins de 6 min. La méthode que nous proposons est simple et linéaire, la limite de détection était de 0,0192 µg/ml et la limite de la quantification était de 0,056 µg/ml ce qui permet de d'analyser des faibles concentrations de la Metformine dans le sang.

La mise en place de cette nouvelle méthode de dosage de la Metformine, offre au médecin des résultats rapides, fiables, et précieux pour le suivi de l'évolution ou l'évaluation du traitement instauré pour le patient, en diminuant la gravité des effets indésirables, et aussi pour une meilleure adaptation de la dose administrée.

En conclusion, durant ce stage j'ai eu l'occasion d'approfondir mes connaissances scientifiques et participer à l'optimisation et la validation de la méthode de dosage de la Metformine par HPLC, réalisée pour la première fois, ici au CHU Hassan II de Fès.



Référence

- [1] <http://www.intercomsante57.fr/html/profsante/pdf/Les-anti-diabetiques-oraux.pdf>
- [2] <http://products.sanofi.ca/fr/glucophage.pdf>
- [3] M. Bouchoucha a, B. Uzzan b, R. Cohenc Metformin and digestive disorders
- [4] Lalau JD, Race JM. Lactic Acidosis in Metformin Therapy. *Drugs* 1999;58:(suppl.1):55-60.]
- [5] Robert F, Fendri S, Hary L, Lacroix C, Andréjak M, Lalau JD. Kinetics of plasma and erythrocyte metformin after acute administration in healthy subjects
- [6] Jean-Daniel Lalau, Jean-Michel Race. Acidose lactique chez le sujet diabétique traité par biguanide
- [7] http://hip.linde-gas.com/international/web/lg/spg/like35lgspg.nsf/docbyalias/anal_hplc
- [8] <http://www.pharmabolix.com/GLUCOPHAGE>
- [9] AFSSAPS : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
- [10] http://www.hellopro.fr/RESTEK_France-200938-profil-fr-societe.html
- [11] A.I.T FRANCE : GUIDE DES COLONNES HPLC ; Support et mode chromatographiques
- [12] <http://www.rocler.qc.ca/pdubreui/chromatographie/HPLC/chroma3.html>
- [13] Guide de Bonne Exécution des Analyses de Biologie Médicale (GBEA)
- [14] FDA Guidance for Industry --Analytical Procedures and Methods Validation --Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation» (Draft, August 2000)]
- [15] Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. Norme NF EN ISO/CEI 17025, mai 2000. § 5.4.5.1
- [16] http://www.ulpmmed.ustrasbg.fr/medecine/cours_en_ligne/e_cours/pharmaco/pdf/dcm3/DCEM3-Pharmaco_Chap18_ADO_2009.pdf
- [17] Guide de validation des méthodes de dosage biologique. SFSTP. STP Pharma. Prat. 2002 ; 12 (6) : 317-36
- [18] International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 27 octobre 1994
- [19] ICH harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: methodology Q2B. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 6 novembre 1996.
- [20] International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (2002) *Pure Appl. Chem.* 74(5) 835-855
- [21] <http://www.em-consulte.com/es/article/80210/kinetics-of-plasma-and-erythrocyte-metformin-after>
- [22] Laboratoires d'analyses de biologie médicale - Exigences particulières concernant la qualité et la compétence. Norme NF EN ISO 15189, octobre 2003. § 5.4.2
- [23] M. Feinberg. La Validation des Méthodes d'Analyse. Une Approche Chimométrique de l'Assurance Qualité au Laboratoire. Masson, Paris, France, 1996.
- [24] PROTOCOLE POUR LA VALIDATION D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE EN CHIMIE