



## Liste des publications

1. Assessing the Validity of an LC-MS/MS Method Using Uncertainty Profile as Decision Criterion to the Determination of Nevirapine in Human Plasma.  
Y.H. Benchekroun, B. Ihssane, F. Jhilal, O. H. Alami, R. El Hajji, T. Saffaj  
**Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2018, volume10 issue 9 : 106-115.**
2. Full validation using  $\beta$ -content,  $\gamma$ -confidence tolerance interval: Application for LC-MS/MS determination of Doxycycline in human plasma.  
H. Haidara, T. Saffaj, A. Tan, A. Bentama, W. Outmoulait, Y.H. Benchekroun, B. Ihssane  
**Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2017, Volume 168 : 89-95.**
3. An innovative strategy based on uncertainty profile for the validation of microbiological methods for counting enterobacteriaceae in foods.  
F. Jhilal, B. Ihssane, M. Sfaira, E.M. Hadrami, H.Bouchafra, S.S. Alaoui, Y.H. Benchekroun,  
H. Haidara, O.A. Hmidani, T. Saffaj,  
**International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2016, Volume 8, issue 4 : 252-258.**

## Communication Orales

- 1. Design space, design of experiment: improve robustness of assaying four authorized Phosphodiesterase type 5 inhibitors using UPLC method.**  
Y.H. Benchekroun, M. El Karbane, B. Ihssane, W. Outmoulait, H. Haidara, T. Saffaj.  
World Conference on Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2018, July 23-24 at Barcelona, Spain.
- 2. Nouvelles stratégie analytique pour lutter contre la contrefaçon des médicaments de trouble d'érection.**  
Y.H. Benchekroun, M. Elkarbane, B. Ihssane, K. Belafya, F. Jhilal, S.S. Alaoui, O.H. Alami, W. Outmoulait, H. Haidara, T. Saffaj.  
Les Ières Journées Pratiques Francophones des Sciences Analytiques, 27 et 28 avril 2017 à Marrakech.
- 3. Screening Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors to Combat Counterfeit Medicines.**  
Y.H. Benchekroun, M. Elkarbane, T. Saffaj, B. Ihssane, K. Belafya, F. Jhilal, S.S. Alaoui, O.H. Alami.  
Third International Conference on New Trends in Chemometrics and Applications, 2016, Antalya, Turkey.
- 4. A New Overall Uncertainty Approach for Validation: Application to an Alternative Microbiological Method.**  
S. Alaoui Sossé, T. Saffaj, B. Ihssane, F. Jhilal, H. Bouchafra, Y.H. Benchekroun, O.A. Hamedane.  
Third International Conference on New Trends in Chemometrics and Applications, 2016, Antalya, Turkey.
- 5. The Credibility of the Uncertainty Profile for the Validation of ICP-AES Procedure.**  
O. Alami Hamedane, T. Saffaj, B. Ihssane, S. Alaoui Sossé, Y.H. Benchekroun, F. Jhilal, R. El hajji.  
Third International Conference on New Trends in Chemometrics and Applications, 2016, Antalya, Turkey.
- 6. Ensuring the Quality of Drinking Water Using a New Overall Uncertainty Approach for Analytical Method Validation.**  
S. Alaoui Sossé, T. Saffaj, B. Ihssane, F. Jhilal, H. Bouchafra, Y.H. Benchekroun, O. A. Hamedane.  
Colloque International ERVD'4 «Eau, Recyclage et Valorisation des Déchets », à l'Université Al Akhawayn, les 26 et 27 octobre 2016, à Ifrane.
- 7. Uncertainty Profile; a Global Strategy for Validation and Estimation of Uncertainty: Application to a High-Performance Thin-Layer Chromatographic Method.**  
Y. H. Benchekroun, T. Saffaj, B. Ihssane, F. Jhilal, S. Alaoui Sossé, H. Bouchafra.  
6th International Conference and Exhibition on Analytical & Bioanalytical Techniques, 2015, September 01-03, Valencia, Spain.
- 8. Transfer of analytical methods using uncertainty as decision criterion.**  
F. Jhilal, T. Saffaj, B. Ihssane, S.S. Alaoui, H. Bouchafra, M. Sfaira, Y.H. Benchekroun.  
Chimimétrie XVI, Genève, le 21 Janvier 2015.
- 9. Using Uncertainty Profile Approach for Application to Analytical Method Validation**  
S. Alaoui Sossé, T. Saffaj, B. Ihssane, F. Jhilal, H. Bouchafra, Y.H. Benchekroun.  
1ère Rencontre Internationale de Chimie moléculaire, Chimimétrie et Applications.  
Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal les 29 et 30 Mai 2014.

## Communication affichées

- 1. Nouvelles application des outils chimiométriques pour lutter contre la contrefaçon des médicaments de trouble d'érection.**  
Y. H. Benchekroun, M. Elkarbane, B. Ihssane, W. Outmoulait, K. Belafya, T. Saffaj  
Congrès Chimiométrie 2017, 30 janvier au 1 février 2017, à Paris.
- 2. Application d'une Approche Globale pour la Validation et l'Estimation de l'Incertitude de Mesure d'une Méthode Microbiologique.**  
S.S. Alaoui, T. Saffaj, B. Ihssane, F. Jhilal, Y.H. Benchekroun, O.A. Hamedane, R. Elhajji.  
1ères Journées Pratiques Francophones des Sciences Analytiques (JPFSA), les 27 et 28 avril 2017, à Marrakech.
- 3. Ensuring the Quality of Drinking Water Using a New Overall Uncertainty Approach for Analytical Method Validation.**  
S.S. Alaoui, T. Saffaj, B. Ihssane, F. Jhilal, H. Bouchafra, Y.H. Benchekroun, O.A. Hamedane.  
Colloque International «Eau, Recyclage et Valorisation des Déchets », à l'Université Al Akhawayn, les 26 et 27 octobre 2016, à Ifrane.
- 4. SCREENING PHOSPHODIESTERASE TYPE 5 (PDE-5) INHIBITORS TO COMBAT COUNTERFEIT MEDICINES**  
Y.H. Benchekroun, M. El Karbane, T. Saffaj, B. Ihssane, K. Belafya, F. Jhilal, O.H. Alami.  
Les 5ème Journées Nationales sur la Chimie Verte : les 04 et 05 Novembre 2016, à Tétouan.
- 5. Uncertainty profile strategy applied on thin layer chromatography.**  
Y.H. Benchekroun, T. Saffaj, B. Ihssane, S. S. Alaoui, F. Jhilal, O.H. Alami, H. Bouchafra.  
Third Symposium on Analytical Chemistry for Sustainable Development -ACSD 2016- 11-12 May, Marrakech, Morocco.
- 6. Profil d'incertitude une nouvelle stratégie pour la validation analytique et l'estimation de l'incertitude de mesure : application à la chromatographie en phase liquide à haute performance**  
Y.H. Benchekroun, H. Bouchafra, H. HAIDARA, O.H. Alami, S.S. Alaoui, F. Jhilal, M. EL ELHADRAMI, B. Ihssane, T. Saffaj.  
Congrès international sur le dosage des médicaments : validation analytique et application clinique, du 11 au 13 juin 2015, à Fès.
- 7. Application d'une Approche Globale de L'incertitude pour la Validation d'une Méthode Bioanalytique.**  
S.S. Alaoui, T. Saffaj, B. Ihssane, F. Jhilal, H. Bouchafra, Y. H. Benchekroun, O.A. Hamedane.  
Congrès international sur le dosage des médicaments : validation analytique et application clinique, du 11 au 13 juin 2015, à Fès.
- 8. Using uncertainty profile as new approach in analytical method transfer.**  
F. Jhilal, T. Saffaj, B. Ihssane, S. Alaoui Sosse, H. Bouchafra, M. Sfaira, Y.H. Benchekroun.  
1ère rencontre internationale de chimie moléculaire, chimiométrie et applications (RIMCA 2014), 29 & 30 May, BniMellal.

*À ma petite famille*

*À mes frères Mohammed et Imade*

### Remerciements

Au terme de ce travail, je voudrais remercier toutes les personnes qui, d'une manière directe ou indirecte, ont contribué à sa réalisation.

Je tiens à exprimer au Professeur Taoufiq SAFFAJ, mes remerciements les plus sincères pour la grande patience et l'entière disponibilité dont il a fait preuve à mon égard tout au long de la préparation de cette thèse. Sa direction rigoureuse, sa vision scientifique, ses judicieuses directives, ses encouragements énergisants lors des dynamiques séances de travail ont permis le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail de thèse.

Mes remerciements sont également adressés au Professeur El Mestafa EL HADRAMI, Directeur du Centre des Études Doctorales à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, d'avoir accepté de présider ma soutenance malgré ses préoccupations nombreuses, et de juger cette thèse dans sa globalité.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Monsieur Mohamed MBARKI, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal, Monsieur Mohamed NOHAIR, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia, et Monsieur Youssef KANDRI RODI, Professeur à la faculté des sciences et techniques de Fès en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail. Je suis très heureux de bénéficier de leurs observations et je tiens à leur exprimer ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.

Je remercie sincèrement le Professeur Bouchaib IHSSANE d'avoir accepté de juger mon travail en tant qu'examineur. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour son encadrement sans faille, pour ses recommandations et avis judicieux durant nos séances de travail. Je le remercie également pour toutes ses suggestions, son soutien et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce projet.

Je suis extrêmement reconnaissant à Monsieur Abdellah FARAH Professeur à la faculté des sciences et techniques de Fès et Monsieur Hicham ZAITAN Professeur à la faculté des sciences et techniques de Fès d'avoir examiné mon travail.

Je tiens également à remercier Professeur Miloud EL KARBANE, de m'avoir accueilli chaleureusement au sein du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments. Ses compétences et sa disponibilité ont joué un rôle décisif dans la réalisation d'une grande partie de ce travail.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse tous mes sentiments de reconnaissance à ma famille ; mes parents, mes frère Mohammed et Imade. Je ne saurais terminer sans adresser une pensée à mes amis qui m'ont été, chacun à sa manière, une source d'inspiration et d'énergie. Fayssal Jhilal, Houda Bouchafra, Saad ALAOUI SOSSE, Omar ALAMI HAMEDAN, Ridouan El HAJJI, et Hasnaa HAIDARA.

### Résumé

La contrefaçon des médicaments est un problème d'ampleur mondiale dont les répercussions sont importantes sur le plan social et économique. Au Maroc, la famille thérapeutique des troubles de l'érection constitue la principale classe des médicaments contrefaits. En vue de lutter contre ce fléau, le développement de méthodes analytiques spécifiques et de screening rapides des contrefaçons pharmaceutiques s'avère indispensable.

Dans ce contexte, ce mémoire de thèse a été consacré, au développement d'une nouvelle méthode UPLC rapide et fiable pour la détermination en temps réel de quatre substances inhibitrices de la Phosphodiesterase type-5 (PDE-5i) dans les médicaments falsifiés.

Au premier abord, la méthodologie des plans d'expériences et le design space recommandé par ICH Q8 ont été exploités côte à côte, en phase de développement, pour définir les paramètres optimaux ainsi que le domaine de robustesse de la méthode chromatographique. Une haute résolution entre les chromatogrammes des quatre principes actifs PDE-5i et un temps d'analyse inférieur à 1.6 min ont été obtenus au terme de cette phase d'optimisation.

Par ailleurs, les profils d'incertitude et de risque dérivés à partir de l'intervalle de tolérance ont été investigués, en phase de validation, pour trancher sur la performance de ladite méthode. Ultérieurement, notre procédure a été appliquée avec succès, en phase de routine, à l'identification de 23 formulations médicamenteuses illicites de trouble de l'érection.

D'autre part, nous avons mis en exergue l'applicabilité et la flexibilité du profil d'incertitude à statuer sur la validité de différentes techniques analytiques destinées à combattre la falsification des médicaments.

**Mots Clés :** Médicament Contrefait ; PDE-5i ; UPLC ; Plan d'expérience ; Design space ; Profil d'incertitude ; Profil de risque ; Techniques analytiques.

### Abstract

Counterfeit medicines are a global problem with significant social and economic repercussions. In Morocco, the therapeutic family of erectile dysfunction is the main class of counterfeit medicines. In order to combat this scourge, the development of specific analytical methods and rapid screening of pharmaceutical counterfeits is essential.

In this context, this dissertation was devoted to the development of a new rapid and reliable UPLC method for the real-time determination of four phosphodiesterase type-5 (PDE-5i) inhibitory substances in falsified drugs.

At first glance, the experimental design methodology and space design recommended by ICH Q8 were exploited side by side, in the development phase, to define the optimal parameters as well as the robustness domain of the chromatographic method. A high resolution between the chromatograms of the four active ingredients PDE-5i and an analysis time of less than 1.6 min were obtained at the end of this optimization phase.

Moreover, the uncertainty and risk profiles derived from the tolerance interval were investigated, during the validation phase, to decide on the performance of this method. Subsequently, our procedure was successfully applied, in the routine phase, to the identification of 23 illicit drug formulations of erectile dysfunction.

On the other hand, we have highlighted the applicability and flexibility of the uncertainty profile to rule on the validity of different analytical techniques designed to combat the falsification of drugs.

**Keywords :** Counterfeit drug ; PDE-5i ; UPLC ; Design of experiment ; Design space ; Uncertainty profile ; Risk profile ; Analytical techniques.

## Liste des Symboles

|                   |                                                           |                      |                                                                   |
|-------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Y                 | Réponse analytique                                        | $\hat{\sigma}_{r,k}$ | Ecart type de répétabilité                                        |
| $\Delta$          | Manque d'ajustement                                       | $\hat{\sigma}_{F,i}$ | Ecart type de la fidélité intermédiaire                           |
| E                 | Erreur aléatoire ou expérimentale                         | $SS_b$               | Somme des carrés des écarts inter-série                           |
| N                 | Nombres d'essais du plan Box-Behnken                      | $SS_e$               | Somme des carrés des écarts intra-série                           |
| $f_n$             | Nombres de facteurs                                       | $CM_b$               | Carré moyen inter-série                                           |
| $n_e$             | Nombres de répétitions au centre                          | $CM_e$               | Carré moyen intra-série                                           |
| $d_i$             | Fonction de désirabilité                                  | $\hat{\sigma}_m^2$   | Variance totale                                                   |
| $\pi_{DS}$        | Probabilité de succès dans un espace de robustesse        | $\chi_F; \beta^2(h)$ | Quantile d'une distribution Khi-deux non centrale                 |
| CV                | Coefficient de variation                                  | $Y_i$                | Mesure                                                            |
| $H_0$             | Hypothèse nulle                                           | $\bar{Y}$            | Moyenne de mesure analytique                                      |
| $H_1$             | Hypothèse alternative                                     | $\hat{Y}_i$          | Valeur expliqué ou estimée par le modèle                          |
| $\alpha$          | Niveau de signification d'un test                         | $\nu, f, ddl$        | Degré de liberté                                                  |
| $\lambda$         | Limite d'acceptabilité                                    | $u(Y_i)$             | Incertitude de mesure                                             |
| $\beta$           | Proportion des résultats conformes                        | $u(\delta)$          | Incertitude type associée au biais de la méthode                  |
| $\gamma$          | Niveau de confiance                                       | $\pi_{pr}$           | Probabilité de futur résultat en dehors des limites d'acceptation |
| $\mu_T$           | Valeur vraie d'une mesure                                 | p-value              | Probabilité de significativité                                    |
| i                 | Indice de série                                           | Rs                   | Résolution                                                        |
| j                 | Indice de répétition                                      | Tr                   | Temps de rétention                                                |
| k                 | Indice de niveau                                          | $E_x$                | Effet de facteur                                                  |
| r                 | Nombre de répétitions                                     | $E_{critique}$       | Signification d'effet                                             |
| s                 | Nombre de séries                                          | $E_{er}$             | Erreur type estimée sur un effet                                  |
| C                 | Nombre de niveaux                                         | $t_{critique}$       | Quantile de Student                                               |
| R                 | Coefficient de corrélation                                |                      |                                                                   |
| $R^2$             | Coefficient de détermination                              |                      |                                                                   |
| $f(\bar{x}_{ik})$ | Fonction de réponse considérée (concentration moyenne)    |                      |                                                                   |
| $f(x_{ikj})$      | Fonction de réponse considérée (concentration introduite) |                      |                                                                   |
| $y_{ikj,c}$       | Réponse calculée                                          |                      |                                                                   |
| $y_{ikj}$         | Réponse obtenue                                           |                      |                                                                   |
| $f^{-1}(Y)$       | Equation de prédiction inverse                            |                      |                                                                   |
| $\hat{\mu}_k$     | Moyenne des concentrations calculées                      |                      |                                                                   |

### Liste des Abréviations

|                                                                               |                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| ACN : Acétonitrile.                                                           | MLS : Modified Large Simple.                                                     |
| ANOVA : Analyse de la variance.                                               | NIR : Spectroscopie proche infrarouge.                                           |
| BPF : Bonnes pratiques de fabrication.                                        | OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Économiques.              |
| CEDR : Centre d'évaluation des médicaments et de recherche.                   | OMPIC : Office Marocain de la Propriété Industrielle et Commerciale.             |
| CM : Contrefaçon des médicaments.                                             | OMS : Organisation Mondiale de Santé.                                            |
| CONPIAC : Comité national pour la propriété industrielle et anti-contrefaçon. | ONU : Organisation des Nations Unies.                                            |
| CPG : Chromatographie phase gazeuse.                                          | ONUDC : Office des Nations Unies contre la drogue et le crime.                   |
| CQA : Critical quality attributes                                             | OVAT : One Variable at time.                                                     |
| DoE : Design of experiment.                                                   | OVD : Optically Variable Devices.                                                |
| DS : Design space.                                                            | OVI : Optically Variable Inks.                                                   |
| FTN : Flow-Through Needle.                                                    | PDA : Photodiode Array.                                                          |
| GMP : Good Manufacturing practices.                                           | PSI : Institut de Sécurité Pharmaceutique.                                       |
| HPLC : Chromatographie liquide a haute performance.                           | R&D : Recherche et Développement.                                                |
| IFPMA : Fédération Internationale des Industries du Médicament.               | RSM : Response Surface Methodology.                                              |
| IMPACT : International Medical Products Anti-Counterfeiting Taskforce.        | SE : Standards d'étalonnage.                                                     |
| ISO : Organisation Internationale de standardisation.                         | SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques pharmaceutiques.            |
| ITA : Intervalles de tolérances absolues.                                     | SNC : Système Nerveux Central.                                                   |
| J.-C : Jésus-Christ.                                                          | SV : Standards de validation.                                                    |
| LC : Chromatographie liquide.                                                 | UE : Union Européenne.                                                           |
| LCAC : Laboratoire Central d'Analyse des Contrefaçons.                        | UPLC : Chromatographie liquide ultra performante.                                |
| LD : Limite de détection.                                                     | VAM : Valid Analytical Measurement.                                              |
| LIR : Limites d'incertitude relative.                                         | VIH : Virus de l'immunodéficience humaine.                                       |
| LNCM : Laboratoire national de contrôle de médicament.                        | $\beta$ -ETI : $\beta$ -expectation tolerance interval.                          |
| LQ : Limite de quantification.                                                | $\beta\gamma$ -CCTI : $\beta$ -content, $\gamma$ -confidence tolerance interval. |

## Liste des Tableaux

|                      |                                                                                                                                                                |           |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Chapitre I.</b>   | <b>Phénomène de la contrefaçon.....</b>                                                                                                                        | <b>14</b> |
| Tableau I-1          | : Dates clés dans l’histoire de la contrefaçon.....                                                                                                            | 18        |
| Tableau I-2          | : Exemples de contrefaçon de produits de santé dans le monde [6] .....                                                                                         | 27        |
| Tableau I-3          | : liste de contrôle utilisé pour l’examen visuel.....                                                                                                          | 33        |
| Tableau I-4          | : Technique analytique utilisée pour la caractérisation des médicaments contrefaits.....                                                                       | 44        |
| Tableau I-5          | : Conditions expérimentales utilisées pour la caractérisation des inhibiteurs de la PDE-5.....                                                                 | 47        |
| <b>Chapitre II.</b>  | <b>Approches chimiométriques pour la lutte contre la contrefaçon.....</b>                                                                                      | <b>50</b> |
| Tableau II-1         | : Classification des plans d’expériences [85] .....                                                                                                            | 56        |
| Tableau II-2         | : Plan de Box-Behnken à 3 niveaux et 3 facteurs.....                                                                                                           | 59        |
| Tableau II-3         | : Classification des critères de validation selon le type d’analyse (-) caractère non évalué (+) caractère évalué.....                                         | 65        |
| Tableau II-4         | : Organisation des mesures de validation et de calibration.....                                                                                                | 78        |
| Tableau II-5         | : Modèles usuels de fonctions d’étalonnages pour la prédiction inverse des concentrations [100] .....                                                          | 79        |
| Tableau II-6         | : Règles d’alignement pour différentes fonctions de réponses.....                                                                                              | 81        |
| <b>Chapitre III.</b> | <b>Développement et validation d’une nouvelle méthode UPLC pour lutter contre la contrefaçon des médicaments de trouble d’érection.....</b>                    | <b>94</b> |
| Tableau III-1        | : Facteurs indépendants et niveaux de variation retenus pour l’étude d’optimisation par le plan de Box-Behnken pour le dosage de quatre substances PDE-5i..... | 99        |
| Tableau III-2        | : Plan expérimental de <i>Box-Behnken</i> pour le dosage des substances PDE-5i.....                                                                            | 100       |
| Tableau III-3        | : Analyse de variance restituée par le modèle quadratique pour le temps de rétention.....                                                                      | 100       |
| Tableau III-4        | : Analyse de variance restituée par le modèle quadratique pour la résolution 1.....                                                                            | 101       |
| Tableau III-5        | : Analyse de variance restituée par le modèle quadratique pour la résolution 2.....                                                                            | 101       |
| Tableau III-6        | : Analyse de variance restituée par le modèle quadratique pour la résolution 3.....                                                                            | 101       |
| Tableau III-7        | : Résidus entre les valeurs observées et les valeurs prévues pour le temps de rétention.....                                                                   | 103       |
| Tableau III-8        | : Résidus entre les valeurs observées et les valeurs prévues pour la résolution 1.....                                                                         | 103       |
| Tableau III-9        | : Résidus entre les valeurs observées et les valeurs prévues pour la résolution 2.....                                                                         | 104       |
| Tableau III-10       | : Résidus entre les valeurs observées et les valeurs prévues pour la résolution 3.....                                                                         | 104       |
| Tableau III-11       | : Effets des coefficients des modèles reliant le temps de rétention aux facteurs.....                                                                          | 106       |
| Tableau III-12       | : Effets des coefficients des modèles reliant la résolution 1 aux facteurs.....                                                                                | 107       |

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                    |            |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Tableau III-13      | : Effets des coefficients des modèles reliant la résolution 2 aux facteurs.....                                                                                                                                                                    | 107        |
| Tableau III-14      | : Effets des coefficients des modèles reliant la résolution 3 aux facteurs.....                                                                                                                                                                    | 107        |
| Tableau III-15      | : Facteurs Influent et variation expliqué par les modèles pour quatre réponses.....                                                                                                                                                                | 109        |
| Tableau III-16      | : Estimation des effets de facteurs par le plan de Plackett-Burman (analyse statistique) .....                                                                                                                                                     | 112        |
| Tableau III-17      | : Test d'aptitude du système analytique (CV<2%).....                                                                                                                                                                                               | 115        |
| Tableau III-18      | : Protocole expérimental des standards de calibration.....                                                                                                                                                                                         | 117        |
| Tableau III-19      | : Protocole expérimental des standards de validation.....                                                                                                                                                                                          | 117        |
| Tableau III-20      | : Modèles de régression retenus pour l'évaluation des critères de la validation analytique.....                                                                                                                                                    | 129        |
| Tableau III-21      | : Résultats de la fidélité et la justesse pour une méthode de dosage des PDE-5.....                                                                                                                                                                | 131        |
| Tableau III-22      | : Résultats de la validation analytique du dosage des (PDE-5) par UPLC-DAD dans une matrice pharmaceutique en utilisant le profil d'incertitude.....                                                                                               | 132        |
| Tableau III-23      | : Valeurs estimées de la Limite de Quantification pour les quatre (PDE-5i) .....                                                                                                                                                                   | 133        |
| Tableau III-24      | : Taux de récupération des substances actif dans des échantillons contrefaits.....                                                                                                                                                                 | 136        |
| <b>Chapitre IV.</b> | <b>Capacité du profil d'incertitude à statuer sur la validité des méthodes destinées à l'analyse des médicaments contrefaits.....</b>                                                                                                              | <b>139</b> |
| Tableau IV-1        | : Paramètres de validation de la Méthode Spectrophotométrique UV-Visible pour le dosage de la Quinine sulfate dans la forme (comprimé) .....                                                                                                       | 141        |
| Tableau IV-2        | : Résultats de validation de la méthode Spectrophotométrique UV-Visible pour la détermination de la Quinine sulfate (comprimé) le profil d'incertitude ( $\beta=66.7\%$ et $90\%$ , $\gamma=95\%$ ). (Limite d'acceptabilité $\lambda=10\%$ )..... | 142        |
| Tableau IV-3        | : Valeurs d'incertitude élargie de la méthode Spectrophotométrique UV-Visible pour la détermination de la Quinine sulfate.....                                                                                                                     | 142        |
| Tableau IV-4        | : Paramètres de validation de la Méthode spectroscopique NIR pour le dosage de la Quinine dihydrochloride.....                                                                                                                                     | 144        |
| Tableau IV-5        | : Valeurs d'incertitude élargie de la méthode de détermination de la Quinine dihydrochloride.....                                                                                                                                                  | 146        |
| Tableau IV-6        | : Résultats de validation de la méthode de détermination de la Quinine dihydrochloride par le profil d'incertitude.....                                                                                                                            | 145        |
| Tableau IV-7        | : Paramètres de validation de la méthode GC-MS pour la détermination des solvants résiduels.....                                                                                                                                                   | 148        |
| Tableau IV-8        | : Résultats de validation de la Méthode GC-MS. ( $\beta$ -Expectation tolérance intervalle ( $\beta=66.7\%$ )).....                                                                                                                                | 149        |
| Tableau IV-9        | : Résultats de la validation analytique de la Méthode GC-MS pour la caractérisation des solvants résiduels par le profil d'incertitude.....                                                                                                        | 152        |
| Tableau IV-10       | : Paramètres de validation de la méthode de dosage céftriaxone et sulbactame.....                                                                                                                                                                  | 154        |

## Liste des Tableaux

---

|               |                                                                                                                                                                    |     |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau IV-11 | : Résultats de validation du dosage de la céftriaxone et sulbactam par le profil d'exactitude. ( $\beta$ - Expectation tolérance intervalle ( $\beta=95\%$ ))..... | 155 |
| Tableau IV-12 | : Résultats de la validation analytique de la Méthode de dosage céftriaxone par le profil d'incertitude.....                                                       | 157 |
| Tableau IV-13 | : Résultats de la validation analytique de la Méthode de dosage sulbactam par le profil d'incertitude.....                                                         | 158 |

## Liste des Figures

|                     |                                                                                                                                                                                                             |           |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Chapitre I.</b>  | <b>Phénomène de la contrefaçon.....</b>                                                                                                                                                                     | <b>17</b> |
| Figure I-1          | : Aspect de médicaments contrefaits.....                                                                                                                                                                    | 22        |
| Figure I-2          | : Exemple de cas de contrefaçon par imitation de la spécialité PLAVIX®.....                                                                                                                                 | 23        |
| Figure I-3          | : Exemple de cas de contrefaçon par reproduction de la spécialité VIAGRA®.....                                                                                                                              | 23        |
| Figure I-4          | : Provenance principale des produits contrefaits et piratés [15].....                                                                                                                                       | 24        |
| Figure I-5          | : Secteurs touchés par la contrefaçon au Maroc.....                                                                                                                                                         | 25        |
| Figure I-6          | : Code-barres matriciel Datamatrix (gauche) et transpondeur RFID (droite).....                                                                                                                              | 30        |
| Figure I-7          | : Exemple de conditionnement primaire et secondaire destiné à la protection de l'authenticité d'un médicament (étiquette de sureté, boîte pré-perforé, étiquette multicouche, bague d'invulnérabilité)..... | 30        |
| Figure I-8          | : Comparaison du conditionnement d'un échantillon de la spécialité DUO-COTECXIN (d'après [38]).....                                                                                                         | 34        |
| Figure I-9          | : Différentes teintes de couleur de comprimé observées pour des échantillons de Viagra®. L'échantillon authentique est indiqué par le cercle vert (d'après [39]).....                                       | 35        |
| Figure I-10         | : Thermogrammes de comprimés a) authentique et b) contrefaits de la spécialité viagra [41].....                                                                                                             | 35        |
| Figure I-11         | : Spectres Raman standard de deux tablettes dans l'intervalle spectral 320–1720 cm <sup>-1</sup> : comparaison des données brutes provenant du mélange C (noir) et du mélange D (rouge) (d'après [44])..... | 37        |
| Figure I-12         | : Discrimination de comprimés contrefaits et de comprimés authentiques par analyse ACP (d'après [46]).....                                                                                                  | 38        |
| Figure I-13         | : Spectre de la XRF de comprimés de Viagra® authentique (a) et de comprimés de Viagra® contrefaits (b, c et d) (d'après [46]).....                                                                          | 39        |
| Figure I-14         | : Identification de la sulfaméthoxazole dans un comprimé suspect par CCM (d'après [49]).....                                                                                                                | 40        |
| Figure I-15         | : Chromatogramme obtenu d'un échantillon authentique et contrefait de Viagra par CPG.....                                                                                                                   | 41        |
| Figure I-16         | : Chromatogrammes d'un comprimé contrefait de Viagra (A) et d'un comprimé authentique (B) (d'après [54]).....                                                                                               | 42        |
| Figure I-17         | : Spectres RMN DOSY de formulations authentique (à gauche) et contrefaite (à droite) de Viagra (d'après [56]).....                                                                                          | 43        |
| Figure I-18         | : Stratégie appliquée pour la détection et la classification des échantillons suspects contenant PDE5-i [57].....                                                                                           | 46        |
| <b>Chapitre II.</b> | <b>Approches chimiométriques pour la lutte contre la contrefaçon.....</b>                                                                                                                                   | <b>50</b> |
| Figure II-1         | : Cycle de vie d'une méthode analytique [77].....                                                                                                                                                           | 52        |
| Figure II-2         | : Plan de Box-Behnken à trois facteurs.....                                                                                                                                                                 | 58        |
| Figure II-3         | : Désirabilité (di) d'une réponse Yi pour un facteur considéré [91].....                                                                                                                                    | 60        |
| Figure II-4         | : Représentation schématisée de l'espace de robustesse (DS) [94].....                                                                                                                                       | 62        |
| Figure II-5         | : Représentation tridimensionnelle du DS réalisant des CQA prédéfinis avec une probabilité $\pi \geq 95\%$ (d'après [96]).....                                                                              | 63        |

|                      |                                                                                                                                                                                                          |           |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Figure II-6          | : Représentation bidimensionnelle du DS (d'après [97]).....                                                                                                                                              | 63        |
| Figure II-7          | : Composantes de la fidélité: répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité.....                                                                                                              | 67        |
| Figure II-8          | : Méthodologie de validation analytique par les approches classiques (d'après [100]).....                                                                                                                | 69        |
| Figure II-9          | : Règles de décisions selon l'approche de validation analytique par différence.....                                                                                                                      | 70        |
| Figure II-10         | : Illustration de la méthodologie de la validation analytique basée sur un critère unique (d'après [100]).....                                                                                           | 72        |
| Figure II-11         | : Illustration d'un profil d'exactitude.....                                                                                                                                                             | 73        |
| Figure II-12         | : Représentation schématique des sources d'erreurs selon le concept d'erreur totale.....                                                                                                                 | 74        |
| Figure II-13         | : Présentation du profil d'incertitude.....                                                                                                                                                              | 75        |
| Figure II-14         | : Exemple de distributions de résidus (valeurs trouvées - valeurs attendues) obtenues pour différents modèles d'étalonnage.....                                                                          | 80        |
| Figure II-15         | : Présentation du profil de risque.....                                                                                                                                                                  | 93        |
| <b>Chapitre III.</b> | <b>Développement et validation d'une nouvelle méthode UPLC pour lutter contre la contrefaçon des médicaments de trouble d'érection...</b>                                                                | <b>94</b> |
| Figure III-1         | : Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs estimées pour (le temps de rétention, la résolution 1, la résolution 2 et la résolution 3).....                                                   | 102       |
| Figure III-2         | : À Gauche : graphe de dispersion des valeurs de résidus, à droite : courbe d'Henry pour la vérification de normalité du Temps de rétention.....                                                         | 105       |
| Figure III-3         | : À Gauche : graphe de dispersion des valeurs de résidus, à droite : courbe d'Henry pour la vérification de normalité de la Résolution 1..                                                               | 105       |
| Figure III-4         | : À Gauche : graphe de dispersion des valeurs de résidus, à droite : courbe d'Henry pour la vérification de normalité de la Résolution 2..                                                               | 105       |
| Figure III-5         | : À Gauche : graphe de dispersion des valeurs de résidus, à droite : courbe d'Henry pour la vérification de normalité de la Résolution 3..                                                               | 106       |
| Figure III-6         | : Profil de désirabilité pour identifier les réponses Optimales. (Performance maximale d=1, (pH=3.30, %ACN=31 et débit=0.635))                                                                           | 110       |
| Figure III-7         | : Espace de robustesse représentant la zone robuste de toutes les réponses sélectionnées par rapport aux trois facteurs indépendants (le pH de la solution tampon X1 et le débit X3), avec % ACN=31..... | 111       |
| Figure III-8         | : Graphique des quantiles demi-normaux pour l'estimation des effets de chaque facteur sur les réponses.....                                                                                              | 113       |
| Figure III-9         | : Chromatogramme obtenu lors du dosage de quatre substances inhibitrices de la PDE-5i dans des les conditions optimales.....                                                                             | 114       |
| Figure III-10        | : Chromatogramme typique de l'analyse de standard d'étalonnage, de validation et la phase mobile.....                                                                                                    | 115       |
| Figure III-11        | : Intervalle de dosage de sildénafil 0.002 à 0.006 mg/ml.....                                                                                                                                            | 116       |
| Figure III-12        | : Intervalle de dosage de vardénafil 0.002 à 0.006 mg/ml.....                                                                                                                                            | 116       |
| Figure III-13        | : Intervalle de dosage de udénafil 0.002 à 0.006 mg/ml.....                                                                                                                                              | 116       |
| Figure III-14        | : Intervalle de dosage de tadalafil 0.002 à 0.006 mg/ml.....                                                                                                                                             | 117       |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure III-15 | : Plans d'étalonnage et de validation du composé sildénafile. Les réponses de validation sont représentées par des carrés noirs, celles d'étalonnage par cercle jaune.....                                                                                                                                                                                          | 118 |
| Figure III-16 | : Plans d'étalonnage et de validation du composé vardénafile. Les réponses de validation sont représentées par des carrés noirs, celles d'étalonnage par cercle jaune.....                                                                                                                                                                                          | 118 |
| Figure III-17 | : Plans d'étalonnage et de validation du composé udénafile. Les réponses de validation sont représentées par des carrés noirs, celles d'étalonnage par cercle jaune.....                                                                                                                                                                                            | 118 |
| Figure III-18 | : Plans d'étalonnage et de validation du composé udénafile. Les réponses de validation sont représentées par des carrés noirs, celles d'étalonnage par cercle jaune.....                                                                                                                                                                                            | 119 |
| Figure III-19 | : Distribution de résidus obtenus pour différents modèles d'étalonnage pour la substance sildénafile. (A) Modèle linéaire simple, (B) Modèle 0-Max, (C) Modèle linéaire quadratique, (D) Modèle linéaire simple pondéré, (E) Modèle quadratique pondéré, (F) Modèle linéaire après transformation racine carrée.....                                                | 120 |
| Figure III-20 | : Distribution de résidus obtenus pour différents modèles d'étalonnage pour la substance vardénafile. (A) Modèle linéaire simple, (B) Modèle 0-Max, (C) Modèle linéaire quadratique, (D) Modèle linéaire simple pondéré, (E) Modèle quadratique pondéré, (F) Modèle linéaire après transformation racine carrée.....                                                | 121 |
| Figure III-21 | : Distribution de résidus obtenus pour différents modèles d'étalonnage pour la substance udénafile. (A) Modèle linéaire simple, (B) Modèle 0-Max, (C) Modèle linéaire quadratique, (D) Modèle linéaire simple pondéré, (E) Modèle quadratique pondéré, (F) Modèle linéaire après transformation racine carrée.....                                                  | 122 |
| Figure III-22 | : Distribution de résidus obtenus pour différents modèles d'étalonnage pour la substance tadalafil. (A) Modèle linéaire simple, (B) Modèle 0-Max, (C) Modèle linéaire quadratique, (D) Modèle linéaire simple pondéré, (E) Modèle quadratique pondéré, (F) Modèle linéaire après transformation racine carrée.....                                                  | 123 |
| Figure III-23 | : Evaluation des limites d'incertitude à l'intérieur des limites d'acceptabilité pour différents modèles d'étalonnage pour la substance sildénafile. (A) Modèle linéaire simple, (B) Modèle 0-Max, (C) Modèle linéaire quadratique, (D) Modèle linéaire simple pondéré, (E) Modèle quadratique pondéré, (F) Modèle linéaire après transformation racine carrée..... | 125 |
| Figure III-24 | : Evaluation des limites d'incertitude à l'intérieur des limites d'acceptabilité pour différents modèles d'étalonnage pour la substance vardénafile. (A) Modèle linéaire simple, (B) Modèle 0-Max, (C) Modèle linéaire quadratique, (D) Modèle linéaire simple pondéré, (E) Modèle quadratique pondéré, (F) Modèle linéaire après transformation racine carrée..... | 126 |
| Figure III-25 | : Evaluation des limites d'incertitude à l'intérieur des limites d'acceptabilité pour différents modèles d'étalonnage pour la substance udénafile. (A) Modèle linéaire simple, (B) Modèle 0-Max, (C) Modèle linéaire quadratique, (D) Modèle linéaire simple pondéré, (E) Modèle quadratique pondéré, (F) Modèle linéaire après transformation racine carrée.....   | 127 |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure III-26 | : Evaluation des limites d'incertitude à l'intérieur des limites d'acceptabilité pour différents modèles d'étalonnage pour la substance tadalafil. (A) Modèle linéaire simple, (B) Modèle 0-Max, (C) Modèle linéaire quadratique, (D) Modèle linéaire simple pondéré, (E) Modèle quadratique pondéré, (F) Modèle linéaire après transformation racine carrée..... | 128 |
| Figure III-27 | : Profil d'incertitude du dosage des (PDE-5) par UPLC-DAD dans une matrice pharmaceutique. (A : Sildénafil, B : Vardénafil, C : Udénafil et D : Tadalafil), (Fonction de réponse : linéaire simple), les limites d'acceptabilité définies à 10%.....                                                                                                              | 130 |
| Figure III-28 | : Profil de linéarité de la méthode UPLC pour la détermination de : Sildénafil (A)-Vardénafil (B)-Udénafil (C) et Tadalafil (D).....                                                                                                                                                                                                                              | 134 |
| Figure III-29 | : Profil de risque de la méthode UPLC-UV pour la détermination des quatre substances inhibitrice de la PDE-5 dans une matrice pharmaceutique pour la limite d'acceptabilité 5%. Le risque maximal toléré a été fixé à 5%. (A : Sildénafil, B : Vardénafil, C : Udénafil et D : Tadalafil).....                                                                    | 135 |
| Chapitre IV.  | Capacité du profil d'incertitude à statuer sur la validité des méthodes destinées à l'analyse des médicaments contrefaits.....                                                                                                                                                                                                                                    | 139 |
| Figure IV-1   | : Profil d'incertitude de la méthode de détermination de la Quinine sulfate (comprimé) (A) $\beta=66.7$ et $\gamma=95\%$ , (B) $\beta=90\%$ et $\gamma=95\%$ et (C) $\beta=90\%$ et $\gamma=95\%$ . (Limite d'acceptabilité $\lambda = \pm 10\%$ ).....                                                                                                           | 143 |
| Figure IV-2   | : Profil d'incertitude de la méthode de détermination de la Quinine dihydrochloride (A) : $\beta=66.7$ et $\gamma=95\%$ et (B) : $\beta=90\%$ et $\gamma=95\%$ . (Limite d'acceptabilité $\lambda = \pm 10\%$ ).....                                                                                                                                              | 146 |
| Figure IV-3   | : Profils d'exactitude la méthode GC-MS pour la caractérisation des solvants résiduels. (Limites d'acceptabilité $\lambda = \pm 10\%$ ).....                                                                                                                                                                                                                      | 150 |
| Figure IV-4   | : Profils d'incertitude la méthode GC-MS pour la caractérisation des solvants résiduels. (Limites d'acceptabilité $\lambda = \pm 10\%$ ).....                                                                                                                                                                                                                     | 153 |
| Figure IV-5   | : Profils d'exactitude de la méthode du dosage de A : céftriaxone et B : sulbactam. ( $\beta$ -Expectation tolérance intervalle ( $\beta=95\%$ )).....                                                                                                                                                                                                            | 155 |
| Figure IV-6   | ; Profils d'incertitude de la méthode de dosage de céftriaxone. (A : $\beta=95\%-\gamma=90\%$ , B : $\beta=90\%-\gamma=90\%$ , C : $\beta=66.7\%-\gamma=90\%$ ). (Limite d'acceptabilité $\lambda=\pm 5\%$ ).....                                                                                                                                                 | 157 |
| Figure IV-7   | : profils d'incertitude de la méthode de dosage de sulbactam. (A : $\beta=95\%-\gamma=90\%$ , B : $\beta=90\%-\gamma=90\%$ , C : $\beta=66.7\%-\gamma=90\%$ ). (Limite d'acceptabilité $\lambda=\pm 5\%$ ).....                                                                                                                                                   | 158 |

## Sommaire

|                                                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Liste des Symboles.....</b>                                                          | <b>1</b>  |
| <b>Liste des Abréviations.....</b>                                                      | <b>2</b>  |
| <b>Liste des Tableaux.....</b>                                                          | <b>3</b>  |
| <b>Liste des Figures.....</b>                                                           | <b>6</b>  |
| <b>Introduction Générale.....</b>                                                       | <b>13</b> |
| <b>Chapitre I. Phénomène de la contrefaçon.....</b>                                     | <b>17</b> |
| I. Historique.....                                                                      | 18        |
| II. Contrefaçon des médicaments.....                                                    | 19        |
| II.1. Définition de la contrefaçon.....                                                 | 19        |
| II.2. Médicament contrefait .....                                                       | 20        |
| II.3. Type des médicaments contrefaits .....                                            | 21        |
| II.4. Aspect de la contrefaçon des médicaments.....                                     | 22        |
| II.5. Origines de la contrefaçon .....                                                  | 23        |
| II.6. Contrefaçon en chiffre .....                                                      | 24        |
| II.7. Facteurs encourageant la contrefaçon des médicaments.....                         | 25        |
| II.8. Conséquence de la contrefaçon des médicaments .....                               | 26        |
| II.8.1. Impact économique .....                                                         | 26        |
| II.8.2. Conséquence sur la santé publique.....                                          | 27        |
| III. Lutte contre la contrefaçon .....                                                  | 28        |
| III.1. Approche classique pour lutter contre la contrefaçon des médicaments .....       | 29        |
| III.1.1. Traçabilité.....                                                               | 29        |
| III.1.2. Sécuriser la chaîne d'approvisionnement.....                                   | 30        |
| III.1.3. Conditionnement du médicament.....                                             | 30        |
| III.1.4. Moyens technologiques anti-contrefaçon.....                                    | 31        |
| III.2. Techniques analytiques .....                                                     | 31        |
| III.2.1. Caractérisation des échantillons .....                                         | 32        |
| III.2.2. Techniques spectroscopiques .....                                              | 36        |
| III.2.3. Techniques séparatives.....                                                    | 39        |
| III.2.4. Techniques d'analyse avancées.....                                             | 42        |
| IV. Conclusion .....                                                                    | 49        |
| <b>Chapitre II. Approches chimiométriques pour la lutte contre la contrefaçon .....</b> | <b>50</b> |
| I. Introduction.....                                                                    | 51        |
| II. Approches chimiométriques et intérêt d'application .....                            | 51        |
| III. Sélection de la méthode analytique .....                                           | 53        |
| IV. Développement analytique et plans d'expériences .....                               | 53        |
| IV.1. Plans d'expériences.....                                                          | 54        |
| IV.1.1. Modélisation mathématique .....                                                 | 54        |
| IV.1.2. Classification des plans d'expériences .....                                    | 55        |
| V. Optimisation multicritère et espace de robustesse .....                              | 60        |
| V.1. Fonction de désirabilité.....                                                      | 60        |
| V.2. Espace de robustesse .....                                                         | 61        |
| VI. Validation analytique .....                                                         | 64        |
| VI.1. Critères de la validation analytique.....                                         | 65        |

|                                                                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| VI.2. Approches de la validation analytique .....                                                                                                          | 68        |
| VI.2.1. Approche de validation classique.....                                                                                                              | 68        |
| VI.2.2. Nouvelle approche de la validation analytique .....                                                                                                | 71        |
| VI.3. Profil d'incertitude et intervalle de tolérance.....                                                                                                 | 75        |
| VI.3.1. Planification des essais et organisation des données.....                                                                                          | 76        |
| VI.3.2. Réalisation des essais et organisation des données .....                                                                                           | 77        |
| VI.3.3. Fonction de réponse .....                                                                                                                          | 78        |
| VI.3.4. Critère de validation et intervalle de tolérance.....                                                                                              | 82        |
| VI.3.5. Estimation d'incertitude par le profil d'incertitude.....                                                                                          | 88        |
| VI.3.6. Construction du profil d'incertitude .....                                                                                                         | 90        |
| VI.3.7. Interprétation du profil d'incertitude.....                                                                                                        | 90        |
| VI.4. Profil de risque .....                                                                                                                               | 91        |
| VII. Conclusion .....                                                                                                                                      | 93        |
| <b>Chapitre III. Développement et validation d'une nouvelle méthode UPLC pour lutter contre la contrefaçon des médicaments de trouble d'érection .....</b> | <b>94</b> |
| I. Introduction .....                                                                                                                                      | 95        |
| II. Sélection de la méthode de dosage des PDE-5i .....                                                                                                     | 96        |
| II.1. Appareil.....                                                                                                                                        | 96        |
| II.2. Standard .....                                                                                                                                       | 97        |
| II.3. Solvant et réactif .....                                                                                                                             | 97        |
| II.4. Conditions chromatographiques .....                                                                                                                  | 97        |
| II.5. Préparation des échantillons pour la détection des médicaments contrefaits .....                                                                     | 97        |
| II.6. Préparation des standards.....                                                                                                                       | 97        |
| II.7. Calcul .....                                                                                                                                         | 98        |
| III. Développement analytique .....                                                                                                                        | 98        |
| III.1. Objectif.....                                                                                                                                       | 98        |
| III.2. Ajustement d'un modèle d'ordre 2 .....                                                                                                              | 99        |
| III.2.1. Validation statistique du modèle .....                                                                                                            | 100       |
| III.2.2. Evaluation statistique et graphique des résidus.....                                                                                              | 102       |
| III.2.3. Signification des effets des facteurs .....                                                                                                       | 106       |
| III.2.4. Modèle retenu.....                                                                                                                                | 108       |
| III.2.5. Recherche des conditions optimales .....                                                                                                          | 109       |
| III.3. Robustesse et espace de robustesse.....                                                                                                             | 110       |
| III.4. Conclusion de l'étude du développement .....                                                                                                        | 114       |
| IV. Prévalidation .....                                                                                                                                    | 114       |
| IV.1. Conformité du système .....                                                                                                                          | 114       |
| IV.2. La sélectivité .....                                                                                                                                 | 115       |
| IV.3. Détermination d'intervalle de dosage .....                                                                                                           | 116       |
| V. Validation de la méthode de caractérisation des PDE-5i .....                                                                                            | 118       |
| V.1. Choix de la fonction de réponse.....                                                                                                                  | 118       |
| V.2. Justesse.....                                                                                                                                         | 131       |
| V.3. Fidélité .....                                                                                                                                        | 131       |
| V.4. Profil d'incertitude .....                                                                                                                            | 132       |
| V.5. Limite de quantification .....                                                                                                                        | 133       |
| V.6. Linéarité .....                                                                                                                                       | 133       |
| V.7. Profil de risque .....                                                                                                                                | 134       |
| V.8. Application sur des échantillons réels.....                                                                                                           | 136       |
| VI. Conclusion .....                                                                                                                                       | 137       |

|                                                                                                                                                     |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Chapitre IV. Capacité du profil d'incertitude à statuer sur la validité des méthodes destinées à l'analyse des médicaments contrefaits .....</b> | <b>139</b> |
| I. Introduction .....                                                                                                                               | 140        |
| II. Spectrophotométrie UV-Visible pour le dosage de la quinine sulfate dans des comprimés de qualité inférieur .....                                | 140        |
| II.1. Domaine d'application .....                                                                                                                   | 140        |
| II.2. Plan expérimentale de la validation .....                                                                                                     | 141        |
| II.3. Résultats et discussion .....                                                                                                                 | 141        |
| III. Spectrophotométrie NIR pour caractériser la Quinine dihydrochloride dans des gouttes orales .....                                              | 144        |
| III.1. Domaine d'application .....                                                                                                                  | 144        |
| III.2. Plan expérimental de la validation .....                                                                                                     | 144        |
| III.3. Résultats et discussion .....                                                                                                                | 145        |
| IV. Caractérisation des solvants résiduels dans les médicaments contrefaits par une méthode GC-MS .....                                             | 147        |
| IV.1. Domaine d'application .....                                                                                                                   | 147        |
| IV.2. Plan expérimental de la validation .....                                                                                                      | 147        |
| IV.3. Résultats et discussion .....                                                                                                                 | 148        |
| V. Caractérisation de l'association du sulbactam et céftriaxone par une méthode LC afin de combattre la qualité inférieur d'un médicament .....     | 154        |
| V.1. Domaine d'application .....                                                                                                                    | 154        |
| V.2. Plan expérimental de la validation .....                                                                                                       | 154        |
| V.3. Résultats et discussion .....                                                                                                                  | 155        |
| VI. Bilan d'évaluation des différentes approches de la validation .....                                                                             | 159        |
| <b>Conclusion Générale .....</b>                                                                                                                    | <b>161</b> |
| <b>Références Bibliographiques.....</b>                                                                                                             | <b>164</b> |
| <b>Annexe : Chromatogrammes des échantillons contrefaits .....</b>                                                                                  | <b>174</b> |

## **Introduction Générale**

### Introduction Générale

La contrefaçon des médicaments est un fléau en pleine progression, difficile à identifier et à maîtriser, elle s'est considérablement industrialisée et mondialisée en empruntant des voies illégales très organisées. Malgré les risques présentés, ce phénomène prend différentes formes et touche à la fois le médicament et son conditionnement, il s'amplifie vers différentes classes thérapeutiques et il s'oriente vers les produits qui touchent des pathologies lourdes.

Selon OMS, l'accessibilité au médicament contrefait, incluant la consommation régulière, a des conséquences graves sur la santé des patients. Les produits contrefaits peuvent nuire aux patients et ne pas traiter les maladies auxquelles ils sont destinés. D'ailleurs, ces produits sont par nature très difficiles à détecter, ils sont souvent conçus pour paraître identiques au produit authentique.

Les PDE-5i, conçus pour le traitement de la dysfonction érectile, constituent désormais une avancée scientifique à cause de leurs implications médicales dans différents domaines. Cependant, en dehors du système officiel de santé, les substances illicites des PDE-5i ont prévalu dans de nombreux pays.

Aujourd'hui, les laboratoires pharmaceutiques en collaboration avec les autorités de santé doivent impérativement mettre en place des mesures préventives et des solutions techniques, non seulement pour protéger l'authenticité des produits pharmaceutiques, mais également pour veiller sur la vie des patients. Pour percevoir ces objectifs, de nouvelles méthodes analytiques ont été mises en place.

Récemment, plusieurs techniques analytiques ont été utilisées pour caractériser une contrefaçon à savoir : (LC-UV, LC-MS, IR, RMN, X-ray diffraction, etc.). Certaines techniques ont pour but d'identifier l'empreinte chimique du produit, tandis que d'autres s'appliquent pour déterminer la composition en matière de principe actif, composés toxiques et impuretés. En particulier, la chromatographie en phase liquide couplée à divers détecteurs est la technique fréquemment utilisée pour l'analyse de ces substances illicites.

À ce jour, différentes méthodes chromatographiques pour la caractérisation simultanée des substances inhibitrices de la PDE-5 ont été développées. Également, presque tous les auteurs avaient recours à la technique d'optimisation univariée (variation of one variable-at-a-time) (OVAT), afin d'optimiser les paramètres expérimentaux de leurs méthodes analytiques. Cependant, la technique OVAT n'aboutit pas souvent à fournir des résultats satisfaisants, et

elle est parfois incapable de répondre aux exigences recommandées par la directive ICH Q8 à savoir : la définition d'un espace de conception auquel la méthode conserve les performances nonobstant des fluctuations de certains paramètres.

D'autre part, un survol de la littérature a montré que les méthodes chromatographiques proposées sont focalisées uniquement sur l'identification de trois substances inhibitrices de la PDE-5 autorisée ainsi que leurs analogues. À contrario, aucune méthode HPLC ou UPLC n'a été signalée pour la détermination simultanée du sildénafil, tadalafil, vardénafil et udénafil, en préparations pharmaceutiques ou en médicaments contrefaits.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail sera dédié au développement d'une nouvelle stratégie analytique pour lutter contre la contrefaçon des médicaments de trouble d'érection. Notre objectif est de combiner un ensemble d'outils chimiométriques pour mettre au point une méthode chromatographique qui va servir de dispositif analytique pour lutter contre les médicaments contrefaits. En agissant de la sorte, on désire proposer une procédure performante capable de détecter les comprimés originaux des comprimés illégaux des différentes molécules PDE-5i, en particulier : sildénafil, tadalafil, vardénafil et udénafil.

Ce mémoire de thèse est scindé en quatre chapitres

Le premier chapitre dresse un état des lieux de la situation des médicaments contrefaits. Il présente également les techniques analytiques utilisées pour la caractérisation des médicaments falsifiés.

Le deuxième chapitre vise à éclaircir, par le biais d'un examen de la littérature, l'utilisation des outils chimiométriques pour la lutte contre la contrefaçon des produits pharmaceutiques. En effet, Le chapitre débute par une présentation générale de certains outils chimiométriques ainsi que leur intérêt d'application. Ensuite, les principales étapes de cycle de vie d'une méthode analytique sont exposées. Puis, dans un deuxième temps, il dévoile les bases statistiques de l'optimisation multicritère via le design space nécessaire à définir la zone de robustesse des procédures d'analyse. En dernier lieu, nous bouclons cette partie en mettant la lumière sur les avantages des profils d'incertitude et de risque.

Le troisième chapitre offre une étude longitudinale dans laquelle nous confrontons, la théorie à la pratique. En effet, nous proposons une nouvelle méthode UPLC rapide et fiable pour la détermination en temps réel de quatre substances inhibitrices de la Phosphodiesterase type-5 (PDE-5i) dans les médicaments falsifiés. Au premier abord, nous avons exploité la méthodologie des plans d'expériences et le design space recommandé par

ICH Q8 côte à côte, en phase de développement, pour définir les paramètres optimaux ainsi que le domaine de robustesse de la méthode chromatographique. Par ailleurs, les profils d'incertitude et de risque découlés à partir de l'intervalle de tolérance ont été investigués, en phase de validation, pour décider sur la performance de ladite méthode. Néanmoins, pour cerner les points forts et les lacunes, notre procédure UPLC est testée, en phase de routine, afin d'identifier 23 formulations médicamenteuses illicites de trouble de l'érection.

Enfin, nous consacrons le dernier chapitre à évaluer la capacité du profil d'incertitude à statuer sur la validité des méthodes destinées à l'analyse des médicaments contrefaits. En résumé, ce chapitre expose les résultats de la validation de quatre techniques analytiques :

- Le dosage de la quinine sulfate dans des comprimés de qualité inférieure par Spectrophotométrie UV-Visible.
- La caractérisation de la Quinine dihydrochloride dans des gouttes orales contrefaites par la Spectroscopie NIR.
- La caractérisation des solvants résiduels dans les médicaments falsifiés par une méthode GC-MS.
- Et la caractérisation d'un médicament à base de sulbactam et céftriaxon de qualité inférieure une méthode HPLC.

## **Chapitre I. Phénomène de la contrefaçon**

### I. Historique

Volé une idée afin de l'exploiter commercialement est une démarche qui remonte à la nuit des temps. Du point de vue juridique, « la contrefaçon est un moyen par lequel le contrefacteur crée une confusion entre le produit original et le produit contrefait au détriment de celui qui dispose des droits de propriété intellectuelle ». Dès le moyen âge un vigneron gaulois illettré en (2e siècle av. J.-C.) essaya de faire passer sa production locale pour l'un des meilleurs crus italiens. Il imita les lettres qu'apposaient habituellement les commerçants sur les bouchons d'amphores destinées à abriter le breuvage. Mais notre homme s'y prit bien maladroitement, et se fit prendre [1].

Au XIXe siècle, la profession de ceux que l'on nomme désormais les pharmaciens est bouleversée par la révolution industrielle. Comme la production de médicaments authentiques elle-même, leur contrefaçon augmente dans des proportions inquiétantes. Malgré les efforts des laboratoires producteurs pour le contenir, le phénomène n'épargnera bientôt aucun continent. Les États-Unis sont un des premiers recenseurs du phénomène. En 1820, ils établissent des normes qui concernent la production, le contrôle qualité et la composition chimique du médicament. Une loi approuvée en (1848) sur l'importation de médicaments est votée par le congrès qui renforce les contrôles via l'intervention de fonctionnaires des douanes. Citons aussi l'évènement tragique en (1937), plus d'une centaine d'Américains sont tués suite à l'ingestion d'un médicament contenant le dangereux solvant diéthylène glycol. Malheureusement après 70 ans plus tard le même solvant a été retrouvé dans un sirop contre la toux prescrit à une centaine d'enfants en 2006 au Panama. Tous succomberont [1].

Quelques dates clés dans l'histoire de la contrefaçon sont présentées dans le Tableau I-1 :

Tableau I-1 : Dates clés dans l'histoire de la contrefaçon

| Dates | Payé/Organisme | Événement                                                                                                                                        |
|-------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1848  | Etats-Unis     | Une loi sur l'importation de médicaments est votée par le Congrès. Elle renforce les contrôles via l'intervention de fonctionnaires des douanes. |
| 1985  | Nairobi        | Une conférence porte le problème des médicaments contrefaits pour la première fois sur la scène internationale.                                  |
| 1992  | Genève         | Aboutit à la première définition officielle d'un médicament contrefait dans une réunion internationale.                                          |

|                            |                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2006                       | Rome               | La mise en place du groupe International Medical Products Anti-Counterfeiting Taskforce (IMPACT), suite à la conférence organisée par l'Organisation mondiale de santé (OMS) qui porte sur : La contrefaçon de médicaments est reconnue comme une infraction criminelle vile et grave qui met en danger des vies humaines et sape la crédibilité des systèmes de santé. |
| 2009                       | Cotonou            | Jacques Chirac lance un appel à la communauté internationale, afin de se mobiliser contre le trafic de faux médicaments. 50 chefs d'Etats ont signé cet appel et sont engagés dans cette lutte contre la contrefaçon de médicaments.                                                                                                                                    |
| Mai 2010                   | OMS                | La 63e assemblée de L'OMS crée un groupe de travail axé sur les produits médicaux de qualité inférieure, faux, faussement étiquetés, falsifiés, contrefaits, appelés Produits médicaux de qualité inférieure / faux / faussement étiquetés / falsifiés / contrefaits (SSFFC).                                                                                           |
| Novembre 2010              | Caraïbes Pacifique | 92e session du Conseil des Ministres Afrique: Résolution adoptée portant sur la lutte contre la production et la commercialisation de faux médicaments. Mise en place et renforcement des actions de lutte contre le faux médicament.                                                                                                                                   |
| décembre 2010 à avril 2011 | Nations Unies      | 20e session de la commission pour la prévention du crime et la justice pénale des Nations Unies (ONU).<br>L'ONU adopte la résolution 20/6 définissant le rôle de l'Office des Nations Unies contre la drogue et le crime, (l'ONUDC), dans la lutte contre les médicaments frauduleux.                                                                                   |
| juin 2011                  | Parlement Européen | Validation de la directive 2011/62/UE : renforcer les instruments de lutte contre les médicaments falsifiés en sécurisant le circuit de distribution des médicaments en particulier sur internet.                                                                                                                                                                       |
| 2014                       |                    | Pangea VII : rassemblait 111 pays, permettait de fermer 10 600 sites web, de saisir 20 000 colis et d'arrêter 239 personnes.                                                                                                                                                                                                                                            |

## II. Contrefaçon des médicaments

### II.1. Définition de la contrefaçon

La contrefaçon est l'action de reproduire une œuvre (littéraire, artistique ou industrielle) au préjudice de l'auteur ou de l'inventeur et du consommateur. Dans le cas de biens de consommation, la contrefaçon est une imitation frauduleuse (pouvant être une imitation à l'identique) qui inclut la notion de tromperie : le but du contrefacteur est de créer une confusion entre le produit original (contrefait) et l'imitation qu'il propose (contrefaisant).

Il cherche ainsi à s'approprier la notoriété et l'image d'une marque, d'un produit ou d'une personne physique ou morale à son insu. Précisons que, dans certains cas, le consommateur est lui-même dupé, mais qu'il peut également se rendre complices du contrefacteur en achetant sciemment un faux.

Dans le cas du médicament, le patient est escroqué, car il ignore que le produit acheté peut être faux, donc dangereux pour sa santé [1].

### II.2. Médicament contrefait

La contrefaçon est une activité illégale très organisée (en progression), elle affecte un grand nombre d'entreprises et crée un sérieux problème économique. En effet, elle est capable de trahir la conscience des individus afin de favoriser la consommation des produits falsifiés au lieu des produits authentiques. Actuellement, la contrefaçon n'exclut aucun produit et s'attaque aux produits de grande valeur, ainsi aux produits dont la nécessité est importante à savoir : médicament, textile, bijoux, composants électriques et bien d'autres [2, 3].

En réalité, lorsqu'il s'agit d'un médicament les choses passent au sérieux, puisqu'un médicament n'est pas un produit comme les autres. Une réglementation et une surveillance sont nécessaires surtout lorsque la santé des patients est exposée au danger.

Plusieurs définitions ont été fournies par des organismes officiels à savoir :

Selon l'**OMS** pour les spécifications des produits pharmaceutiques, un médicament contrefait est « *un médicament qui est délibérément et frauduleusement mal étiqueté avec le respect d'identité et/ou de sa source. La contrefaçon peut s'appliquer aux produits de marque comme aux produits génériques et peut être constituée d'ingrédients corrects ou différents, sans principes actifs ou en quantité insuffisante ou encore avoir un faux conditionnement* » [4, 5].

Le **groupe IMPACT**, dont le Secrétariat est assuré par l'OMS, a proposé une définition élargie aux produits de santé contrefaits lors de sa réunion annuelle, tenue à Hammamet, en Tunisie, en décembre 2008.

« *Un produit médical est contrefait lorsqu'il y a une fausse représentation de son identité et/ou de sa source. Cela s'applique au produit, à son conditionnement ou à toute autre information concernant l'emballage ou l'étiquetage. La contrefaçon peut s'appliquer à des spécialités ou à des produits génériques. Les produits contrefaits peuvent être des produits contenant les bons ingrédients/composants ou de mauvais ingrédients/composants,*

*pas de principe actif ou un principe actif en quantité insuffisante ou encore des produits, dont le conditionnement, ont été falsifiés. »*

Quant à la convention « **Médicrime** » du Conseil de l'Europe, elle définit le terme « contrefaçon » comme la présentation trompeuse de l'identité et/ou de la source.

Par ailleurs, on ne doit pas confondre un médicament contrefait avec un médicament générique, car les médicaments génériques sont de vrais médicaments. Ils ont la même composition qualitative et quantitative en principe actif, la même forme pharmaceutique et la même efficacité thérapeutique. Donc, la contrefaçon des médicaments ne doit pas remettre en cause l'accès aux thérapeutiques efficaces et financièrement plus accessibles que constituent les médicaments génériques [6].

### II.3. Type des médicaments contrefaits

Auparavant, les médicaments victime de la contrefaçon recouvrent les spécialités les plus coûteuses, les spécialités qui ne sont pas prises en charge [7], ou encore les produits dits de confort [8]. Aujourd'hui, les orientations des contrefacteurs se dirigent vers les médicaments dans la nécessité répond au besoin des patients [9]. Ce phénomène concerne une importante variété de spécialités pharmaceutiques, quoique certaines classes thérapeutiques aient prévalu d'autres.

En 2016, l'institut de sécurité pharmaceutique (PSI) a évalué l'activité de contrefaçon à 3147 « incidents », soit une augmentation de l'ordre de 15 % par rapport à l'année 2015 à l'échelle internationale. Selon le même institut, aucune classe thérapeutique n'échappe à la contrefaçon. Il a ainsi relevé que les médicaments les plus fréquemment ciblés par les contrefacteurs sont :

Les médicaments génito-urinaires, les médicaments anti-infectieux, et du système nerveux central (SNC) [10].

En Europe, les spécialités pharmaceutiques les plus touchées sont [11] :

- Les antibiotiques ;
- Les médicaments de la dysfonction érectile ;
- Les hormones, les stéroïdes et les médicaments anorexigènes (ou anti-obésité) ;
- Les médicaments antipyrétiques et les analgésiques ;
- Les médicaments antiasthmatiques et antiallergiques ;
- Les médicaments antiulcéreux ;

- Les vitamines.

EN Afrique, les médicaments les plus concernés par la contrefaçon sont ceux destinés au paludisme, VIH/sida, et la tuberculose [12]. En particulier, le Viagra destiné au traitement pour le dysfonctionnement érectile est considéré comme étant le médicament le plus contrefait dans le monde [7, 13].

### II.4. Aspect de la contrefaçon des médicaments

Généralement, la contrefaçon de médicaments peut emprunter plusieurs voies :

Elle peut affecter le conditionnement extérieur du médicament (l'emballage et les différentes mentions obligatoires) comme elle peut atteindre son conditionnement primaire qui enveloppe le produit (le blister) ou encore le médicament lui-même [4].

Comme le montre la Figure I-1, on peut distinguer généralement plusieurs types de contrefaçons pharmaceutiques selon la classification de L'OMS :

- Produits sans principes actifs.
- Produits contenant des quantités incorrectes du principe actif.
- Produits contenant de mauvais ingrédients.
- Produits avec des quantités correctes des principes actifs, mais avec un faux emballage.
- Produits présentant des niveaux élevés d'impuretés et des contaminants peuvent engendrer des effets indésirables.

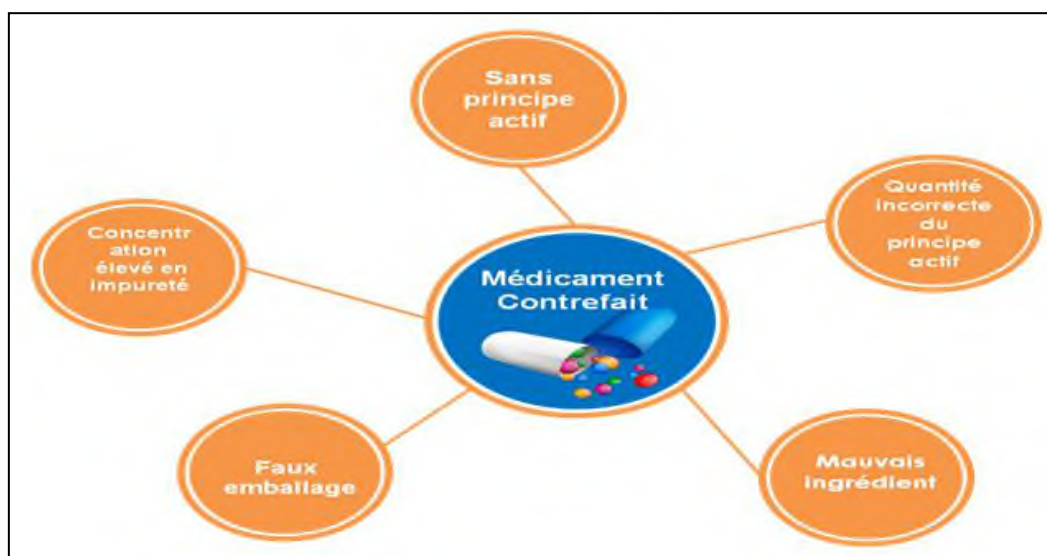


Figure I-1 : Aspect de médicaments contrefaits

La contrefaçon des marques de médicaments peut adopter deux aspects :

Le premier aspect dans lequel les marques et les emballages sont similaires aux produits ciblés, il correspond à la contrefaçon par imitation (Figure I-2) [7].



Figure I-2 : Exemple de cas de contrefaçon par imitation de la spécialité PLAVIX®

Le deuxième aspect recouvre toute utilisation de marque d'un tiers sans l'autorisation de son titulaire, il représente la contrefaçon par reproduction (Figure I-3).



Figure I-3 : Exemple de cas de contrefaçon par reproduction de la spécialité VIAGRA®

### II.5. Origines de la contrefaçon

La production des médicaments contrefaits emprunt un aspect multinational, en effet l'Asie demeure le premier incubateur, quant à l'Inde et la Chine sont les deux principaux artisans mondiaux (Figure I-4). À l'origine, plusieurs facteurs peuvent contribuer à l'évolution du circuit de la contrefaçon. Ces facteurs peuvent être d'ordre socio-économique, bien qu'ils puissent être réglementaires [4].

La pauvreté, l'accès aux technologies de pointe, l'intensification du commerce international et le développement du commerce en ligne [6], tous ces facteurs peuvent réagir exponentiellement sur le profit de ce marché.

En 2008, l'Organisation de Coopération et de Développement économiques (OCDE) estimait que 75 % des contrefaçons mondiales de médicaments provenaient d'Inde [14].

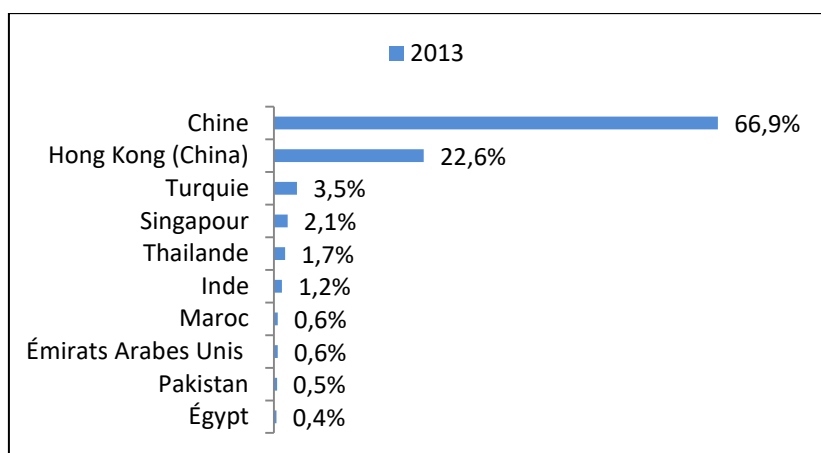


Figure I-4 : Provenance principale des produits contrefaits et piratés [15]

La Chine, quant à elle, est connue comme l'empire de la contrefaçon : 54 % des saisies réalisées dans l'Union européenne (UE) en 2008 concernaient des produits « made in China ». Mais, les autorités chinoises sont conscientes de ce problème, et s'impliquent depuis déjà plusieurs années dans le démantèlement des réseaux de contrefaçon. En 2001 par exemple, la Chine aurait fermé 1300 usines de contrefaçons pharmaceutiques. En 2009, la France et la Chine signent un accord de coopération spécifiquement dédié à la lutte anti-contrefaçon [6].

### II.6. Contrefaçon en chiffre

L'OMS estime depuis 2010 que la prévalence mondiale des médicaments contrefaisants est d'environ 10 %. Il existe cependant une forte inégalité entre les pays développés, où la prévalence de médicaments contrefaits serait de moins de 1 %, et les pays en développement où la prévalence atteindrait 10 à 30 % des médicaments en vente [16].

Les ventes mondiales de médicaments contrefaits pourraient atteindre cette année 75 milliards, soit 90 % de hausse en cinq ans, selon une estimation publiée par le Center for Medicine in the public Interest des États-Unis d'Amérique. Il est difficile de mesurer l'ampleur du problème lorsqu'il y a tant de sources d'information et de définitions différentes des « contrefaçons » [17].

La contrefaçon au Maroc continue de faire des ravages, il touche plusieurs secteurs (Figure I-5). Son chiffre d'affaires atteint en moyenne près de 13 milliards de DH par an, soit autant de marchés perdus pour les industriels locaux. Elle constitue aussi un manque à gagner d'un milliard de DH pour le Fisc, mais le plus grave est qu'elle entraîne la perte de 30.000 emplois par an [18].

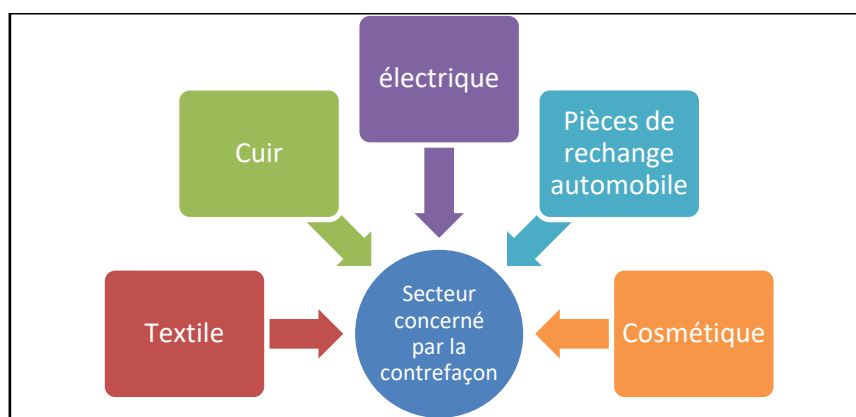


Figure I-5 : Secteurs touchés par la contrefaçon au Maroc

Compte tenu du développement de ce phénomène, difficile à appréhender en raison de la nature même de l'activité informelle et souterraine. Le Comité national pour la propriété industrielle et anti-contrefaçon (CONPIAC) a commandité fin 2011 une étude visant à réaliser un premier exercice d'analyse et de chiffrage de la contrefaçon au Maroc. Afin de donner plus de visibilité sur l'ampleur et les incidences de ce phénomène et de formuler un plan d'action pour améliorer l'efficacité des programmes et outils de lutte contre la contrefaçon au Maroc [19].

Selon le même Comité CONPIAC, les secteurs les plus concernés par la contrefaçon sont : le textile, le cuir, l'électrique, les pièces de rechange automobiles et le cosmétique [18].

Selon Adil El Maliki, directeur général de L'Office marocain de la Propriété industrielle et commerciale (OMPIC), le secteur de médicament n'est pas trop touché au Maroc, même si la contrebande surtout à l'Oriental et les achats via internet commencent à inquiéter. La cause est due, à la présence d'un réseau de distribution solide, bien encadré et organisé.

### II.7. Facteurs encourageant la contrefaçon des médicaments

La contrefaçon des médicaments est un fléau mondialement reconnu. Elle existe dans les pays développés ainsi que dans les pays en développement. L'absence d'une définition générale d'un médicament contrefait est un facteur clé qui contribue à la propagation de ce commerce. De nombreux pays ont leur propre définition de la contrefaçon, ceci pose un problème dans la définition du terme produit contrefait. Par conséquent, une contrefaçon dans un pays peut ne pas être considérée comme contrefaçon dans un autre. Cela indique à quel point il est important d'avoir une définition universelle à appliquer dans tous les pays [20, 21].

En parallèle, d'autres facteurs existent à savoir :

- Le gain financier généré par cette activité, puisque les produits pharmaceutiques contrefaits s'échappent à toutes les normes de fabrication ainsi aux bonnes pratiques de fabrication (BPF) qui sont souvent très coûteuses.
- Le prix élevé des médicaments authentiques et la couverture de l'assurance maladie insuffisante, en particulier dans les pays en développement, ont conduit les consommateurs à chercher des médicaments moins chers, éventuellement contrefaits. Cela explique le fait que les segments les plus pauvres des sociétés sont les plus touchés par la contrefaçon.
- L'utilisation de technologies pour produire des emballages de haute qualité afin de reproduire des médicaments légitimes rend difficile la distinction entre les médicaments réels et les médicaments contrefaits.
- L'achat des médicaments sur internet et par courrier, en particulier en pays développés, offre au contrefacteur une opportunité de vendre leurs produits [20].

### **II.8. Conséquence de la contrefaçon des médicaments**

#### **II.8.1. Impact économique**

De nos jours, la contrefaçon des produits de santé est estimée à plus de 10 % sur le marché mondial, équivalent de 75 milliards de dollars. Cet investissement produit une force destructrice sur le secteur recherche et développement (R&D) qui occupe une place prépondérante dans l'industrie pharmaceutique. En effet, l'orientation vers le développement de nouveaux outils ainsi que de nouvelle méthode et moyen pour lutter contre la contrefaçon, détourne l'objectif réel fixé par l'industrie pharmaceutique, en conséquence, entrainer l'industrie pharmaceutique des dégâts nombrables. Par ailleurs, une perte économique certaine, pour les entreprises et pour les états.

La contrefaçon des produits de santé est un vrai ralentisseur du secteur R&D. En effet, elle présente une atteinte directe à la propriété intellectuelle d'un produit authentique ainsi qu'à la détérioration de son image [7]. Les conséquences de ce phénomène se répercutent sur les pertes financières des entreprises, créant ainsi une crise en matière d'emplois [6].

Ce phénomène fait subir aux laboratoires pharmaceutiques des dégâts aussi importants. Il les incite d'abord à investir davantage dans des plateformes et des unités de pointe contre les fraudes puis, il les convie pour la mise en place des outils fulgurants de lutte anti-contrefaçon. Prenons l'exemple du Groupe Sanofi-Aventis : une partie intégrante de son

programme pour lutter contre la contrefaçon, a été basée sur la création du laboratoire central d'analyse des contrefaçons (LCAC) en 2008. Sa mission principale : l'analyse des produits suspectés être des falsifications de médicaments du groupe. Par conséquent, un coup d'investissement considérable [22].

### II.8.2. Conséquence sur la santé publique

D'après Éric Noehrenberg, de la fédération internationale des industries du médicament (IFPMA), « la contrefaçon de médicament est une menace pour la santé avant d'être une menace pour les entreprises, l'emploi ou la propriété intellectuelle » [23].

La santé des individus est exposée à de sérieux problèmes lors de l'utilisation à long terme d'un produit contrefait. En réalité, le risque associé à ce fait est lié étroitement à la composition inconnue du produit, les mauvaises conditions de la fabrication, et le non-respect des consignes préalables de sécurité [24]. Ces produits peuvent parfois contenir le bon principe actif avec des quantités incorrectes, mais souvent ils comportent de mauvais ingrédients qui sont parfois des matières toxiques, des éléments inadéquats ou inutiles [25]. Entraînant ainsi un échec thérapeutique et favorisant l'apparition d'une résistance aux médicaments ; mais dans bien de cas elle peut être mortelle [26]. Quelques exemples de contrefaçon de produits de santé sont présentés dans le Tableau I-2.

Deux types de risques peuvent se présenter chez les patients :

Pour les médicaments qui ne contiennent pas la bonne quantité en principe actif, ils conduisent à l'absence du traitement pour le patient. Alors que si le produit contrefait contient des matières toxiques, il encourt à l'empoisonnement du patient [8, 27].

Par ailleurs, la contrefaçon de produits de santé constitue donc une menace pour la santé, elle doit faire l'objet d'une préoccupation majeure.

Tableau I-2 : Exemples de contrefaçon de produits de santé dans le monde [6]

| Médicaments contrefait                   | Pays/Année           | Rapport                                                                                                 |
|------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Glibenclamide                            | Chine, 2009          | Contenait 6 fois La dose indiquée, entraînant une forte hypoglycémie. Bilan 2 morts, 9 hospitalisations |
| Aiguilles pour injection<br>Novo Nordisk | Royaume-Uni,<br>2009 | Aiguilles de mauvaise qualité, identifiées dans le circuit légal                                        |
| Metakelfin®<br>(antipaludique)           | Tanzanie, 2009       | Dosage insuffisant en principe actif, découvert dans 40 pharmacies                                      |
| MyPikin®<br>(paracétamol)                | Nigéria, 2009        | Sirop contenant du diéthylène glycol*, administré à 111 enfant. Bilan : 84 morts                        |

|                                            |                   |                                                                                                                             |
|--------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Héparine                                   | Etats-Unis, 2008  | Héparine provenant de Chine, contaminée par du sulfate de chondroïtine sulfaté et du sulfate de dermatane. Bilan : 84 morts |
| Zyprexa®                                   | Royaume-Uni, 2007 | Dosage insuffisant en principe actif. Détecté dans la chaîne d'approvisionnement légale.                                    |
| Lentilles de contact Proclear® et Surevue® | France, 2004      | Lentilles de mauvaise qualité, n'ayant entraîné aucun problème de santé                                                     |
| Vaccin contre la méningite                 | Niger, 1995       | Lors d'une épidémie, 50 000 personnes sont vaccinées par une contrefaçon ne contenant que de l'eau                          |

### III. Lutte contre la contrefaçon

La contrefaçon des médicaments est un phénomène en pleine progression, elle prend de plus en plus d'ampleur et envahit tous les continents. Malgré les retombées négatives de cette ampleur, la santé publique reste parmi les atouts à préserver. En effet, la santé publique est un enjeu majeur dans la lutte contre la contrefaçon des médicaments.

Une action qui passe tout d'abord par l'investigation policière et par les procédures judiciaires. La lutte contre la contrefaçon s'appuie principalement sur l'analyse chimique, elle constitue l'une des actions importantes à anticiper par les laboratoires d'analyses.

Dans cette perspective, les techniques analytiques restent un moyen robuste pour faire face à ce fléau [28]. En effet, les laboratoires d'analyse sont tenus de développer une stratégie de lutte permettant la caractérisation d'un échantillon falsifié. Une stratégie qui commence par l'observation d'échantillon et son conditionnement, elle peut atteindre l'utilisation des techniques plus développées tels que : les techniques spectrométriques et chromatographiques.

Cette stratégie doit répondre à deux questions primordiales :

- Le produit est-il falsifié ?
- Le produit est-il dangereux pour la santé du patient ?

Après l'introduction de la problématique, ce paragraphe est consacré à la présentation des techniques et approches déployées par les laboratoires pour garantir la sécurité des médicaments. De plus, une étude bibliographique des différentes techniques analytiques utilisées pour la lutte contre la contrefaçon est présentée.

### III.1. Approche classique pour lutter contre la contrefaçon des médicaments

Le trafic des médicaments falsifiés existe depuis longtemps, sa récession nécessite une bonne mise en place des mesures préventives. Ces mesures suscitent l'intérêt commun des différents acteurs dans le secteur pharmaceutique à savoir : les autorités réglementaires, sanitaires, policières, douanières et judiciaires, non seulement pour cadrer ce phénomène, mais également pour lutter contre sa prolifération. Par ailleurs, la lutte contre la contrefaçon requiert aussi l'implication des fabricants des produits pharmaceutiques ainsi que tous les intervenants au circuit de distribution.

Auparavant, le trafic des médicaments falsifié échappe à toute sorte de contrôle. Aujourd'hui, plusieurs actions sont mobilisées pour mieux cerner ce phénomène.

Dans ce paragraphe, plusieurs outils mis en place pour la lutte anti-contrefaçon seront présentés.

#### III.1.1. Traçabilité

La mise en place d'un système de traçabilité dans le monde de l'industrie pharmaceutique répond donc à une demande réglementaire. Elle a pour objectif de garantir la qualité des produits, de retracer l'historique en cas de retrait de lot, de retrouver où comprendre un problème ou une erreur et de lutter contre la falsification.

La traçabilité peut aussi avoir des avantages « capitalisables ». Elle établit des relations de confiance, améliore la performance (efficacité, compétitivité), crée de la valeur (différenciation des produits, de l'entreprise), prévient les risques internes et externes (non-conformité, responsabilité, falsification, détournement de marque ou de réseau de distribution, contrefaçon...). Selon bon nombre, elle est un support essentiel du développement durable. Ainsi, la traçabilité permet, au-delà du lien de confiance établi avec le patient et les agences réglementaires, de valoriser la chaîne de production et de distribution du médicament. Elle apporte de la valeur ajoutée au produit [29].

Le contrôle du circuit du médicament au sein des établissements pharmaceutiques constitue une étape primaire de lutte contre la contrefaçon. En effet, la mise en place des avancées technologiques (Figure I-6) au service de la traçabilité permet désormais d'identifier la localisation d'un produit donné, par conséquent, lutté efficacement contre la contrefaçon des médicaments [30].

La traçabilité est une recommandation réglementaire dans l'industrie pharmaceutique, elle figure parmi les orientations exigées par le référentiel européen des médicaments : les

BPF Bonnes pratiques de fabrication. C'est ainsi que la traçabilité contribue à l'amélioration continue de la qualité et veille sur la mise en œuvre des objectifs normatifs [4].



Figure I-6 : Code-barres matriciel Datamatrix (gauche) et transpondeur RFID (droite)

### III.1.2. Sécuriser la chaîne d'approvisionnement

L'industrie pharmaceutique intervient de manière à minimiser les risques associés à l'insertion des médicaments falsifiés sur le marché légal. En effet, cette deuxième étape consiste à sécuriser la chaîne d'approvisionnement d'un médicament. Elle est considérée comme une étape primordiale, car elle protège la chaîne d'approvisionnement légale contre l'insertion des produits frauduleux qui constitue un vrai défi, tant pour les industriels que pour les pharmaciens [3].

### III.1.3. Conditionnement du médicament

Le conditionnement qui constitue en premier lieu une protection physique du médicament représente la dernière source d'informations à laquelle l'utilisateur a accès avant l'administration du médicament. Ainsi, le conditionnement des médicaments (Figure I-7) a beaucoup changé au cours du temps et est désormais un outil complexe auquel ont été attribués de nombreux rôles. En effet, aujourd'hui le conditionnement des médicaments participe activement à leur bon usage, mais également à la sécurisation de l'ensemble de la chaîne pharmaceutique jusqu'à la prise du médicament [31].



Figure I-7 : Exemple de conditionnement primaire et secondaire destiné à la protection de l'authenticité d'un médicament (étiquette de sureté, boîte pré-perforé, étiquette multicouche, bague d'invulnabilité)

### III.1.4. Moyens technologiques anti-contrefaçon

L'étape suivante consiste à déployer un ensemble de moyens technologiques d'identification applicable au conditionnement et au médicament, permettant ainsi le contrôle du produit au cours de la chaîne d'approvisionnement. Ils permettent également de reconnaître visuellement l'authenticité du produit.

Les deux technologies utilisées par les laboratoires pharmaceutiques pour identifier un médicament falsifié comprennent :

- les images à effets variables (OVD : optically variable devices) tels que les hologrammes, ou les cinégrammes qui sont des étiquettes, dont les images, et des couleurs changeantes en fonction de l'angle d'observation.
- Les encres de couleurs variables (OVI : optically variable inks) dont la couleur varie selon l'angle d'incidence [3].

Les instruments d'analyses employées par l'industrie pharmaceutique ont un potentiel capital pour évaluer l'empreinte digitale d'un médicament. Ils s'avèrent utiles de mettre en place des méthodes analytiques de détection rapides et fiables pour édifier la quatrième étape dans le cursus de lutte anti contrefaçon [11, 32]. Cette étape permettra de percevoir les finalités du phénomène à plusieurs niveaux :

### III.2. Techniques analytiques

Le contrôle rigoureux de la qualité d'un médicament est le seul moyen pour justifier l'adéquation de ces caractéristiques aux normes, il est considéré comme un indicateur primaire de sa détérioration. De plus, c'est un outil permettant d'évaluer au mieux les risques de la santé publique. Dans ce sens, trois éléments essentiels doivent être assurés à savoir : l'efficacité, la sécurité et la qualité des médicaments. Plusieurs techniques analytiques sont à la disposition des laboratoires. Elles peuvent contribuer massivement à fournir des informations pour mettre en évidence un échantillon falsifié.

Diverses techniques analytiques utilisées dans cette problématique sont présentées. Ces techniques sont regroupées selon leur intervention dans le processus de la lutte contre la contrefaçon. Elles sont classées en deux grandes familles à savoir : les techniques spectrométriques et les techniques séparatives. Elles interviennent dans l'observation du conditionnement et elles peuvent atteindre la formulation du médicament. L'objectif principal devant l'utilisation de ces techniques est d'obtenir le maximum d'information sur la qualité

des médicaments. Ainsi, de repérer leurs authenticités par rapport aux échantillons de références.

### III.2.1. Caractérisation des échantillons

#### III.2.1.1. Échantillonnage

Dans le cas des médicaments contrefaits, un échantillon est représentatif si est seulement s'il provient d'un même échantillon comportant plusieurs unités. En effet, les travaux de Venhuis et al. [33] ont montré que la variabilité des unités de dose dans des emballages individuels de médicaments contrefaits est importante. L'analyse d'un médicament destiné au dysfonctionnement érectile a montré que certains comprimés contenaient du sildénafil, alors que d'autres étaient qu'un placebo. Cette variabilité peut contribuer à de faux résultats, par conséquent, à une évaluation inexacte des risques considérable pour la santé. D'où, l'importance de l'étape d'échantillonnage.

Sur la base des recommandations de l'office des Nations Unies contre la drogue et le crime (UNODC) [34], Degardin et al. [35] ont proposé une approche rationnelle pour la vérification des échantillons contrefaits. C'est une approche qui se base sur la quantité disponible d'échantillons afin de caractériser au mieux le produit à analyser.

- Si  $n < 10$ , alors toutes les unités sont analysées ;
- Si  $10 < n < 100$ , alors 10 unités sont aléatoirement choisies pour l'analyse ;
- Si  $n > 100$ , alors  $\sqrt{n}$  Unités aléatoires choisies pour l'analyse.

Avec  $n$  : la quantité disponible en échantillons contrefaits.

La caractérisation peut être réalisée par une méthode non destructrice telle que la spectrométrie proche infrarouge.

#### III.2.1.2. Examen visuel

Le premier niveau d'évaluation consiste à effectuer une observation macroscopique d'un échantillon (conditionnement, comprimés, gélule, etc.), il permet de relever si l'échantillon a été manipulé dans des conditions préalables. La dénomination de la spécialité, numéro de lot, date de péremption, point de collage des boîtes, police d'écriture ou encore pliage de la notice, etc. sont des informations utiles pour identifier la source de chaque médicament [34]. Mais, parfois il est difficile de repérer l'authenticité d'un médicament à cause du manque de certaines informations telles que : l'absence de la notice ou encore

inexistante de certaines informations d'étiquetage [36]. Ce manque d'informations induit une mauvaise interprétation des résultats d'analyse.

Cependant, d'autres éléments importants peuvent favoriser la détection d'un échantillon contrefait tels que : l'observation du conditionnement sous des sources lumineuses (par exemple 254 nm), la détérioration de l'aluminium d'une plaquette (un blister) ou encore l'apparence, la taille et la couleur du comprimé.

Pour faciliter l'examen, la Fédération internationale pharmaceutique (FIP), avec USP et le Conseil international des infirmières (ICN) ont développé une liste de contrôle pour une inspection visuelle des médicaments afin de faciliter l'identification des produits suspects pour un examen plus approfondi [37].

Le Tableau I-3 présente un exemple utilisé dans l'examen visuel recommandé par World Health Professions Alliance (WHPA).

Tableau I-3 : liste de contrôle utilisé pour l'examen visuel

|                                                                | Oui | Non | Autres observations |
|----------------------------------------------------------------|-----|-----|---------------------|
| Le nom commercial est-il rédigé correctement?                  |     |     |                     |
| Le médicament (nom commercial) est-il enregistré dans le pays? |     |     |                     |
| Le médicament est-il vendu légalement dans le pays?            |     |     |                     |
| Le symbole ® suit-il le nom commercial?                        |     |     |                     |

L'examen visuel montre ainsi son rôle comme un outil efficace pour repérer un médicament contrefait. En effet, plusieurs travaux dans la littérature soulignent le rôle de l'examen visuel pour identifier l'authenticité d'un médicament. Les travaux de Newton et al. [38] ont mis en évidence l'aspect contrefait de plusieurs spécialités pharmaceutiques sur la base du conditionnement. L'examen visuel proposé en Figure I-8 du médicament DUO-COTECXIN montre que l'emballage du médicament suspect contenait des erreurs de langue, également le texte était moins clair et inexistante d'hologramme.



Figure I-8 : Comparaison du conditionnement d'un échantillon de la spécialité DUO-COTECXIN (d'après [38])

### III.2.1.3. Caractérisation physique

Le deuxième niveau de caractérisation consiste à réaliser des essais physiques. Il s'agit principalement des essais galéniques que sont la dissolution, la désagrégation, la masse moyenne, la mesure de la couleur et la dimension des échantillons ainsi que l'analyse thermique. Ces essais sont facilement entrepris par les laboratoires de contrôle, ils permettent d'évaluer la qualité d'un médicament avec précision. Ils sont décrits dans la Pharmacopée Européenne et l'United State Pharmacopeia.

Considérant le travail Custers et al. [39], des essais physiques sont réalisés pour la caractérisation d'échantillons à base de Tadalafil. Ils s'appuient principalement sur 5 caractéristiques à savoir : la couleur, la masse, l'épaisseur, la longueur et largeur. Cette étude montre que seulement la masse et la longueur sont les caractéristiques physiques clés qui déterminent la discrimination observée à l'aide d'une évaluation chimiométrique des données.

Dans une autre étude similaire à la précédente [40], des essais de présélection simple et abordable sont réalisés. Un examen préliminaire est effectué à l'aide d'un colorimètre, il permet une caractérisation spécifique de la couleur d'un échantillon suspect. Cette méthode a été utilisée dans le but d'obtenir une distinction fondamentale entre des échantillons authentiques et contrefaits du Viagra, du Cialis et du Levitra. La méthode consiste à mesurer

la couleur de la surface des comprimés authentique, sur la base de ces mesures un modèle est établi, ensuite l'analyse des échantillons suspects est réalisée. L'analyse a permis d'identifier les échantillons suspects parmi les échantillons analysés, les résultats obtenus ont été démontrés par la spectrométrie infrarouge.

Un exemple d'analyse de teinte de couleur de plusieurs comprimé de la spécialité Viagra® est présenté dans la Figure I-9.

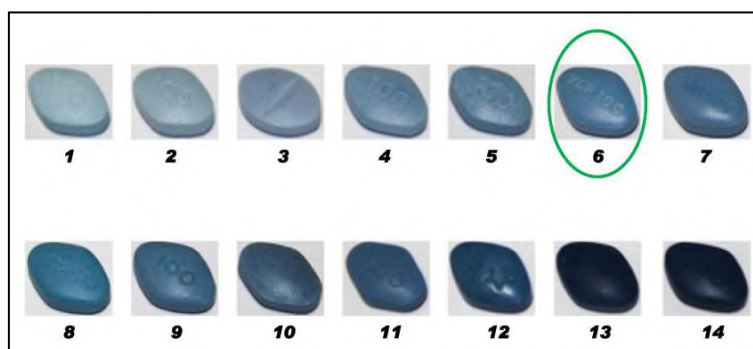


Figure I-9 : Différentes teintes de couleur de comprimé observées pour des échantillons de Viagra®. L'échantillon authentique est indiqué par le cercle vert (d'après [39])

Selon S.Wilczynski. [41], une méthode efficace, peu coûteuse et rapide a été développée, il s'agit d'une technique utilisant l'analyse thermique. Elle permet de distinguer les médicaments authentiques et les médicaments contrefaits. Le principe de cette technique est de mesurer la variation de masse d'un échantillon en fonction de la température. Elle permet d'obtenir le profil analytique d'échantillons analysés, en conséquence elle fournit des informations sur le type des excipients et le principe actif utilisé dans la fabrication.

Un exemple un thermogramme obtenu lors de l'analyse thermique de deux échantillons de la spécialité Viagra® est présenté dans la Figure I-10.

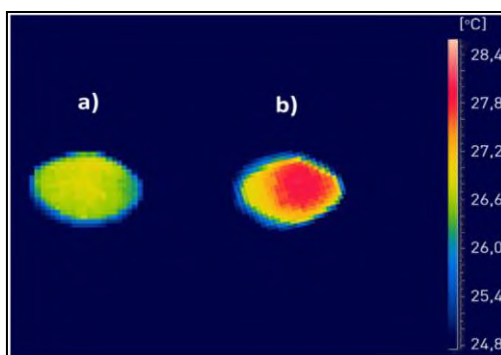


Figure I-10 : Thermogrammes de comprimés a) authentique et b) contrefaits de la spécialité viagra [41]

### III.2.1.4. Caractérisation chimique

Toutes les techniques abordées précédemment présentent systématiquement un certain nombre d'inconvénients, il est alors fortement recommandé de chercher un autre outil de caractérisation capable d'identifier un médicament contrefait. La caractérisation chimique est une technique qui met en jeu des réactions de précipitation, complexation, acido-basique et des réactions d'oxydoréductions. Elle identifie l'existence du principe actif par la coloration induit sur le produit de la réaction chimique.

L'équipe Dgreen et al. [42] a mis au point un test colorimétrique pour déterminer l'authenticité de l'Artésunate dans des échantillons suspects. L'essai est basé sur une réaction entre un produit de décomposition alcalin de l'artésunate et un sel de diazonium, rouge rapide TR (FRTR). C'est une réaction spécifique, il indique la présence de l'Artésunate par l'apparition d'une couleur jaune sur le produit de la réaction.

### III.2.2. Techniques spectroscopiques

Les techniques spectroscopiques sont des techniques d'analyse permettant de sonder la matière par différentes méthodes, elles mettent en jeu des radiations électromagnétiques pour en déduire des informations spectrales sur la structure des molécules qui composent cette matière. Ceci constitue le point de départ des méthodes spectroscopiques. En effet, ces techniques ont aussi un rôle assez important dans la lutte contre la contrefaçon. Plusieurs études scientifiques dans la littérature ont mis en évidence ce rôle telles que : l'étude présentée par Custer et al. [39] dans laquelle l'auteur montre le rôle du proche et moyen infrarouge pour distinguer entre les échantillons authentiques et les échantillons contrefaits de Viagra et de Cialis. Mateescu et al. [43] propose une étude par spectroscopie Raman pour la détection rapide des inhibiteurs de la PDE-5i dans des compléments alimentaires à base de plantes adultérées. Combiné aux techniques chimiométriques, la spectroscopie Raman constitue un outil puissant d'analyse et de détermination des médicaments contrefaits. En effet Nuberger et al. [44] démontrent que la spectroscopie Raman associée à l'analyse multivariée des données fournit une méthodologie puissante pour la caractérisation rapide et facile de médicaments authentiques et contrefaits.

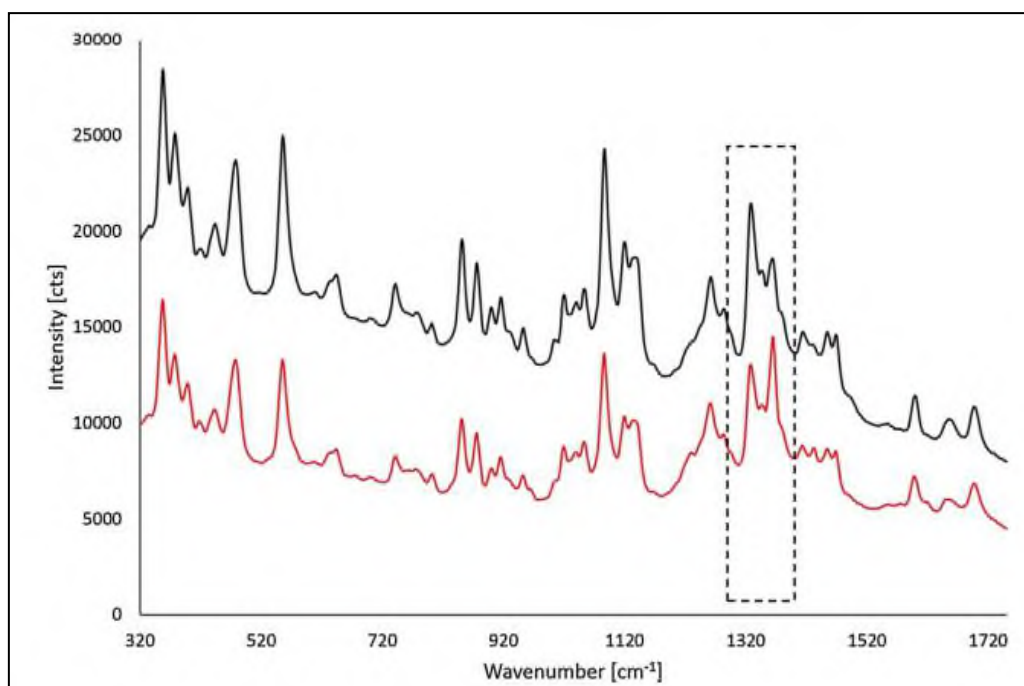


Figure I-11 : Spectres Raman standard de deux tablettes dans l'intervalle spectral 320–1720  $\text{cm}^{-1}$  : comparaison des données brutes provenant du mélange C (noir) et du mélange D (rouge) (d'après [44])

Une différence remarquable entre les deux spectres a été retrouvée dans la partie qui rassemble les deux bandes à savoir : 1320 et 1360  $\text{cm}^{-1}$  (Figure I-11). Ces deux bandes correspondent simultanément à la caféine et la quinine sulfate dihydrate. L'intensité de la quinine sulfate dihydrate est importante dans le mélange D (spectre rouge), par contre, la quantité de la caféine est moins importante que celle dans le mélange C (spectre noir). Ainsi, il est possible de distinguer les deux mélanges uniquement par inspection visuelle, alors que de grandes différences dans la composition chimique sont présentes.

D'autres techniques spectroscopiques interviennent dans le processus de lutte contre la contrefaçon telle que : la spectroscopie de fluorescence X (X-Ray Fluorescence) (XRF), la spectroscopie de masse, spectroscopie à plasma à couplage inductif et la spectroscopie de mobilité ionique.

La XRF est une technique analytique semi-quantitative, elle permet la caractérisation des éléments inorganiques [45]. C'est une technique appropriée pour contrôler la qualité des nouvelles formulations pharmaceutiques, elle permet de faire la distinction entre les comprimés authentiques et les comprimés contrefaits. Ainsi, Ortiz et al. [46] ont mis le point

sur la technique. Couplée à l'analyse en composante principale (ACP), la XRF a permis de caractériser et de classer des échantillons authentiques et contrefaits de Cialis et de Viagra.

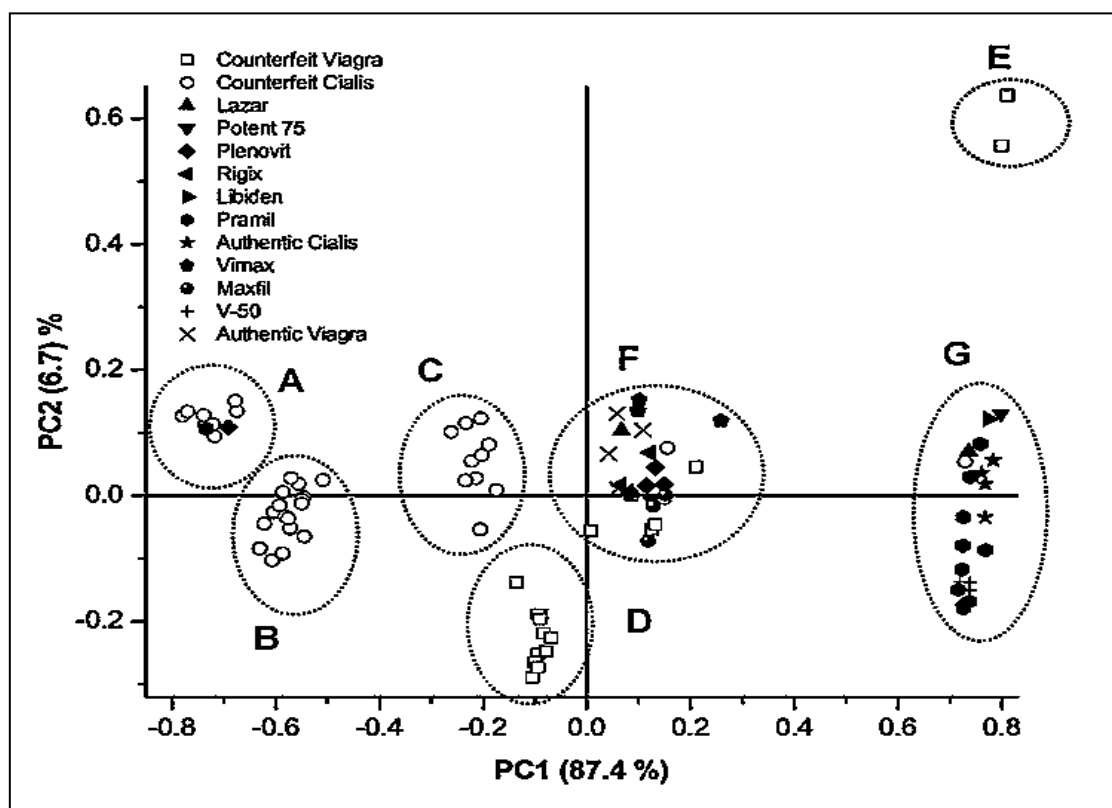


Figure I-12 : Discrimination de comprimés contrefaits et de comprimés authentiques par analyse ACP (d'après [46])

Dans cet exemple les résultats de la méthode ont été soumis à une évaluation chimiométrique par ACP. Le but était d'évaluer statistiquement la performance des spectres de la XRF dans la classification des échantillons à base de sildénafil et de tadalafil. D'après la Figure I-12, les 2 premières composantes principales (PC) ont été choisies pour l'évaluation puisqu'ils représentent 94 % de la variance totale. Dans cette présentation graphique, on observe une séparation en deux grands groupes correspondant aux échantillons contrefaits (groupes A, B, C et D et groupe E,) et des échantillons authentiques (groupes F et G). Cette séparation est principalement due aux variables Ca et Ti, où elles ont une influence significative sur la charge en PC1.

Un exemple de spectres de la XRF obtenu lors de l'analyse de plusieurs échantillons de la spécialité Viagra® est présenté dans la Figure I-13.

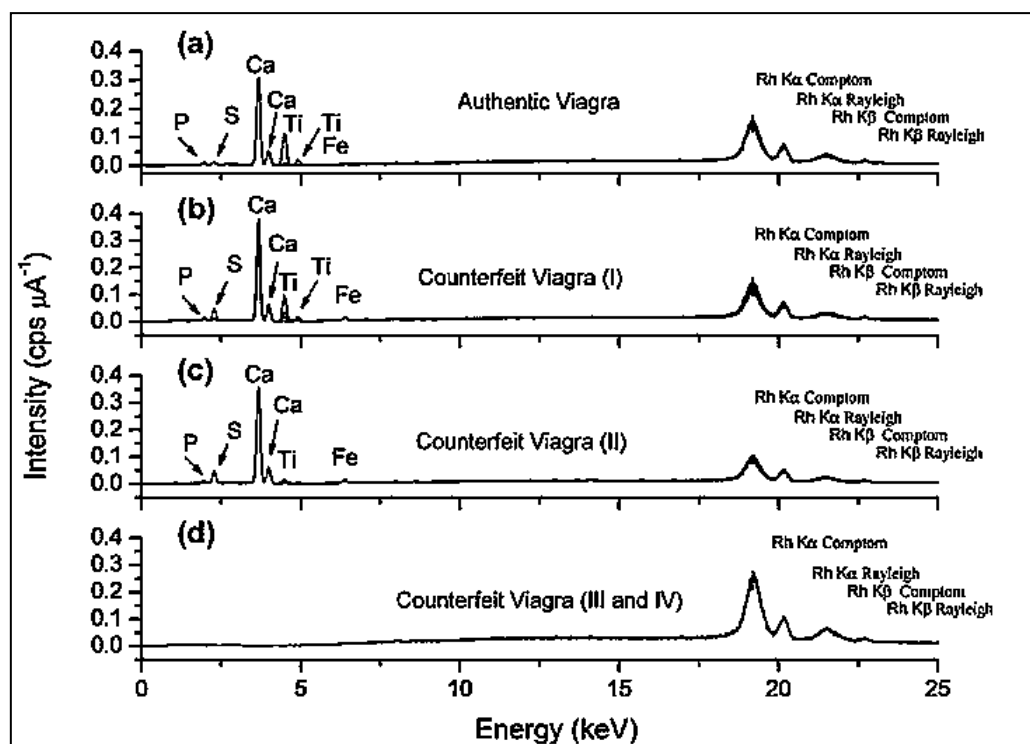


Figure I-13 : Spectre de la XRF de comprimés de Viagra® authentique (a) et de comprimés de Viagra® contrefaits (b, c et d) (d'après [46])

### III.2.3. Techniques séparatives

L'analyse avec des techniques séparatives est initiée, si un cas de contrefaçon a été confirmé. Il consiste à recenser l'existence ou non du principe actif, des impuretés et des produits toxiques. Dans cette étape l'utilisation des méthodes chromatographiques est essentielle, car la détermination des composés inconnus s'effectue à l'échelle de trace et à des quantités plus ou moins importantes [22].

La chromatographie est une technique importante utilisée pour la séparation de différents composants dans des mélanges. Il est également utilisé pour l'identification et la quantification de composés dans le processus de développement de médicaments [47]. Les composés sont entraînés par une phase mobile (liquide, gaz ou fluide supercritique) le long d'une phase stationnaire (silice, polymère, silice greffée, etc.) contenue dans une colonne chromatographique.

En fonction de la nature de la phase mobile, il s'agira de chromatographie gazeuse (CPG), de chromatographie liquide (LC) ou de chromatographie supercritique. Chaque composé se déplace à une vitesse propre dépendant de ses caractéristiques et de celles des deux phases. Ainsi, il ne peut y avoir séparation que si les caractéristiques des composés sont différentes et si leurs interactions avec la phase stationnaire et/ou la phase mobile sont

différentes. Cette technique séparative peut être couplée à un (ou plusieurs) détecteur en vue d'une analyse qualitative ou quantitative [48]. Les techniques chromatographiques ont été largement utilisées dans la détection et la caractérisation des médicaments contrefaits et de préparations pharmaceutiques illicites. Elles ont été utilisées pour l'identification, la détection, la séparation et la quantification des principes actifs dans les échantillons suspects.

### III.2.3.1. Chromatographie sur couche mince

Dans une étude réalisée par Sherma [49], l'auteur a ainsi mis en évidence une méthode de chromatographie sur couche mince (CCM) pour l'identification d'un échantillon contrefait. La Figure I-14 présente une plaque CCM dans laquelle un produit pharmaceutique de mauvaise qualité a été détecté sur la piste n° 3.

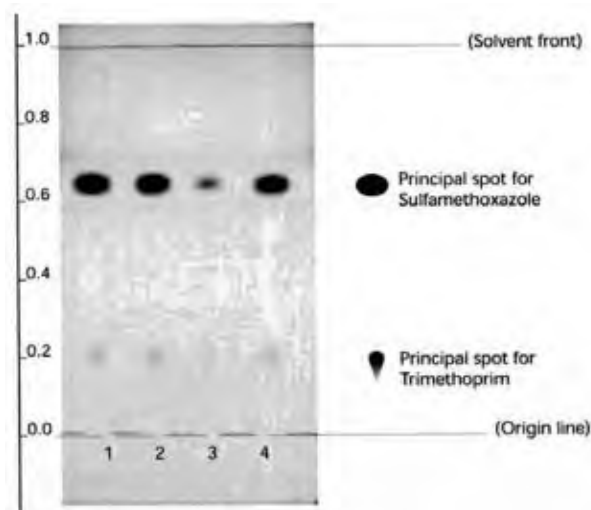


Figure I-14 : Identification de la sulfaméthoxazole dans un comprimé suspect par CCM  
(d'après [49])

### III.2.3.2. Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique hautement qualifiée pour la caractérisation des médicaments contrefaits. Elle est utilisée principalement pour l'analyse des solvants résiduels.

Deconinck et al. [50] ont mis en évidence la différence en solvant résiduel présent dans un échantillon authentique et contrefait du Viagra.

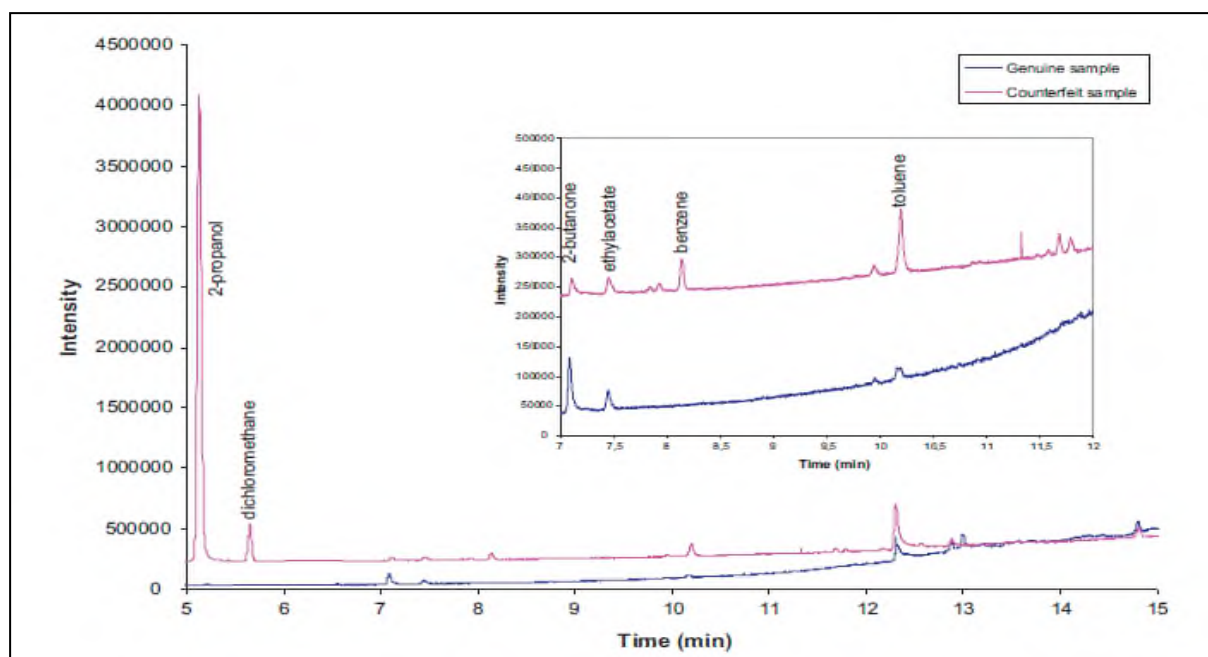


Figure I-15 : Chromatogramme obtenu d'un échantillon authentique et contrefait de Viagra par CPG

La Figure I-15 montre une différence importante dans la concentration des solvants résiduels entre un échantillon authentique et contrefait. Par conséquent, une concentration élevée en solvant résiduel peut indiquer l'aspect contrefait d'un médicament.

### III.2.3.3. Chromatographie liquide

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) est une technique d'analyse quantitative et qualitative, elle est utilisée comme méthode pour le screening de substances chimiques ou encore comme méthode d'évaluation de la qualité pharmaceutique d'un médicament. Elle permet une bonne identification des médicaments contrefaits, par voie d'évaluation d'impuretés spécifiques qui sont susceptibles de se former lors de la synthèse d'un principe actif.

Plusieurs méthodes CLHP présentées dans la littérature ont été mises en œuvre pour la lutte contre la contrefaçon : le développement et la validation d'une méthode CLHP portant sur l'analyse de 9 substances stéroïdiennes [51], la validation d'une méthode CLHP pour l'analyse simultanée de certains antibiotiques contrefaits [52], ou encore le développement d'une méthode CLHP-MS/MS pour la détection de plusieurs principes actifs de dysfonctionnement érectile [53].

La Figure I-16 présente un exemple de chromatogramme obtenu lors de la caractérisation d'un échantillon contrefait par HPLC.

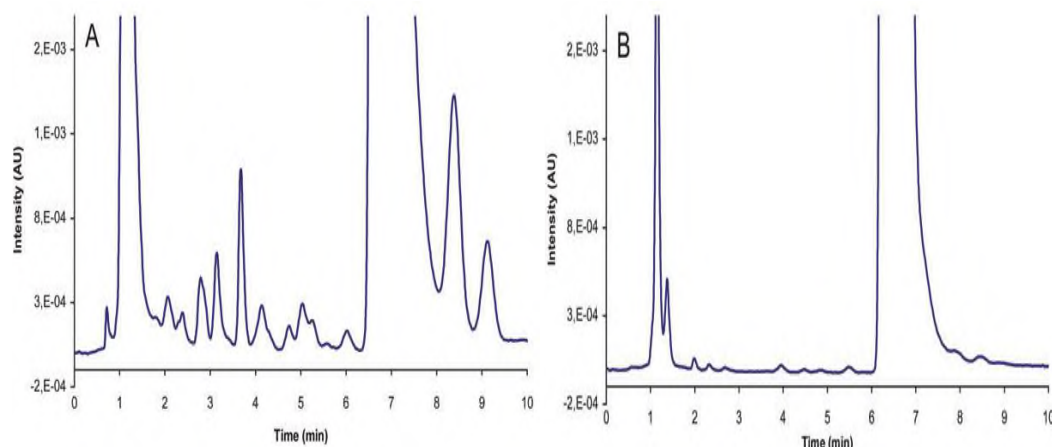


Figure I-16 : Chromatogrammes d'un comprimé contrefait de Viagra (A) et d'un comprimé authentique (B) (d'après [54])

### III.2.3.4. Chromatographie liquide ultra-performante

UPLC est une technique moderne qui donne une nouvelle vision à la chromatographie en phase liquide. UPLC se réfère à la chromatographie liquide ultra performante, il améliore principalement trois notions chromatographiques à savoir : « la vitesse d'analyse, la résolution et la sensibilité ».

La chromatographie liquide ultra performante (UPLC) applicable aux particules de moins de 2  $\mu\text{m}$  de diamètre permet une meilleure résolution, ainsi une vitesse et sensibilité importante par rapport à la chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Cette technique a été aussi utilisée dans le domaine de la lutte contre la contrefaçon notamment dans le travail de Sacré et al. [55] pour le développement et la validation d'une méthode UHPLC-UV pour la détection et quantification des médicaments contre la dysfonction érectile dans les médicaments contrefaits.

### III.2.4. Techniques d'analyse avancées

Ils existent d'autres techniques analytiques au service de la lutte contre la contrefaçon tels que : la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), la diffraction des rayons X sur poudre ou encore la microscopie électronique à balayage. Ces techniques requièrent une expertise scientifique avancée.

La RMN est une technique qui n'est pas encore utilisée en routine pour le contrôle de qualité des médicaments, c'est une méthode d'analyse globale, puisqu'elle permet de prendre en considération la formulation d'un médicament [56]. Ainsi, la Figure I-17 présente un

exemple d'étude par RMN pour la caractérisation de la formulation des échantillons suspects à base de Sildénafil.

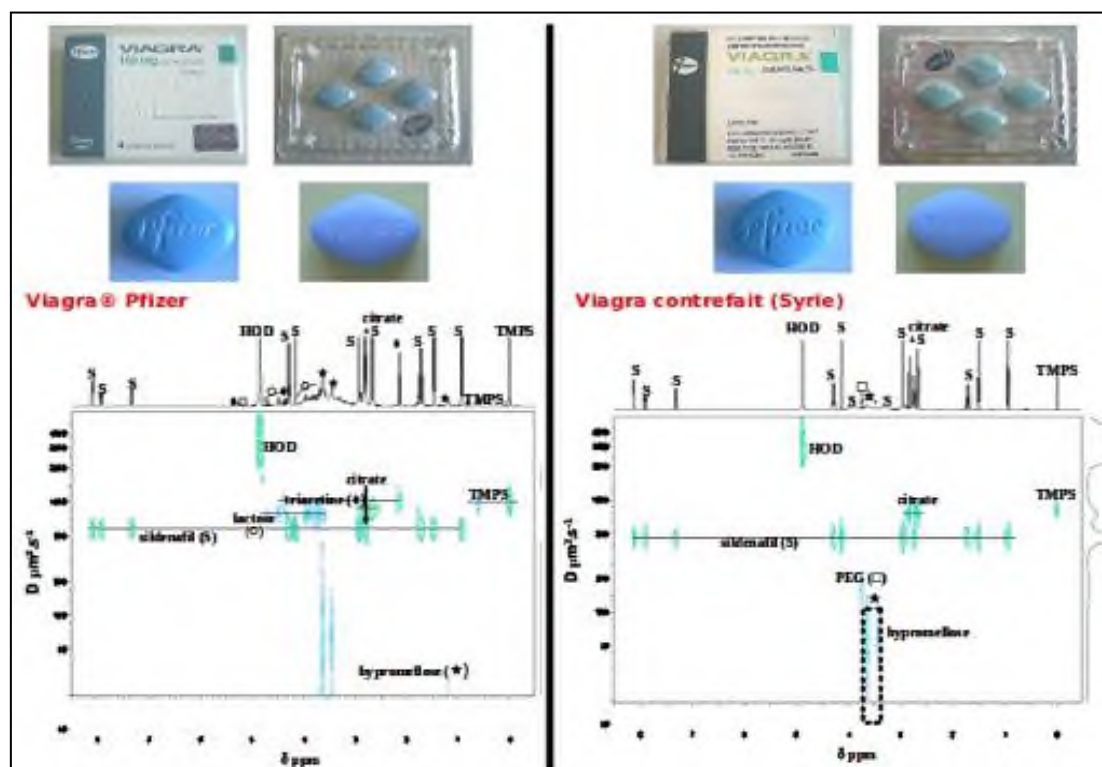


Figure I-17 : Spectres RMN DOSY de formulations authentique (à gauche) et contrefaite (à droite) de Viagra (d'après [56])

Le Tableau I-4 ci-après présente plusieurs méthodes utilisées principalement dans la caractérisation des médicaments contrefaits, il met le point sur la classe thérapeutique de chaque médicament, et les techniques analytiques utilisées pour la caractérisation, ainsi, il présente l'information obtenue.

D'après le Tableau I-4, plusieurs classes thérapeutiques sont visées par la contrefaçon : antibiotique, antidépresseur, amaigrissant, antirétroviraux, antipaludéen, antiparasitaire systémique ou encore, les fameux inhibiteurs de la phosphodiesterase type 5.

Il est donc impératif que la méthode d'analyse choisie pour la caractérisation d'une contrefaçon soit régie par plusieurs critères à savoir :

- Durée d'analyse ;
- Quantité d'échantillons disponible ;
- Objectif de l'analyse et nature du résultat ;
- Disponibilité d'appareillage ;
- Et niveau d'expertise des analystes.

Tableau I-4: Technique analytique utilisée pour la caractérisation des médicaments contrefaits

| Classe thérapeutique         | Substance et formulation                                                    | Techniques analytiques                                               | Informations obtenues                                                                                  |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Antibiotique                 | Sulfaméthoxazole                                                            | Chromatographie sur couche mince                                     | Identification d'un échantillon suspect                                                                |
|                              | Ciprofloxacine                                                              | Spectroscopie proche infrarouge                                      | Discrimination d'un médicament contrefait                                                              |
|                              | Sulbactam<br>Céftriaxone                                                    | Chromatographie liquide haute performance                            | Caractérisation de l'association du sulbactame et céftriaxone dans des comprimés de qualité inférieure |
| Antidépresseurs              | Fluoxétine                                                                  | Spectroscopie proche infrarouge                                      | Discrimination d'un médicament contrefait                                                              |
|                              | Prozac                                                                      | Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire                      | Caractérisation de la formulation d'un médicament contrefait                                           |
| Antiparasitaires systémiques | Quinine Sulfate déhydrate                                                   | Spectroscopie Raman                                                  | Détermination d'un médicament contrefait                                                               |
| Antipaludéen                 | Sulphadoxine-pyriméthamine et Amodiaquine                                   | Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur –UV | Évaluation de la qualité des médicaments                                                               |
|                              | Chloroquine, quinine et méfloquine                                          | Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur-DAD | Identification des constituants des médicaments                                                        |
|                              | Cotecxin                                                                    | Chromatographie liquide haute performance                            | Détection d'un médicament contrefait                                                                   |
|                              | Artesunate, Amodiaquine                                                     | Électrophorèse capillaire                                            | Détermination de la teneur des substances dans des comprimés                                           |
| Antiagrégant plaquettaire    | Plavix                                                                      | Spectroscopie de fluorescence X                                      | Contribution pour l'analyse des produits falsifiés                                                     |
| Amaigrissant                 | Caféine, Clenbuterol<br>Nicotinamide, Rimobabant<br>Subitramine, Synephrine | Chromatographie liquide ultra haute performance                      | Détection des substances dans des formulations de mauvaise qualité (formulations adultérées)           |

## Chapitre I. Phénomène de la contrefaçon

|                                                     |                                                                                                      |                                                                              |                                                                                               |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Antirétroviraux                                     | Zalcitabine, Lamivudine<br>Amdoxovir, Emtricitabine<br>Didanosine, Stavudine<br>Zidovudine, Abacavir | Chromatographie liquide haute performance                                    | Détermination des substances dans des échantillons suspects                                   |
| -                                                   | Solvant résiduel                                                                                     | Chromatographie en phase gazeuse                                             | Détermination et la quantification des solvants résiduels dans des comprimés contrefaits      |
| Inhibiteurs de la Phosphodiesterase type 5 (PDE-5i) | Viagra                                                                                               | Analyse thermique :<br>Thermogravimétrie<br>Analyse thermique différentielle | Discrimination entre un médicament contrefait et authentique                                  |
|                                                     | Viagra<br>Cialis                                                                                     | Spectroscopie infrarouge                                                     | Discrimination entre des médicaments contrefait et authentique                                |
|                                                     | Impureté issue de la synthèse du sildénafil                                                          | Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur –UV et DAD  | Détermination des impuretés issues de la synthèse du sildénafil                               |
|                                                     | Sildénafil<br>Tadalafil                                                                              | Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur UV          | Détermination quantitative dans des médicaments contrefaits                                   |
|                                                     | Sildénafil<br>Tadalafil<br>Vardénafil                                                                | Chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un détecteur DAD   | Quatification des substances dans des échantillons contrefaits                                |
|                                                     | Analogue du PDE-5i                                                                                   | Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur CAD         | Détection de nouvelle substance analogue des PDE-5i                                           |
|                                                     | Complément alimentaire 100 % naturel                                                                 | Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire                              | Identifier la présence de substances suspectes pour l'amélioration des performances sexuelles |
|                                                     | Cialis, Viagra                                                                                       | Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire                              | Caractérisation de la formulation d'échantillons contrefaits                                  |

Ainsi, une méthodologie générale a été proposée dans l'étude de Sacré [57], elle présente une approche générique pour détecter les médicaments contrefaits contenant de la PDE5-i (Figure I-18).

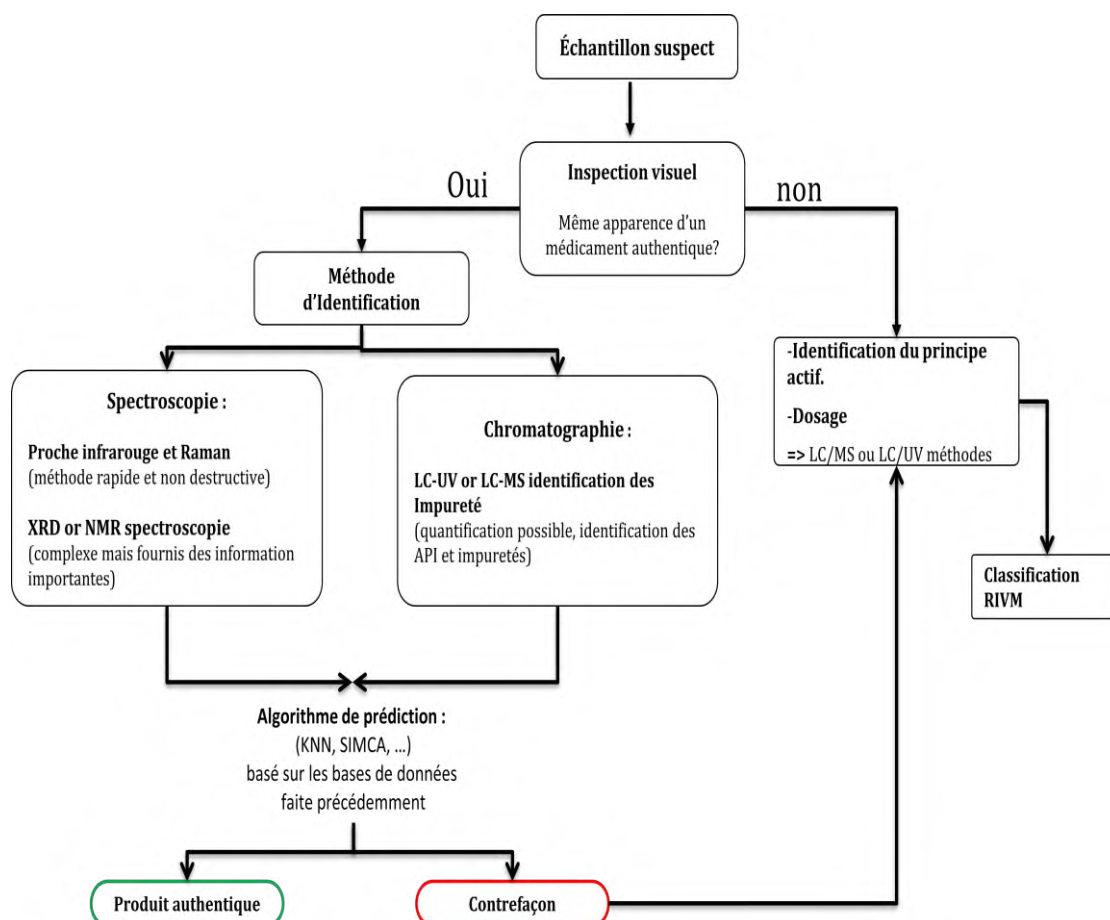


Figure I-18 : Stratégie appliquée pour la détection et la classification des échantillons suspects contenant PDE5-i [57]

Rappelons que la classe thérapeutique des PDE-5i trône l'ensemble des classes thérapeutiques. En effet, un nombre important d'articles scientifiques rapportent la caractérisation des inhibiteurs de la PDE-5i dans le domaine de la lutte contre la contrefaçon. Le Tableau I-5 met en perspective quelques travaux de littérature, ainsi, il présente les techniques analytiques et les conditions expérimentales utilisées pour la caractérisation des inhibiteurs de la PDE-5i et leurs substances analogues. À noter que la technique présentée dans ce tableau et la chromatographie liquide liée à différent détecteur. Par ailleurs, les informations dans ce tableau peuvent être affinées par d'autres techniques analytiques selon le cas d'études.

Tableau I-5 : Conditions expérimentales utilisées pour la caractérisation des inhibiteurs de la PDE-5

| Substances                                             | Techniques analytiques | Colonnes                                  | Modes d'élutions | Phases mobiles                                                    | Débit (ml/min) | Auteurs               |
|--------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------|
| Tadalafil                                              | LC-MS/MS               | Hypersil BDS C18 (100 × 2.1 mm, 2.4 µm)   | Isocratique      | Méthanol / acétate d'ammonium (52:48 v/v)                         | 0.2            | Bo Ma et al. [58]     |
| Thiono analogue du sildenafil                          | LC-UV                  | XTerra MS-C18 (100 × 2.1 mm, 3.5 µm)      | Isocratique      | Méthanol / eau acidifiée (50:50 v/v)                              | 0.25           | Blok-Tip et al.[59]   |
| Aildenafil analogue du sildenafil                      | LC-DAD-MS              | XTerra MS-C18 (100 × 2.1 mm, 3.5 µm)      | Gradient         | Méthanol / eau acidifiée                                          | 0.25           | Venhuis et al. [60]   |
| Trans-tadalafil, tadalafil, and sildenafil             | LC-UV                  | Symmetry C18 (150 × 3.9mm, 5µm)           | Isocratique      | Méthanol/eau* *(0.1% acide formique) (v/v)                        | 1              | Venhuis et al.[61]    |
| Thiosildenafil                                         | UPLC-DAD               | Acquity UPLC BEH C18 (50 × 2.1 mm, 1.7µm) | Gradient         | Eau purifiée*/ Acétonitrile*(v/v) *(0.1% acide trifluoroacétique) | 0.3            | Vaysse et al. [62]    |
| Sildénafil-analogues                                   | LC-DAD                 | Zorbax SB-C18 (250 × 4.6 mm, 5µm)         | Gradient         | Formate d'ammonium / acétonitrile                                 | 1              | Wollein et al.[63]    |
| Sulfoildenafil analogue du sildenafil                  | LC-MS                  | Zorbax SB-C18 (150 × 2.1 mm, 3.5µm)       | Gradient         | Acide formique dans l'eau / acétonitrile                          | 0.2            | Gratz et al. [64]     |
| Thioketone                                             | LC-MS                  | Zorbax SB-C18 (150 × 4.6 mm, 5µm)         | Gradient         | Acide formique dans l'eau / Acide formique dans acétonitrile      | 1              | Reepmeyer et al. [65] |
| Sildénafil, Tadalafil vardénafil et quelques analogues | UHPLC-UV               | XTerra RP18 (150 × 4.6 mm, 5µm)           | Gradient         | Tampons formate d'ammonium/ acétonitrile                          | 1              | Sacré et al. [55]     |
| Acetildenafil                                          | LC-MS                  | Zorbax SB-C18 (150 × 4.6 mm, 5µm)         | Gradient         | Acide formique dans l'eau / Acide formique dans acétonitrile      | 1              | Reepmeyer et al.[66]  |

|                                                                                                 |        |                                                          |             |                                                                                         |     |                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|----------------------------------------------------------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------------|
| (2-hydroxypro-<br>-pylnortadalafil)<br>(n-butylmortada-<br>-lafil)<br>analogues du<br>tadalafil | LC-MS  | Zorbax SB-C18<br>(150 × 2.1 mm,<br>3.5µm)                | Gradient    | Acide formique dans l'eau /<br>Acide formique dans acétonitrile                         | 0.2 | Toomey et al. [67]  |
| Aminotadalafil<br>analogues du<br>tadalafil                                                     | LC-UV  | Hypersil BDS C18<br>(200 × 4.6 mm, 5 µm)                 | Gradient    | Dihydrogéo-phosphate de<br>sodium/eau                                                   | 1   | Haberli et al. [68] |
| Analogue du<br>vardénafil                                                                       | LC-DAD | Zorbax XDB-C8 (150<br>× 4.6 mm, 5 µm)                    | Gradient    | Dihydrogéo-phosphate de<br>potassium / acétonitrile                                     | 1   | Lam et al.[69]      |
| Analogue du<br>vardénafil                                                                       | LC-UV  | Shiseido Capcell PAK<br>C18 MG II (250 × 4.6<br>mm, 5µm) | Isocratique | Hexanesulfonate de sodium<br>0,1% et acide phosphorique /<br>acétonitrile<br>(5:95 v/v) | 0.1 | Lee et al.[70]      |
| Deux analogues<br>du sildénafil et<br>du vardénafil                                             | LC-UV  | Shiseido Capcell PAK<br>C18 (250 × 4.6 mm,<br>5µm)       | Gradient    | Hexanesulfonate de sodium<br>0,1% et acide phosphorique /<br>acétonitrile               | 1.2 | Choi et al.[71]     |

D'après le Tableau I-5, plusieurs substances analogues des inhibiteurs de la PDE-5i ont été mises en évidence par la chromatographie liquide. De plus, on remarque bien que les conditions expérimentales diffèrent d'une étude à une autre.

### IV. Conclusion

Les pratiques de la contrefaçon ont évolué au cours du temps, en effet, avec l'apparition des technologies de pointe, le phénomène a pris une avancée technique. La lutte contre la contrefaçon des médicaments est une procédure assez délicate, elle requiert un ensemble de mesure dans le but d'assurer la sécurité sanitaire des patients. Elle doit porter sur l'élaboration d'une stratégie pour l'expertise des échantillons suspects. Elle doit veiller sur deux éléments essentiels à savoir : la fiabilité et la rapidité d'analyse.

La caractérisation d'échantillon contrefait implique un aspect important qui est le conditionnement du produit, en effet l'utilisation des matériaux de qualité inférieure peut entraîner une dégradation des matières utilisées par conséquent de produit toxique peuvent apparaître et nuire à la santé des patients. Un autre aspect primordial est celui de l'identification et la qualification des substances chimiques contenue dans un médicament contrefait, de plus, l'analyse peut toucher d'autres éléments figurant dans la composition du produit tels que : les solvants résiduels et les impuretés organiques et inorganiques.

L'analyse dépend principalement de la quantité d'échantillons disponible, elle s'appuie en premier lieu sur des techniques analytiques non destructives, ensuite si la quantité d'échantillon est suffisante l'analyse peut s'orienter vers des techniques plus spécifiques. De plus, la combinaison des résultats obtenus par chaque technique contribue à la caractérisation d'un échantillon contrefait.

**Chapitre II. Approches chimiométriques pour la lutte contre la  
contrefaçon**

### I. Introduction

La chimiométrie est une discipline de la chimie, elle a été introduite par un groupe de recherche en chimie à la fin des années 1960 dans les domaines de la chimie analytique et de la chimie organique. Elle repose sur l'utilisation des méthodes mathématiques, statistiques et informatiques pour choisir et définir les bonnes expériences ainsi que les procédures optimales. Également, elle permet d'extraire le maximum d'information utile, présente dans des données de mesures [72].

L'application des outils de chimiométrie est apparue depuis que les statistiques univariées n'étaient plus capables de décrire et de modéliser des expériences chimiques [72]. Aujourd'hui, d'autres éléments essentiels contribuent à la floraison de cette discipline, notamment l'accessibilité à des logiciels statistiques robustes, et également l'attitude évolutive d'utilisation de la statistique dans la chimie analytique [73].

Dans ce sens, une approche chimiométrique typique ne repose pas sur des principes de base axée sur les données, mais elle vise à créer des modèles empiriques, pour ensuite fournir un résultat qualitatif ou quantitatif [48, 74, 75]. En effet, les outils chimiométriques assistent l'analyste en lui proposant des algorithmes pour structurer les données, de plus, elles permettent de montrer les relations qui existent entre les variables et les échantillons [45].

Dans le cadre de la lutte contre la contrefaçon, plusieurs approches chimiométriques utilisées principalement dans le cycle de vie d'une méthode analytique seront discutées dans ce paragraphe à savoir : les plans d'expériences, l'espace de robustesse en phase de développement ou encore les profils d'incertitude et de risque en phase la validation analytique.

### II. Approches chimiométriques et intérêt d'application

Les approches chimiométriques ont un effet dissuasif face à l'interprétation des résultats du laboratoire. En effet, elle rend le caractère des résultats techniquement plus exploitable et pratiquement plus opérationnel. Étant plus accessibles, les approches chimiométriques gagnent du terrain, en encourageant leur application.

Par ailleurs, les approches chimiométriques permettent de donner un nouveau souffle à la caractérisation des médicaments contrefaits, elles s'adaptent en fonction de l'objectif de la méthode analytique, et la technique utilisée.

Une méthode analytique est une réponse matérialisée à un problème donné. C'est une entité vivante qui parcourt un chemin vital depuis la naissance jusqu'à l'abandon. Il existe deux types de méthode dans le domaine analytique à savoir : les méthodes qualitatives et quantitatives. L'objectif d'une méthode analytique peut se résumer en sa capacité à quantifier chacune des quantités inconnues présentes dans un échantillon contrefait. Ainsi, pour mettre en œuvre une méthode analytique, il convient de donner un petit aperçu sur les différentes étapes de son cycle de vie [76].

Le cycle de vie d'une méthode analytique regroupe plusieurs approches chimiométriques, il peut se décomposer généralement en quatre grandes phases (Figure II-1):

- Une phase de sélection où des objectifs et des conditions opératoires initiales sont définis ;
- Une phase de développement, avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences ;
- Une phase de validation (Validation interne/externe) précédée, selon les cas, d'une phase de prévalidation ;
- Une phase d'application en routine (usage en routine), incluant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle ou une revalidation.

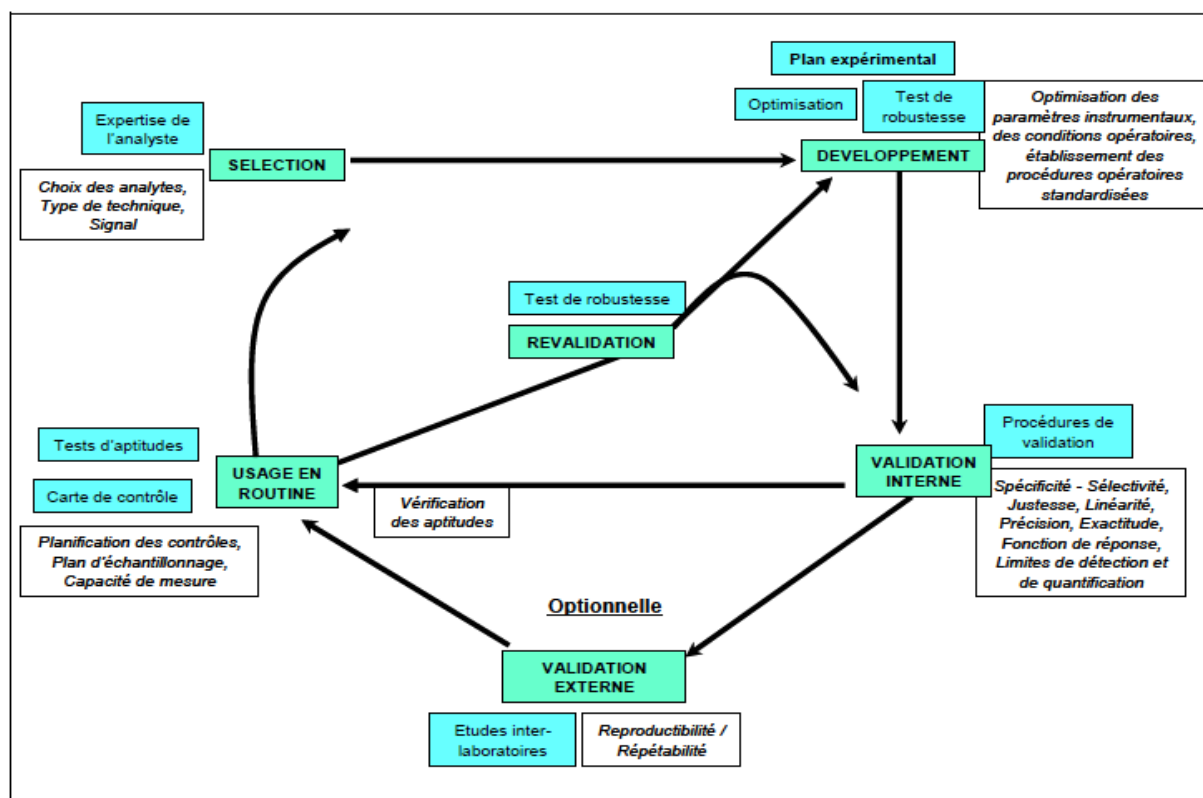


Figure II-1 : Cycle de vie d'une méthode analytique [77]

La Figure II-1 présente les différentes étapes de cycle de vie d'une méthode analytique, également, elle donne un petit aperçu des différentes approches chimiométrique utilisé pour la caractérisation d'un médicament contrefait.

### III. Sélection de la méthode analytique

La sélection d'une méthode analytique est une étape d'une grande importance pour toutes analyses quantitatives, son choix, parfois difficile, nécessite de l'expérience et l'intuition. En effet, le niveau d'exactitude souhaité est un critère de sélection crucial dans la caractérisation des médicaments contrefaits. Cependant, une haute fiabilité requiert un grand investissement en temps. La méthode retenue représente habituellement un compromis entre l'exactitude souhaitée et le temps et le budget disponible pour l'analyse [78].

Selon le choix rigoureux de l'analyste, une bonne méthode analytique pour lutter contre la contrefaçon est une méthode axée sur un objectif bien défini avec une problématique bien cernée conformément à des guidelines normatifs et à partir des méthodes publiées dans des journaux scientifiques.

Selon la norme ISO 17025 : « Le laboratoire doit utiliser des méthodes d'essai et/ou d'étalonnage, y compris des méthodes d'échantillonnage, qui répondent aux besoins du client et qui conviennent aux essais et/ou étalonnages qu'il effectue, de préférence les méthodes publiées comme normes internationales, régionales ou nationales » [79].

Étant le point de départ de la validation analytique [80], le choix d'une méthode analytique dépend principalement des décisions qui seront prises au cours des différentes étapes de cycle de vie d'une méthode analytique. De ce fait, un problème mal structuré conduit à des décisions inappropriées, par conséquent, la perte de temps, de réactifs et d'argent[81].

Avant de choisir une méthode, il faut faire une étude technique sur la capacité du laboratoire. Ce choix doit être adapté le mieux possible avec les instruments et les réactifs disponibles au laboratoire, le coût des mesures effectuées et les vertus exigées [73].

### IV. Développement analytique et plans d'expériences

Le développement analytique est synonyme d'optimisation des différentes étapes du mode opératoire, il peut prendre deux chemins différents selon les dispositifs mis en place par l'analyste.

Le développement peut emprunter le mode classique, c'est un mode de développement dans lequel on parcourt des expériences aléatoires simples et univariées (OVAT), c'est un processus complexe qui nécessite beaucoup d'expériences et de temps. Par contre, l'utilisation des plans d'expériences permet de suivre un cheminement précis et non pas de simplement réaliser des expériences aléatoires, afin de maîtriser la programmation des essais et les délais. Ainsi, il permet de développer les différents paramètres du protocole opératoire, également, il permet de les adapter aux conditions opératoires d'utilisation de la méthode.

### IV.1. Plans d'expériences

Les plans d'expériences constituent une alternative puissante des méthodes classiques univariées d'optimisation. Ils sont des méthodes de planification optimale d'expériences qui accompagnent une recherche scientifique ou bien des études industrielles, ainsi, regroupant un ensemble d'outils statistiques. Les plans d'expériences peuvent améliorer et optimiser les performances du fonctionnement d'un processus, et peuvent atteindre plusieurs disciplines dont leurs processus s'accordent avec des méthodologies des systèmes modélisés, définis par un modèle mathématique approximatif sous la forme suivante :

$$Y = f(x_i) \quad \text{Eq. II-1}$$

Ils fournissent le maximum d'information avec le minimum d'expériences on adoptant une démarche rigoureuse, et on respectant différentes règles mathématiques [82].

Dans la méthodologie des plans d'expérience, l'analyste cherche à déterminer et à établir les liens entre deux types de variable :

- La réponse : grandeur physique étudiée,
- Les facteurs : grandeur physique modifiable par l'expérimentateur, censé influencer sur les variations de la réponse.

Elle vise aussi à comprendre la relation entre la réponse et les facteurs, que les facteurs entrent eux, via l'établissement d'un modèle mathématique approprié.

#### IV.1.1. Modélisation mathématique

Au terme d'une planification expérimental, le modèle mathématique est un indicateur préalable de la relation entre une réponse et les facteurs issue d'un système modélisé (technique d'analyse, procédure industrielle..), il est valable que dans le domaine d'étude. Il peut être représenté par l'équation suivante :

$$y = \sum b_i X_i + \sum b_{ij} X_i X_j + \sum b_{ii} X_i^2 + \dots \quad \text{Eq. II-2}$$

Avec :

- y est la réponse ou la grandeur d'intérêt,
- $X_i$  représente un niveau du facteur i,
- $X_j$  représente un niveau du facteur j,
- $b_0, b_i, b_{ij}, b_{ii}$  sont les coefficients du polynôme.

Deux composantes doivent être ajoutées au modèle précédemment décrit à savoir : le manque d'ajustement ( $\delta$ ) et erreurs aléatoires ou expérimentales ( $\varepsilon$ ).

Le manque d'ajustement traduit l'écart entre le modèle choisi avant l'expérimentation et le modèle réel qui décrit le phénomène étudié. De plus, l'erreur aléatoire montre la dispersion des résultats obtenus depuis les répétitions de la mesure dans le même point expérimental [83].

C'est ainsi que le modèle postulé devient comme suit :

$$y = f(X_1, X_2, X_3, \dots, X_n) + \delta + \varepsilon \quad \text{Eq. II-3}$$

### IV.1.2. Classification des plans d'expériences

Plusieurs types de plans sont définis pour réaliser les expériences et sont décrits dans la littérature. Cependant, le choix d'un plan d'expérience n'a pas de sens tant qu'il n'est pas subordonné au choix préalable d'un modèle mathématique [84]. Le choix adéquat d'un plan d'expérience peut se baser sur des prérequis, tels que l'objectif poursuivi par l'analyste, le type et le nombre de facteurs à étudier, les informations à recueillir, et même les exigences de l'expérimentateur [81]. On peut trouver parmi les plans d'expériences : plan pour criblage des facteurs, plan pour surface de réponse (RSM) et plan de mélange.

Le Tableau II-1, donne une classification des plans d'expériences.

Tableau II-1 : Classification des plans d'expériences [85]

| Classe                              | Type de plan sélectionné    |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| Criblage des facteurs               | Plans de Plackett-Burman    |
|                                     | Plans Factoriels            |
|                                     | Plans de Taguchi            |
| Optimisation des facteurs           | Plans Central composite     |
|                                     | Plans de Box-Behnken        |
|                                     | Plans de Doehlert           |
| Optimisation d'un mélange           | Plans de Scheffé            |
|                                     | Extreme vertices design     |
| Comparer un grand nombre de produit | Blocs incomplets équilibrés |

### IV.1.2.1. Plan de criblage

Une stratégie de recherche optimale est une stratégie à vocation méthodologique facile et utilisable par l'expérimentateur. L'étape de criblage est une étape clé dans l'approche simultanée des plans d'expériences. Il permet de repérer les facteurs expérimentaux susceptibles d'influencer le résultat avec un nombre minimal d'expériences afin de définir leurs domaines expérimentaux réels.

Dans la plupart des expériences qui possède un nombre élevé des facteurs, le choix du plan factoriel complet et/ou les plans factoriels fractionnaires à deux niveaux peut emmener à réaliser une matrice expérimentale avec plusieurs expériences à cause du nombre élevé de facteur. Cependant, le but ici c'est de réaliser le strict minimum d'expérience, pour cela les plans de Plackett-Burman sont les plus utilisés. En fait, P. L. Plackett et J. P. Burman ont inventé, en 1946, les conceptions alternatives à deux niveaux qui sont des multiples de quatre c-à-d des séries de 12, 20 et 28. Ils ont un intérêt particulier, car ils comblent les lacunes dans les modèles standards [83].

Les matrices de calcul de ces plans sont des matrices d'Hadamard, parce que ces matrices ont 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 lignes, etc. Elles permettent donc d'effectuer des expérimentations ayant un nombre d'essais intermédiaire de celui des plans factoriels qui, eux, ont seulement  $2^k$  lignes (4, 8, 16, 32, etc.). Les plans de Plackett-Burman sont le plus souvent saturés. Le modèle mathématique approximatif est alors un modèle sans interaction :

$$Y = a_0 + \sum a_i X_i \quad \text{Eq. II-4}$$

### IV.1.2.2. Plans pour surface de réponse

Les modèles d'ordre 1 discuter précédemment ne permettent pas toujours de rendre compte correctement du phénomène étudié. Il existe en effet des situations où de tels modèles vont s'avérer trop pauvres, principalement parce qu'ils ne comportent pas de termes quadratiques aptes à traduire une « courbure » dans la réponse étudiée. Afin de pallier ce type de problème, il est possible d'ajuster cette fois un modèle polynomial complet de degré deux. On dit alors que l'on ajuste une surface de réponse [84].

Les plans pour surfaces de réponse constituent le second volet de l'approche simultanée des plans d'expériences. C'est une application succédant à l'étude de criblage, puisque logiquement, elle n'utilise que les facteurs précédemment jugés influents. Ils tiennent compte de facteurs à plus de deux niveaux [86]. Cette technique vise à déterminer d'une façon quantitative les variations de la fonction réponse vis-à-vis des facteurs d'influence significative [83].

Les plans pour surface de réponse sont utilisés pour la détermination des conditions optimales. Elles illustrent graphiquement la relation entre les différentes variables expérimentales et les réponses. En effet, elles permettent de schématiser la variation de la réponse prédite dans l'espace des facteurs quantitatifs les plus importants sous la forme d'une représentation géométrique. En d'autres termes, les facteurs influents subissent une concaténation d'opération à l'aide de la méthodologie de la surface de réponse, dans le but de repérer un éventuel optimum dans un domaine expérimental donné [87].

La mise en pratique de telles méthodologies nécessite l'application de plans d'expériences adéquate, parmi lesquels peuvent être cités les plans composites centrés, le plan de *Box-Behnken* et le plan de *Dohrlert*. Dans le présent travail, nous allons détailler le calcul de surface de réponse par le plan de *Box-Behnken*.

#### - Plans de Box-Behnken

Box et Behnken ont proposé en 1960 des plans qui permettent d'établir directement des modèles du second degré. Tous les facteurs ont trois niveaux : -1, 0 et +1. Ces plans sont faciles à mettre en œuvre et possèdent la propriété de séquentialité. On peut entreprendre l'étude des  $k$  premiers facteurs en se réservant la possibilité d'en rajouter de nouveau sans perdre les résultats des essais déjà effectués [83, 86].

Le plus connu des plans de Box-Behnken est celui qui permet d'étudier trois facteurs. Les points expérimentaux sont au milieu des arêtes de chacun des côtés du cube (Figure II-2).

Ce plan comporte douze essais auxquels on peut ajouter un (ou plusieurs) point(s) central [86].

Le plan Box-Behnken ne possède pas des points expérimentaux aux extrémités des arrêts du cube, chaque point dans la conception se positionne sur une sphère ou au centre d'une sphère. Dans ce cas-là, l'erreur de prévision des réponses est la même pour tous les points, ceci est un critère d'isovariance par rotation, chose qui donne une valeur particulière à ce type des plans.

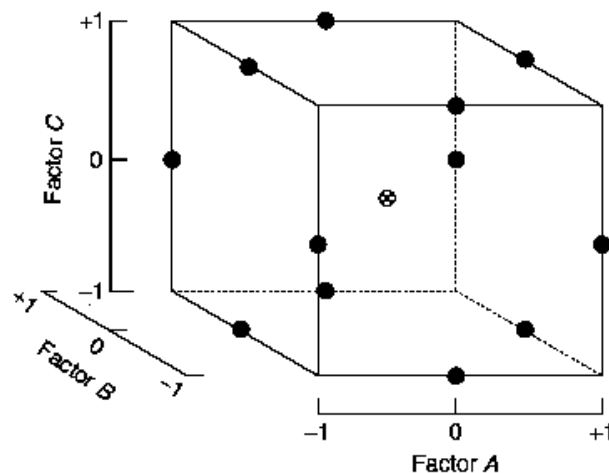


Figure II-2 : Plan de Box-Behnken à trois facteurs

Le plan box-Behnken est un plan alternatif du plan factoriel  $3k$ , ce plan est formé en combinant un plan factoriel  $2k$ , avec un plan en blocs incomplet [86]. Il tient compte de facteurs à plus de deux niveaux et il est destiné aux procédures ayant plus de deux facteurs. Il permet d'évaluer les surfaces de réponse en les ajustant à des modèles polynomiaux d'ordre 2.

Le nombre d'essais nécessaires pour exécuter le plan Box-Behnken suit la formule suivante :

$$N = 2f \times (f - 1) + n \quad \text{Eq. II-5}$$

Avec

$N$  : Nombres d'expériences;

$f$  : Nombres de facteur ;

$n$  : Nombre de répétitions au centre.

Le nombre total d'essais pour un plan Box-Behnken de trois facteurs est de 15 essais (Tableau II-2), moins que les 17 essais requis pour un plan composite centré avec le même nombre de répétitions et les 27 essais requis pour un plan factoriel complet  $3^3$  sans

répétitions. Par conséquent, le plan de Box-Behnken permet d'optimiser un procédé en utilisant le minimum d'essais expérimentaux.

Tableau II-2 : Plan de Box-Behnken à 3 niveaux et 3 facteurs

| Essais | Facteur 1 | Facteur 2 | Facteur 3 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 1      | -1        | -1        | 0         |
| 2      | -1        | 1         | 0         |
| 3      | 1         | -1        | 0         |
| 4      | 1         | 1         | 0         |
| 5      | -1        | 0         | -1        |
| 6      | -1        | 0         | 1         |
| 7      | 1         | 0         | -1        |
| 8      | 1         | 0         | 1         |
| 9      | 0         | -1        | -1        |
| 10     | 0         | -1        | 1         |
| 11     | 0         | 1         | -1        |
| 12     | 0         | 1         | 1         |
| 13     | 0         | 0         | 0         |
| 14     | 0         | 0         | 0         |
| 15     | 0         | 0         | 0         |

Le Tableau II-2 présente la matrice expérimentale du plan Box-Behnken avec 12 essais et 3 points au centre. Ce type de plan ordonne des résultats satisfaisants, il permet d'aligner l'objectif du présent travail avec l'étude d'optimisation dans le cas de développement des méthodes chromatographiques.

Généralement, la réalisation d'un plan d'expérience exige une préparation soignée et s'effectue en respectant les étapes suivantes [88] :

- Définition des objectifs de l'étude ;
- Choix des réponses ;
- Établissement de la liste des facteurs influents ;
- Choix du domaine de variation des facteurs ;
- Établir la liste de l'ensemble des contraintes si possible ;
- Choix et construction du plan d'expériences ;
- Expérience aux bornes du domaine d'étude ;
- Éviter les confusions d'effet en recherchant l'orthogonalité entre des facteurs ;
- Utiliser les logiciels de construction de plans d'expériences quand cela est possible ;
- Validation statistique du modèle postulé ;
- Interprétation des résultats ;
- Conclusion de l'étude.

## V. Optimisation multicritère et espace de robustesse

Il est relativement difficile de trouver les conditions optimales de variation de chaque facteur dans l'analyse chromatographique, en particulier lorsque la relation entre la réponse choisie et les facteurs étudiés ne soient pas modélisable par les outils mathématiques usuels. En parallèle, la situation peut devenir encore plus complexe lorsqu'on veut optimiser plusieurs réponses simultanément. Effectivement, on se trouve confronté à une multiplicité de mesures qui doivent être équilibrées les unes par rapport aux autres, pondérées en fonction de leur importance relative, et diversement manipulées pour obtenir un jugement optimal. Si, par certains moyens, les différentes propriétés pouvaient être mesurées en unités cohérentes ou, mieux encore, exprimées en nombres sur une échelle commune et sans dimension, les opérations arithmétiques destinées à combiner ces mesures deviendraient possibles [89].

### V.1. Fonction de désirabilité

C'est dans ce sens que l'approche de la fonction désirabilité a été proposée par Harrington en (1980), elle vise à optimiser simultanément plusieurs équations. L'approche est basée essentiellement sur la transformation de toutes les réponses obtenues à partir de différentes échelles de mesure en une échelle identique de désirabilité et sans dimension [81, 90]. Les valeurs des fonctions de désirabilité ( $d_i$ ) sont comprises entre 0 et 1. Comme la montre la (Figure II-3) la valeur de 0 est attribuée lorsque les facteurs conduisent à une réponse inacceptable (non désirable) et celle de 1 lorsque la réponse représente la performance maximale désirée pour les facteurs considérés.

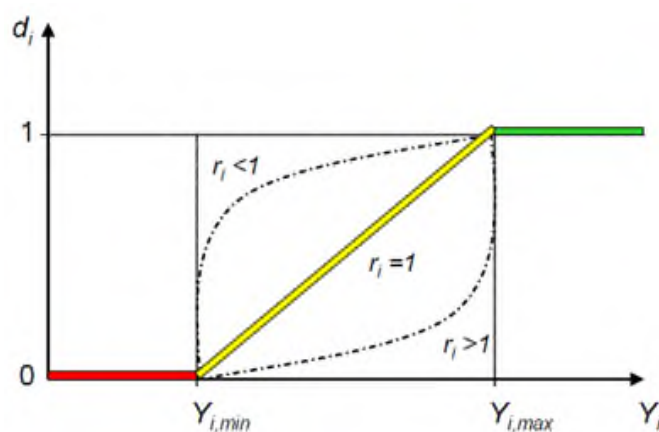


Figure II-3 : Désirabilité ( $d_i$ ) d'une réponse  $Y_i$  pour un facteur considéré [91]

Les valeurs de la désirabilité individuelle peuvent être ainsi obtenues par la relation suivante :

$$\begin{cases} 0 & \text{if } y_i < y_{i.min} \\ \left( \frac{y_i - y_{i.min}}{y_{i.max} - y_{i.min}} \right)^s & \text{if } y_{i.min} < y_i < y_{i.max} \\ 1 & \text{if } y_i > y_{i.max} \end{cases} \quad \text{Eq. II-6}$$

Avec

- $Y_{i.min}$  : la valeur en dessous de laquelle la réponse  $Y_i$  ne convient pas ( $d_m = 0$ ) ;
- $Y_{i.max}$  : la valeur cible au-dessus de laquelle la réponse  $Y_i$  est très satisfaisante ( $d_m = 1$ ) ;
- $s$  : le facteur modifiant l'importance d'une augmentation de la réponse  $Y_i$  pour la désirabilité individuelle considérée. Cela correspond à la pondération du facteur dépendant de l'utilisateur en fonction du degré de désirabilité que l'on voudrait avoir pour une réponse donnée entre  $Y_{i.min}$  et  $Y_{i.max}$ .

Ensuite, l'ensemble des désirabilités individuelles est rassemblé en une seule désirabilité globale  $D$  qui est leur moyenne géométrique. La valeur de  $D$  la plus élevée est obtenue dans les conditions où la combinaison des différentes réponses est globalement optimale.

$$D = (d_1 d_2 d_3 \dots d_n)^{\frac{1}{n}} \quad \text{Eq. II-7}$$

### V.2. Espace de robustesse

Selon la directive ICH Q8 (R2), le design space (DS) est défini comme un sous-ensemble de l'espace de travail (le domaine expérimental) à l'intérieur duquel les critères de qualité associés aux paramètres critiques du processus sont rencontrés tout en considérant l'incertitude associée à leur prédiction [92]. Il ressort donc que par ce concept de DS, le risque associé au développement d'une méthode analytique est évalué. La directive définit d'ailleurs que, même si des changements de conditions opératoires à l'intérieur de cet espace de conception interviennent, cela ne doit pas être considéré comme une déviation par rapport au mode opératoire. Suivant cette définition et celle de la robustesse évoquée dans la directive ICH Q2 (R1) [93], le DS est définie comme étant une zone de la robustesse de la méthode analytique. Par ce concept, on voit que l'étape d'évaluation de la robustesse de la méthode,

conventionnellement entreprise à la suite de la validation de la méthode, est directement comprise dans la phase de développement de la méthode [94].

La Figure II-4 présente le schéma générale d'un DS à l'intérieur du domaine expérimental définie à l'aide d'une probabilité de succès fixée ( $\pi_{DS}$ ) pour le critère  $S > 0$  et ce, en fonction des paramètres  $X$  du processus.

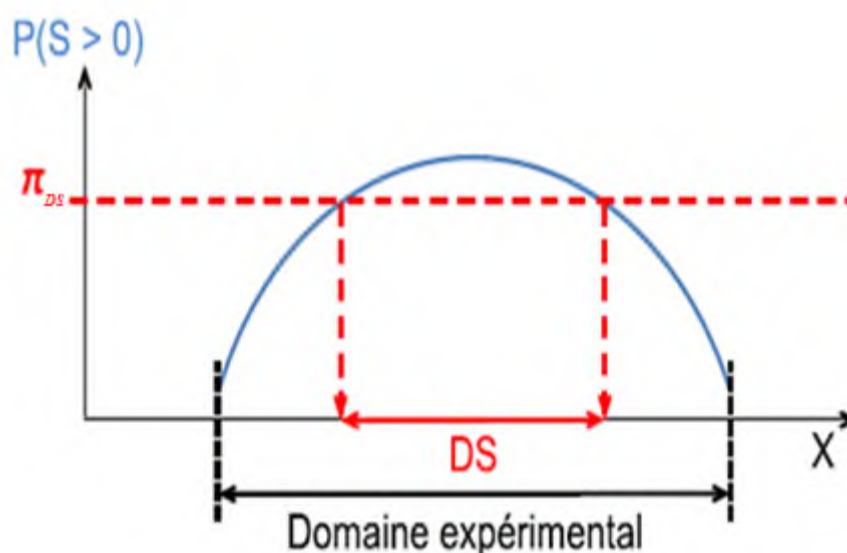


Figure II-4 : Représentation schématique de l'espace de robustesse (DS) [94]

La pertinence de l'approche DS a été démontrée dans plusieurs cas notamment dans l'application du développement des méthodes analytiques. Une étude portant sur l'utilisation du DS [95] a ainsi mis en évidence le développement et l'optimisation d'une méthode analytique pour la séparation de trois composés chiraux. Dans cette étude, l'application de l'approche DS a permis de trouver une bonne corrélation entre des données obtenues à partir de l'utilisation du plan composite central avec le comportement chromatographique prédit. Egalement, l'équipe de Milošević et al. [96], a mis en lumière l'utilisation de l'approche DoE-DS pour le développement d'une méthode analytique. La méthode consiste à séparer des analytes à caractère basique (la dichlorhydrate de trimétazidine et deux impuretés) par HPLC en phase inverse (RP-HPLC). En utilisant un agent chaotropique, l'approche DS s'est révélée appropriée pour ajuster la rétention, améliorer la symétrie maximale et l'efficacité de séparation des substances pharmaceutiques basique dans les systèmes RP-HPLC.

La Figure II-5 présente un exemple de DS permettant de fournir des attributs de contrôle de qualité préalablement définie avec une probabilité donnée pour la séparations optimale des analytes à caractère basique.

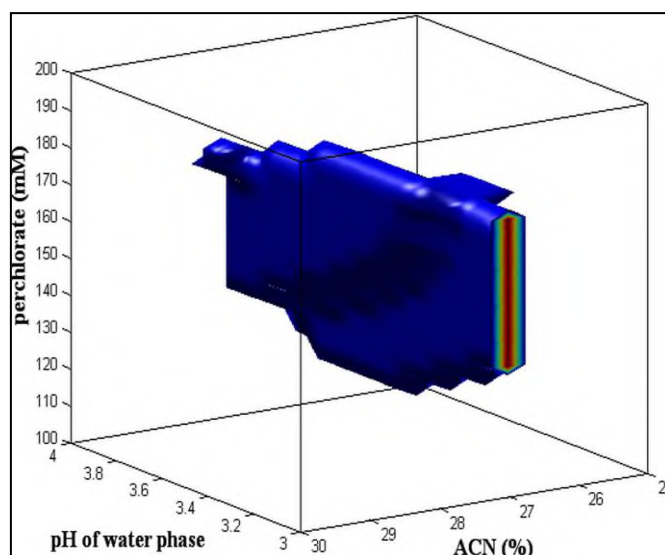


Figure II-5 : Représentation tridimensionnelle du DS réalisant des CQA prédéfinis avec une probabilité  $\pi \geq 95\%$  (d'après [96])

Dans le cadre de la lutte contre la contrefaçon des médicaments, l'approche DS a été utilisée. Une étude [97] a mis en évidence l'application de l'approche DS dans le développement d'une méthode chromatographique permettant de détecter et de déterminer 18 anti-inflammatoires non stéroïdiens et 5 conservateurs pharmaceutiques. En effet, 5 produits pharmaceutiques analysés n'étaient pas conforme aux spécifications de l'Agence européenne des médicaments. Par conséquent, l'approche s'est révélée très utile pour optimiser la séparation des molécules testées, en permettant leur quantification.

La Figure II-6 présente un DS dans lequel la couleur verte représente une zone critique de robustesse. En effet, la probabilité d'obtenir une séparation optimale est relativement faible, alors que la couleur blanche décrit la zone de robustesse optimale où la probabilité d'obtenir une séparation optimale est plus élevée.

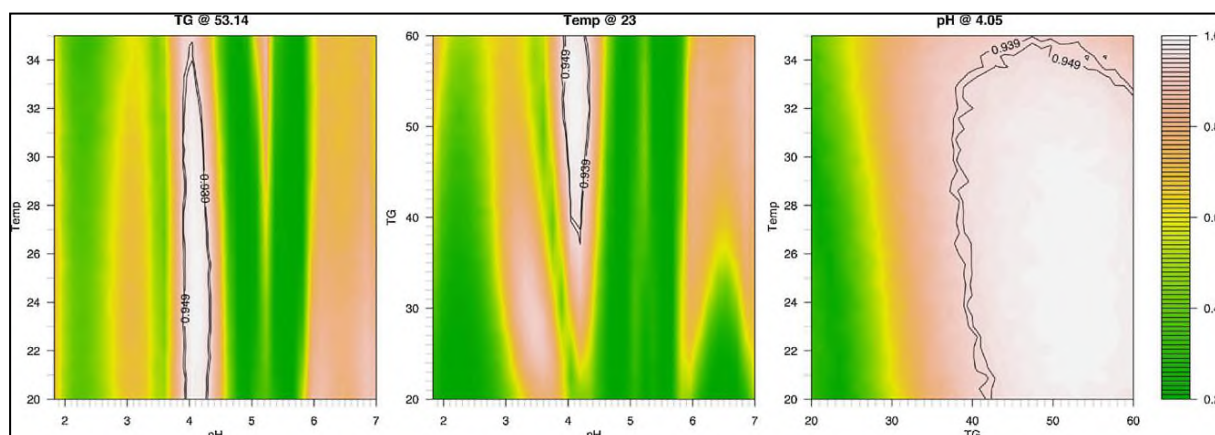


Figure II-6 : Représentation bidimensionnelle du DS (d'après [97])

Le DS est une approche adaptée particulièrement au développement des méthodes analytiques comme mentionné dans les exemples précédents, mais peut avoir un intérêt dans d'autre application. L'avantage principal de l'approche DS réside dans la possibilité d'évaluer simultanément la robustesse et d'identifier les conditions optimales dépendantes du composé.

### VI. Validation analytique

Le contrôle analytique d'un médicament ou de certains de ses constituants est indispensable pour garantir que le médicament en question restera sûr et efficace pendant toute sa durée de validité proposée, c'est-à-dire pendant les phases de stockage, de distribution et d'utilisation. Ce contrôle doit autant que possible être effectué selon des spécifications élaborées et validées lors de la mise au point du produit. Ainsi, on aura l'assurance que les spécifications de qualité sont applicables non seulement à la préparation pharmaceutique qui a servi à établir les caractéristiques biologiques des principes actifs, mais aussi aux formes galéniques mises sur le marché.

La validation des méthodes analytiques a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée. Ces principes s'appliquent à toutes les méthodes utilisées par un fabricant de produits pharmaceutiques, qu'elles soient ou non décrites dans une pharmacopée [98].

Selon la norme ISO17025 : « *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* » [79].

La validation analytique s'exécute suivant différentes approches, elle doit couvrir les critères suivants :

- a- Sélectivité/spécificité ;
- b- Fonction d'étalonnage ;
- c- Fidélité ;
- d- Justesse ;
- e- Exactitude ;
- f- Limite de détection et de détermination ;
- g- Robustesse ;
- h- Incertitude de mesure.

Tous ces critères sont décrits dans la ligne directrice « ICH » relative à la validation analytique (Q2 R1) [99]. Le Tableau II-3 décrit les différents critères de la validation en fonction de type de la méthode d'analyse.

Tableau II-3 : Classification des critères de validation selon le type d'analyse (-) caractère non évalué (+) caractère évalué

| Type d'analyse           | Identification | Dosage des impuretés | Essai limite | Teneur et activité |
|--------------------------|----------------|----------------------|--------------|--------------------|
| Justesse / Exactitude    | -              | +                    | -            | +                  |
| Fidélité:                |                |                      |              |                    |
| - Répétabilité           | -              | +                    | -            | +                  |
| - Fidélité intermédiaire | -              | +                    | -            | +                  |
| Spécificité              | +              | +                    | +            | +                  |
| Limite de détection      | -              | -                    | +            | -                  |
| Limite de quantification | -              | +                    | -            | -                  |
| Linéarité                | -              | +                    | -            | +                  |
| Intervalle d'utilisation | -              | +                    | -            | +                  |

La conformité de l'ensemble des résultats finaux d'une validation analytique est le seul critère permettant le passage à l'étape suivante (la mise en routine). En cas d'échec, un retour à l'étape de développement peut s'avérer nécessaire [29].

### VI.1. Critères de la validation analytique

Il convient de signaler que d'après plusieurs guidelines, le nombre de termes et de critères proposés pour caractériser les performances des méthodes d'analyses est tout à fait impressionnant. Il est hors question de faire une revue exhaustive de leurs définitions, d'autant plus que celles-ci peuvent varier d'une source à l'autre ou, pour une même source, d'une édition à l'autre [80]. Depuis le début des années 2000, des tentatives d'harmonisation ont été initiées, car au sein même d'un secteur d'activités tel que l'industrie pharmaceutique, la terminologie employée diffère [94].

#### - Spécificité

La spécificité d'une procédure analytique quantitative est la capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents. Une procédure d'analyse est dite « spécifique » lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser ou qu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physicochimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substance(s) dans l'échantillon.

Selon cette définition, il s'agit bien de démontrer que la ou les substance(s) quantifiée(s) au sein de la matrice sont bien le ou les analyte(s) recherché(s). Très souvent, la spécificité se fonde sur une absence d'interférences. Elle peut être démontrée par différents moyens. C'est ainsi qu'elle peut être inhérente à la technique (par exemple : identification par spectrométrie infrarouge ou spectrométrie de masse), elle peut être obtenue par séparation préalable (par exemple : chromatographie), de façon mathématique (par exemple : résolution d'équations simultanées) ou de façon biochimique (réactions à l'aide d'enzymes) [100].

### - **Fonction de réponse**

Pour un grand nombre de méthodes quantitatives, la quantification se fait à l'aide d'une fonction de réponse. C'est un élément important de la mesure, car la fonction de réponse doit être établie de façon exacte et doit permettre de sélectionner un modèle d'étalonnage qui sera utilisé en routine. Le modèle doit décrire au mieux la relation entre la variable dépendante Y, généralement une réponse instrumentale, et la variable X qui représente la quantité d'analyte et qui est une variable indépendante génératrice de la réponse Y [100]. Elle permet donc d'obtenir les résultats servant à estimer les différentes sources d'erreurs [94].

La courbe d'étalonnage n'est pas forcément linéaire, elle peut se rattacher à différents modèles plus complexes. En général, des situations particulières où la non-linéarité existe, ils sont liés soit aux instruments de mesure (systèmes de détection) soit à l'étendue de l'intervalle de dosage. En revanche, la fonction de réponse doit être monotone (strictement croissante ou décroissante), son estimation par la méthode des moindres carrés insiste sur la constance de la variabilité de la réponse à tous les niveaux de concentration (homoscédasticité) ; chose qui n'est pas vérifiée lorsque l'intervalle de dosage est plus étendu.

La fonction de réponse utilisée, est celle qui va répondre à ces prérequis, il permet d'ajuster la variabilité maximale des réponses, qui ont une influence directe sur le calcul des résultats et donc sur l'estimation des erreurs résultantes.

### - **Linéarité**

La linéarité est la relation entre la quantité introduite (définie grâce aux échantillons de concentrations connues) et la quantité calculée à posteriori à partir de la courbe d'étalonnage (la fonction de réponse) [94]. La linéarité de la méthode est donc sa capacité, à l'intérieur d'un intervalle de dosage, d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon. La linéarité permet donc la démonstration de

l'adéquation de la méthode par rapport à son utilisation, mais n'est en aucun cas un outil décisionnel [101].

### - Fidélité

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard [50]. Elle peut être évaluée à trois niveaux (Figure II-7) : à savoir la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité. La reproductibilité n'est envisagée que dans le cas d'étude inter-laboratoires [102].

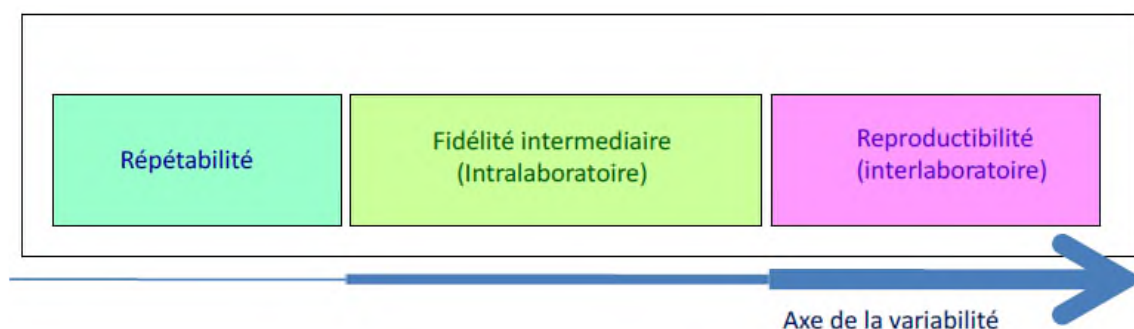


Figure II-7 : Composantes de la fidélité: répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité

Les mesures quantitatives de la fidélité dépendent de façon critique des conditions stipulées, ainsi, elles se distinguent par les conditions suivantes :

**Répétabilité** : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.

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

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

### - Justesse

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série homogène de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une

valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée. La mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de recouvrement et de biais absolu ou relatif (erreur systématique).

- **Exactitude**

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie. L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématiques et aléatoires et d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité.

- **Limite de détection (LD)**

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

- **Limite de quantification (LQ)**

La limite de quantification (LQ) ou limite de dosage d'une procédure est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie.

### VI.2. Approches de la validation analytique

Les techniques de la validation analytique regroupent deux grandes stratégies à savoir : les approches classiques et les approches qui se basent sur l'utilisation de l'intervalle de tolérance. Dans ce paragraphe, une brève présentation sera consacrée aux approches classiques de la validation analytique. Par ailleurs, dans le cadre de cette étude, une mise au point de la validation analytique par le profil d'incertitude sera détaillée, en parallèle la mise en œuvre des différentes étapes de la stratégie sera explicitée ultérieurement dans ce travail.

#### VI.2.1. Approche de validation classique

La validation analytique par les approches classiques consiste à démontrer la fiabilité d'une méthode à travers ses critères de performance. Elle exige l'utilisation de test statistique pour démontrer si une méthode analytique est adaptée à ses objectifs, ainsi elle permet l'évaluation séparée des critères de performance de la méthode. Parallèlement, elles se caractérisent par l'évaluation séparée de la justesse et la fidélité (Figure II-8) (erreurs systématiques et aléatoires).

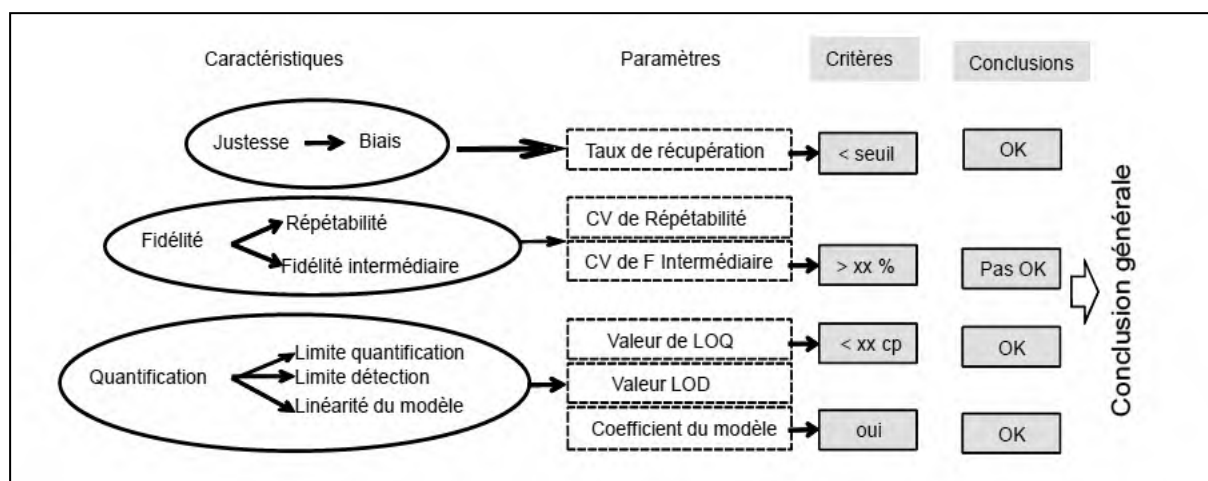


Figure II-8 : Méthodologie de validation analytique par les approches classiques (d'après [100])

Les tests statistiques utilisés pour la mise en œuvre des approches classiques sont :

- Test de valeurs aberrantes (test de Dixon et Grubbs) ;
- Test d'homogénéité des variances (test de *Cochran*) ;
- Test d'égalité de deux variables et calcul d'intervalle de confiance (test de *Student*) ;
- Test d'adéquation du modèle (test de *Fisher*) ;
- Test d'égalité de plusieurs moyennes (test d'ANOVA).

Ces tests requièrent en particulier l'emploi d'hypothèses, ainsi, la démarche pour tester une hypothèse repose sur plusieurs étapes :

- Définir l'hypothèse nulle (notée  $H_0$ ) à contrôler et l'hypothèse alternative (notée  $H_1$ ) ;
- Définir le niveau de signification du test ou région critique notée  $\alpha$  ;
- Choisir un test statistique ou une statistique pour contrôler  $H_0$  ;
- Calculer, à partir des données fournies par l'échantillon, la valeur de la statistique ;
- Prendre une décision concernant l'hypothèse posée et faire une interprétation.

Afin valider une méthode analytique, les approches classiques désignent trois approches conventionnelles à savoir : l'approche descriptive, l'approche de différence et l'approche d'équivalence.

### VI.2.1.1. Approche descriptive

L'approche descriptive utilise seulement des estimations des paramètres statistiques : Biais et fidélité intermédiaire [103]. Les valeurs estimées de chaque critère sont calculées à

chaque niveau de concentration des standards de validation et sont comparées aux limites d'acceptabilité fixées à priori.

Pour le dosage d'un principe actif dans un médicament, une méthode est juste si est seulement si le biais estimé est inclus dans l'intervalle de  $[-2\%, +2\%]$ . De plus, si le  $CV_{FI}$  est plus petit que  $3\%$ , la fidélité de la méthode est acceptée.

### VI.2.1.2. Approche de différence

L'approche de différence est basée sur les tests d'hypothèses comme le test de Student [103-105].

Le critère de justesse (ou le biais de la méthode) est évalué en utilisant un test bilatéral de Student dont les hypothèses nulles et alternatives sont données par les équations 8 et 9. Ceci peut être vérifié en comparant l'intervalle de confiance à  $95\%$  du biais global estimé à la valeur  $0\%$  de biais relatifs.

Hypothèse nulle :

$$H_0 : \text{biais} = 0 \leftrightarrow H_0 : \text{biais relatif} = 0\% \leftrightarrow H_0 : \text{recouvrement} = 100\% \quad \text{Eq. II-8}$$

Hypothèse alternative :

$$H_0 : \text{biais} \neq 0 \leftrightarrow H_0 : \text{biais relatif} \neq 0\% \leftrightarrow H_0 : \text{recouvrement} \neq 100\% \quad \text{Eq. II-9}$$

Avec

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

Si cet intervalle contient  $0\%$  de biais, la justesse de méthode est acceptée, sinon, elle devrait être rejetée comme illustré dans la Figure II-9 (a).

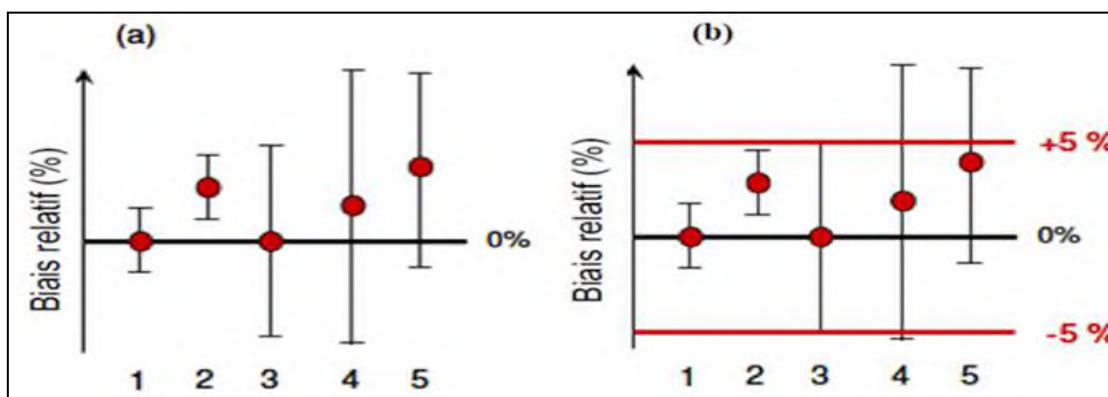


Figure II-9 : Règles de décisions selon l'approche de validation analytique par différence

La Figure II-9 illustre les règles de décision de validité des méthodes analytiques pour 5 situations différentes (1 à 5) selon le biais relatif de la méthode ; (a) l'approche de différence du biais relatif, (b) l'approche d'équivalence du biais relatif avec les limites de décision fixées à  $\pm 5\%$

### VI.2.1.3. Approche d'équivalence

L'approche d'équivalence diffère des précédentes par le fait qu'au lieu de vérifier si le biais relatif estimé ou le  $CV_{FI}$  estimé est inclus dans les limites d'acceptation, elle vérifie si la vraie valeur de ces paramètres est incluse dans leurs limites d'acceptabilité respectives, cela pour chaque niveau de concentration des standards de validation étudiée comme le montre la Figure II-9 (b). Cela consiste à comparer des intervalles de confiance des paramètres étudiés aux limites d'acceptabilité [104, 105].

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

L'hypothèse statistique de ce test est maintenant :

$$\begin{aligned} H_{01} : \text{Biais relatif} \leq -\Delta \text{ vs } H_{11} : \text{biais relatif} > -\Delta \\ \text{Et } H_{02} : \text{Biais relatif} \geq \Delta \text{ vs } H_{12} : \text{biais relatif} < \Delta \end{aligned} \quad \text{Eq. II-10}$$

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

Comme illustrée par les deux lignes horizontales représentant les limites de décision de  $\pm 5\%$  au niveau de la Figure II-9 (b), la règle de décision a changé. Avec cette nouvelle règle, les procédures 4 et 5 sont rejetées, alors que la procédure 2 est maintenant considérée comme valide. Pour le critère de Fidélité, c'est la limite supérieure de l'intervalle de confiance à 95 % du  $CV_{FI}$  qui est comparée à, par exemple, la limite de 3 % et qui doit être plus petite que cette valeur maximale.

### VI.2.2. Nouvelle approche de la validation analytique

Les nouvelles approches de la validation analytique regroupent le profil d'exactitude qui met en jeu l'intervalle de tolérance de type ( $\beta$  expectation), ainsi que le profil d'incertitude qui est basé principalement sur le calcul de l'intervalle de tolérance de type ( $\beta$ ,  $\gamma$ -content). La prise de décision dans ces approches repose sur la combinaison des caractéristiques de justesse (biais ou erreur systématique) et de fidélité (erreur aléatoire) (Figure II-10).

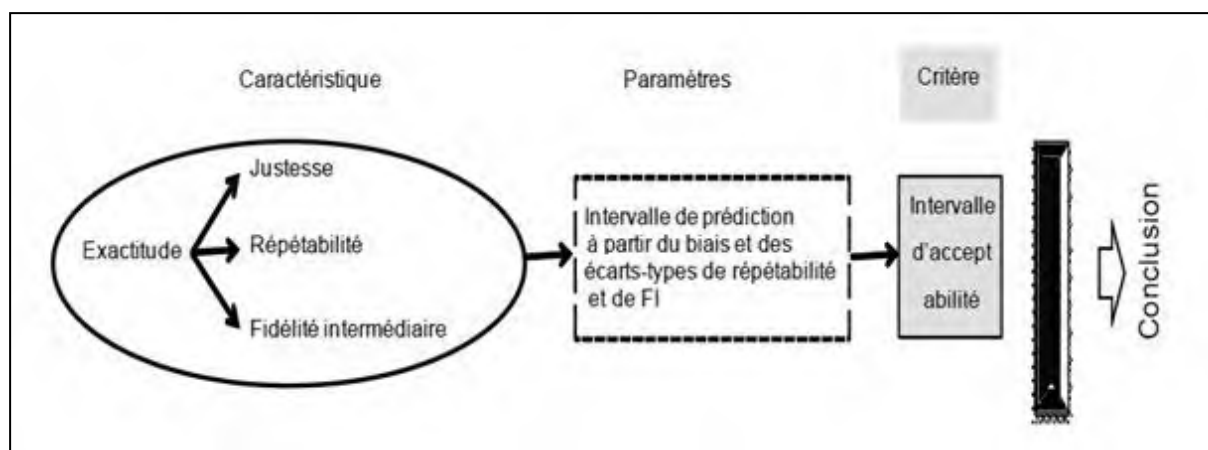


Figure II-10 : Illustration de la méthodologie de la validation analytique basée sur un critère unique (d'après [100])

### VI.2.2.1. Profil d'exactitude

Le profil d'exactitude est un outil graphique (Figure II-11), permet de prendre une décision sur la validité d'une méthode analytique [100]. Il est construit à partir des estimés de l'intervalle de tolérance d'espérance  $\beta$  de mesures attendues à chaque niveau de concentration.

Le principe de cette stratégie de validation peut être traduit par l'équation Eq. II-11, qui stipule que la différence entre une mesure ( $x$ ) et sa vraie valeur ( $\mu$ ) doit être inférieure à la limite d'acceptabilité ( $\lambda$ ) définie a priori.

$$-\lambda < x - \mu < \lambda \Leftrightarrow |x - \mu| < \lambda \quad \text{Eq. II-11}$$

Les limites d'acceptabilité vont être définies dans la mesure du possible, en se référant l'objectif de la méthode analytique. C'est un premier critère permettant à l'analyste de prendre des décisions. Par exemple, la limite d'acceptabilité définie pour le dosage de principes actifs dans une matière première est de 1 % ou 2 %, pour les formes pharmaceutiques elle est de 5 % et pour les analyses dans les matrices biologiques ou environnementales elle est définie à 15 % [102, 103]. Pour la détermination des impuretés, une limite d'acceptabilité minimale de 10 % est communément admise [106, 107].

Une bonne procédure analytique avec un risque connu peut se traduire par la relation suivante :

$$Pr[|x - \mu| < \lambda] \geq \beta \quad \text{Eq. II-12}$$

Avec  $\beta$  la proportion de mesures dans les limites d'acceptation, et  $\lambda$  la grandeur définissant les limites d'acceptabilité fixées à priori en fonction des contraintes du secteur d'activité.

La planification des essais pour évaluer les critères de performance implique généralement des répétitions et plusieurs niveaux de concentration. De ce fait, la garantie des résultats doit se faire pour un intervalle de concentration. Pour satisfaire cette condition, il convient de construire un intervalle de tolérance de mesures attendues sur le domaine couvert par les concentrations. Cet intervalle de confiance de mesures attendues au niveau  $\beta$  s'exprime par (Eq. II-13) :

$$E_{\hat{\mu}, \hat{\sigma}}\{Pr[|x - \mu| < \lambda] / \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M\} \geq \beta \quad \text{Eq. II-13}$$

Avec E signifie « valeur attendue » ou estimée à l'instant des mesures en fonction des estimateurs du biais ( $\hat{\mu}_M$ ) et de la variance ( $\hat{\sigma}_M$ ) à disposition de l'analyste. La Figure II-11 illustre un profil d'exactitude.

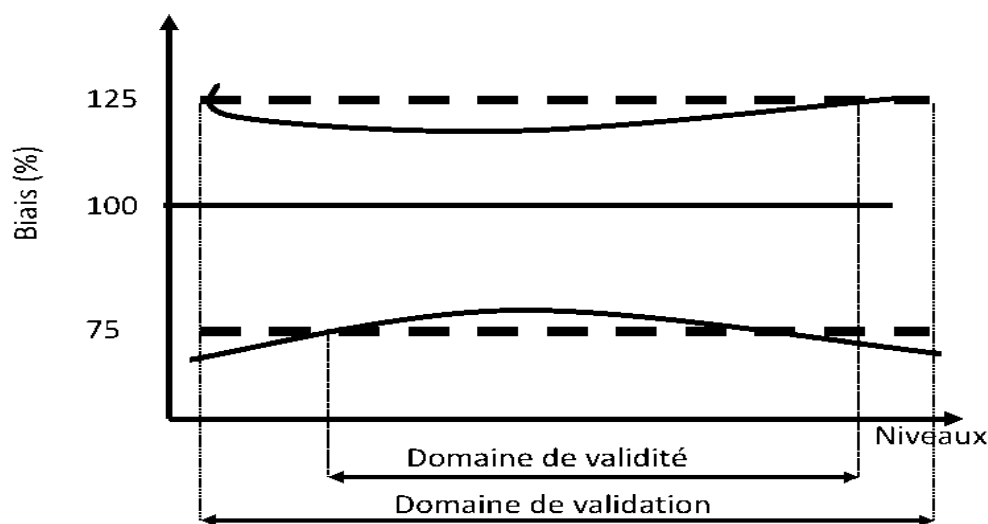


Figure II-11 : Illustration d'un profil d'exactitude

### VI.2.2.2. L'erreur totale

En pratique, la variabilité des mesures observées d'un laboratoire remet toujours en question l'adéquation d'un modèle de régression approprié, pour cela il est important de définir les principales composantes de l'erreur, à savoir :

- L'erreur systématique (ou justesse) représentant l'écart entre une valeur de référence (acceptée comme telle) et la valeur déduite expérimentalement,
- L'erreur aléatoire (ou fidélité) directement liée à la dispersion des résultats et pouvant

être estimée à 2 niveaux,

- L'erreur totale (ou exactitude) qui n'est autre que la somme des deux précédente et qui se rapporte à un résultat individuel.

Le concept de l'erreur totale est une voie de réflexion considérable qui s'impose actuellement pour la prise de décision sur la validité des méthodes analytiques, ainsi que l'interprétation des résultats de mesures. Également, c'est un consensus important qui facilite la mise en évidence d'une étape fondamentale du cycle de vie des méthodes analytiques qu'est la validation.

À partir de ce concept, un résultat de mesures ( $Y_i$ ) est régi par trois composantes à savoir : la vraie valeur de l'échantillon ( $\mu_T$ ), l'écart entre la moyenne des mesures ( $Y_m$ ) et la vraie valeur ( $Y_m - \mu_T$ ) et, finalement, de la dispersion de ces mesures autour de la moyenne ( $\sigma^2 = \sum \frac{[y_i - \mu_T]^2}{N-1}$ ). En d'autres termes, le résultat se compose de la vraie valeur ( $\mu_T$ ) additionnée de la somme des erreurs de mesures, à savoir : l'erreur systématique (la justesse) et de l'erreur aléatoire (la fidélité) telle que représentée à la Figure II-12. En routine, il est impossible de décomposer le résultat de la sorte étant donné que la vraie valeur de l'échantillon est et restera inconnue. Il est donc indispensable d'estimer ces sources d'erreurs lors de la phase de validation.

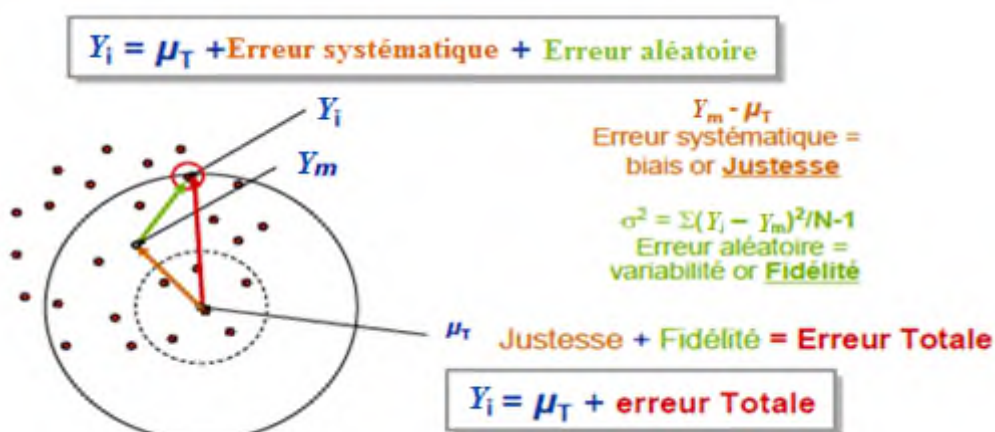


Figure II-12 : Représentation schématique des sources d'erreurs selon le concept d'erreur totale

Par ailleurs, la somme de l'erreur de la justesse et l'erreur de la fidélité désigne l'erreur totale, ces deux éléments de l'erreur analytique constituent l'exactitude d'une méthode. En d'autres termes, l'erreur totale d'une procédure analytique est un bon indicateur de l'exactitude.

L'exactitude d'un résultat exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie.

Dès lors, il est important de rappeler que la justesse et la fidélité sont deux critères associés à la performance de la méthode alors que l'exactitude est un critère associé au résultat individuel.

En routine, afin de se rapprocher à la vraie valeur d'un échantillon inconnu il est nécessaire d'avoir un grand nombre de mesures, cependant ceci aura un cout considérable. Dès lors, un outil se basant sur ce concept de l'erreur totale, lié aux futurs résultats, s'impose comme un outil décisionnel adéquat dans le cadre de la validation analytique.

### VI.3. Profil d'incertitude et intervalle de tolérance

Le profil d'incertitude est une approche décisionnelle pour rapporter la validité d'une méthode analytique [108, 109], il rassemble deux concepts importants à savoir la validation analytique et l'incertitude de mesure. C'est un outil graphique (Figure II-13) qui utilise la notion de l'incertitude basée sur l'erreur totale pour évaluer la performance des méthodes analytiques [110]. Également, il intègre l'utilisation des intervalles de tolérance de type ( $\beta\gamma$ -CCTI) pour prédire les performances quantitatives applicables en routine. Tout au plus, l'approche permet une bonne estimation de l'incertitude de mesure en utilisant les données de la validation.

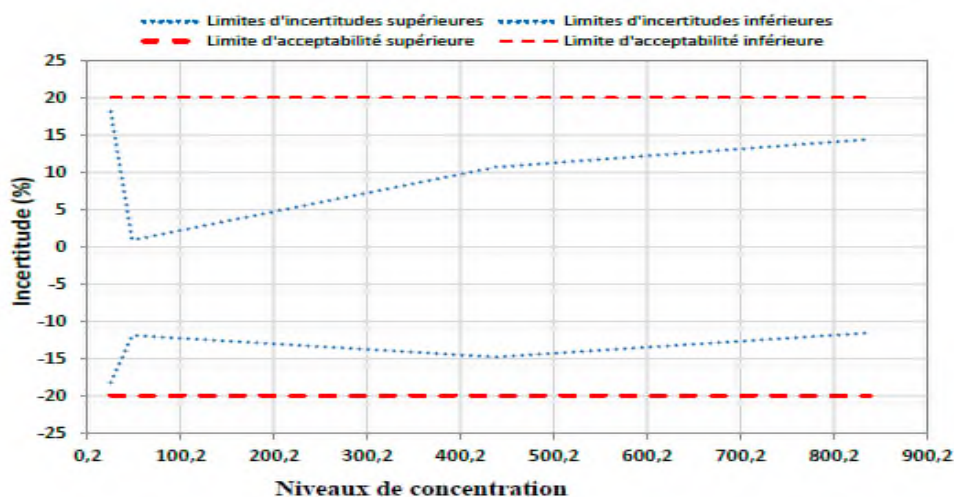


Figure II-13 : Présentation du profil d'incertitude

Le profil d'incertitude fournit une approche d'analyse intelligente en termes de rôles et de fonctions. En effet, l'analyste est à disposition d'un outil très performant lui permettant d'éviter l'utilisation excessive des tests statistiques, ainsi, d'évaluer les performances des méthodes analytiques.

Par ailleurs, un avantage majeur de notre travail réside dans l'intégration de l'intervalle de type ( $\beta\gamma$ -CCTI) pour la validité d'une méthode chromatographique. Dans ce paragraphe trois méthodes de calcul de l'intervalle de tolérance seront présentées à savoir :

- Approximation de Satterthwaite ;
- Simulation de Monte-Carlo ;
- Procédure MLS.

### VI.3.1. Planification des essais et organisation des données

Lors d'une validation analytique, il est nécessaire de prévoir des expériences selon un plan approprié afin d'estimer correctement les sources d'erreurs. Ces expériences doivent couvrir la gamme de concentration envisagée pour les analytes.

Les échantillons intervenant dans la validation sont de deux types :

#### VI.3.1.1. Les standards de validation

Les standards de validation sont des échantillons de concentrations connues, ils sont préparés dans la matrice ou ce qu'on appelle la forme pharmaceutique reconstituée. Ils sont préparés de sorte à mimer les futurs échantillons qui seront rencontrés en routine, également, ils doivent intégrer au maximum la variabilité inhérente à la mise en œuvre de la méthode. Par conséquent, ils doivent être préparés de manière indépendante.

Afin de mieux organiser le plan d'expérience de la validation, il est indispensable de prévoir un ensemble de paramètres qui facilitent la réalisation du plan à savoir :

- Le nombre de séries  $s$  et on note  $1 \leq i \leq s$ . Une série peut être représentée par un jour, mais aussi par une combinaison de diverses sources d'incertitude, comme plusieurs appareils, plusieurs opérateurs et plusieurs jours. Le nombre de séries  $s$  doit être au minimum égal à 3.
- Pour chaque série,  $r$  répétitions sont effectuées  $1 \leq j \leq r$ . le nombre de répétitions est égal ou supérieur à 2, et doit être constant pour chaque série.
- $C$  le nombre de niveaux de concentration couvrant le domaine d'application de la méthode  $1 \leq k \leq C$ . Avec  $C$  égal ou supérieur à 3, chose qui permettra alors de vérifier la linéarité entre les concentrations des valeurs de référence et les concentrations retrouvées : on a besoin de 3 niveaux pour conduire cette vérification. Mais, lorsqu'il est nécessaire de valider la méthode à proximité de sa LQ, il est conseillé de choisir  $K$  égal ou supérieur à 4 [111].

### VI.3.1.2. Les standards d'étalonnage

Les standards d'étalonnage sont préparés à partir des substances références de l'échantillon qu'on veut analyser. Un plan d'étalonnage est nécessaire a pour permettre l'estimation des coefficients du modèle de la courbe d'étalonnage. Le dispositif expérimental utilisé doit refléter le plus exactement possible ce qui sera fait en routine. Pour réaliser ce plan, il faut choisir les paramètres minimums suivants [111] :

- Prévoir s séries. Ce nombre doit absolument être le même que pour le plan de validation ;
- $r'$  désigne le nombre de répétition d'une mesure pour chaque série  $1 \leq j \leq r'$ ,  $r'$  peut être différent de  $r$  choisi pour le plan de validation. Le choix de  $r'$  dépend de l'analyste, cependant il est recommandé de prendre  $r' \geq 2$  ;
- $C'$  est le nombre de niveaux des concentrations connues couvrant la gamme d'étalonnage, il est choisi pour être effectué pour chaque série. Le nombre de niveaux  $C'$  peut être différent du nombre  $C$  choisi pour le plan de validation. Par exemple, on peut choisir  $C'=1$  si on est sûr que la courbe d'étalonnage est une droite qui passe par le 0.

### VI.3.2. Réalisation des essais et organisation des données

Lors de la validation analytique, les conditions de travail doivent être similaires à ceux utilisés en routine, de plus, le domaine d'application doit comporter tous les niveaux de concentration choisis. Généralement, les mesures étant réalisées en condition de fidélité intermédiaire où de reproductibilité, elles permettent de prendre en compte plusieurs sources d'incertitude possible. La réalisation des essais (standards de validation et les standards d'étalonnage), ainsi que l'organisation des données suivent un plan préalablement défini (Tableau II-4). Les données recueillies sont organisées dans un tableau afin de faciliter leur évaluation, le tableau peut être construit sous la forme suivante :

Tableau II-4 : Organisation des mesures de validation et de calibration

| Niveaux<br>$1 \leq k \leq C$<br>ou<br>$1 \leq k \leq C'$ | Séries<br>$1 \leq i \leq s$ | Répétitions<br>$1 \leq j \leq r$<br>ou<br>$1 \leq j \leq r'$ | Concentration des<br>échantillons de validation X<br>ou<br>échantillons d'étalonnage X' | Réponses instrumentales de<br>validation Y<br>Ou<br>d'étalonnage Y' |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| 1                                                        | 1                           | 1                                                            | $X_{111}/ X'_{111}$                                                                     | $Y_{111}/ Y'_{111}$                                                 |
|                                                          |                             | 2                                                            | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             | r ou r'                                                      | $X_{11r}/ X'_{11r'}$                                                                    | $Y_{11r}/ Y'_{11r'}$                                                |
|                                                          | 2                           | ...                                                          | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             | ...                                                          | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             | ...                                                          | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          | ...                         | ...                                                          | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             | ...                                                          | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             | ...                                                          | $X_{1sr}/ X'_{1sr'}$                                                                    | $Y_{1sr}/ Y'_{1sr'}$                                                |
|                                                          | s                           | ...                                                          | ...                                                                                     | ...                                                                 |
| 2                                                        |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
| ...                                                      | C ou C'                     |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | ...                                                                                     | ...                                                                 |
|                                                          |                             |                                                              | $X_{sCr}/ X'_{sCr'}$                                                                    | $Y_{sCr}/ Y'_{sCr'}$                                                |

### VI.3.3. Fonction de réponse

Le choix de la fonction de réponse est important dans la validation analytique, il est tributaire de plusieurs critères: le type de la méthode, la qualité de la prédiction inverse et la fiabilité des résultats obtenus de la validation.

Le point de départ d'un étalonnage repose sur le choix d'un modèle correct [112]. Le modèle d'étalonnage permet de relier la réponse instrumentale (Y) à la variable explicative (X). Le modèle établi lors de la validation est celui qui sera utilisé en routine. Il sera estimé par des paramètres statistiques. Ce modèle doit être cohérent, afin de mieux choisir la relation entre X et Y [100].

Pour établir une fonction d'étalonnage, les standards d'étalonnage sont utilisés. Généralement, les paramètres du modèle sont estimés par la méthode des moindres carrés, il est préférable de prendre un niveau de concentration de plus que de coefficients à estimer. Par exemple, si la relation d'étalonnage est un modèle linéaire, défini par deux coefficients, il est judicieux de prendre 3 niveaux. Pour une fonction d'étalonnage d'équation logistique à 4 coefficients, il faut au minimum avoir 5 niveaux.

La répartition des points dépend du type de modèle. Une répartition équidistante n'est pas forcément une répartition optimale. Dans le cas d'un domaine étendu, des points peu espacés, près des LOQ inférieures et supérieures, sont souhaitables. Une étude pilote sur la fonction d'étalonnage permettra d'optimiser le plan expérimental final. Dans le cas où une étude pilote ne pourra être réalisée, le nombre de niveaux sera augmenté.

Dans la majorité des cas, les méthodes s'appuient sur des phénomènes physico-chimiques qui peuvent se ramener à un modèle linéaire, au moins pour une certaine gamme de concentration. Mais, pour certains types de détermination, les mécanismes sont moins bien connus et on doit utiliser des modèles plus compliqués non linéarisables. Le modèle approprié est celui qui expliquera au mieux la variabilité maximale des mesures. Ainsi, il représentera de la meilleure façon les réponses obtenues en fonction des concentrations introduites. Les différentes combinaisons possibles de niveaux, de séries et de répétitions en fonction de quelques modèles classiques de fonction d'étalonnage sont indiquées dans le Tableau II-5.

Tableau II-5 : Modèles usuels de fonctions d'étalonnages pour la prédiction inverse des concentrations [100]

| Fonction de réponse       | Équation                          | Concentration prédite                                    | Nombre de coefficients | Nombre minimal de niveaux | Nombre de répétition par niveau | Nombre minimal de répétitions par série |
|---------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------|
| Linéaire                  | $y = a + bx$                      | $x = \frac{y-a}{b}$                                      | 2                      | 3                         | 2                               | 3                                       |
| Quadratique               | $y = a + bx + cx^2$               | $x = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4c(a-y)}}{2c}$               | 3                      | 4                         | 2                               | 3                                       |
| Logistique à 4 paramètres | $y = b + \frac{a-b}{1 + (x/c)^d}$ | $x = c \left[ \frac{a-b}{y-b} - 1 \right]^{\frac{1}{d}}$ | 4                      | 5                         | 2                               | 3                                       |
| Logarithme                | $\ln(y) = a + b \ln(x)$           | $x_{\text{cal}} = e^{\frac{\ln(y)-a}{b}}$                | 2                      | 3                         | 2                               | 3                                       |
| Racine carré              | $\sqrt{y} = a + b\sqrt{x}$        | $x_{\text{cal}} = \left( \frac{\sqrt{y}-a}{b} \right)^2$ | 2                      | 3                         | 2                               | 3                                       |

Généralement, sur le plan statistique, la qualité de la relation entre la variable X et la variable Y est décrite par le calcul du coefficient de détermination  $R^2$ . Ce paramètre n'est pas tellement apprécié pour évaluer la relation de proportionnalité entre les variables X et Y.

Une bonne approche pour sélectionner un modèle d'étalonnage est l'étude de la distribution des résidus standardisés entre les valeurs obtenues et les valeurs prédites par le modèle. Par définition, les résidus standardisés sont les résidus « normalisés » par leur écart-type. Si l'écart-type est déterminé de façon empirique, le résidu est appelé résidu « studentisé ». La Figure II-14 présente un exemple de distribution de résidus. La distribution de ces résidus studentisés doit être dans l'intervalle  $\pm 2$  et ne doit pas être structurée.

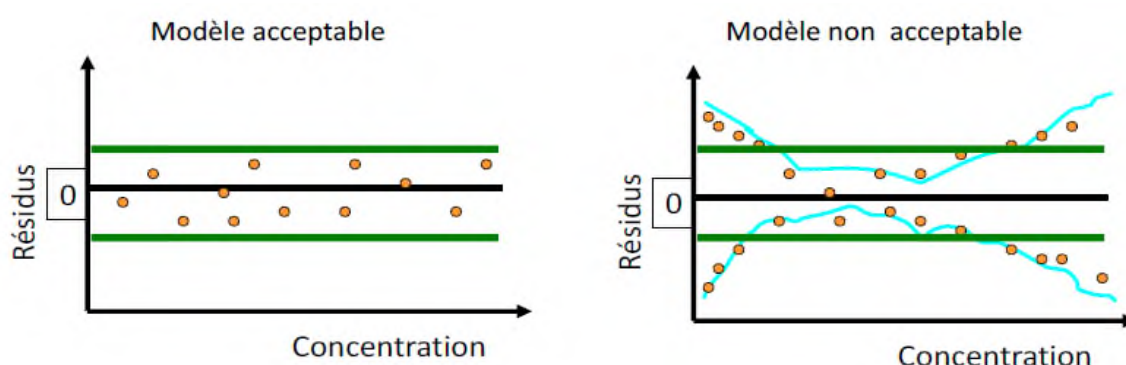


Figure II-14 : Exemple de distributions de résidus (valeurs trouvées - valeurs attendues) obtenues pour différents modèles d'étalonnage

Il peut être également vérifié que l'erreur générée par le modèle ne soit pas supérieure à l'erreur expérimentale, car cela démontrerait que l'erreur vient essentiellement du modèle et non de la méthode. Cette analyse peut se faire par une ANOVA.

Les tests statistiques utilisés pour vérifier l'existence d'une pente et d'une ordonnée à l'origine ne sont pas conseillés, car les tests utilisés sont perfectibles et conduisent parfois à rejeter à tort l'existence d'une pente.

### VI.3.3.1. Alignement des mesures

Compte tenu de l'indépendance des pesées pour un niveau de concentration donné, il est souvent difficile que les quantités introduites pour toutes les séries soient identiques. Pour cela, il est nécessaire de procéder à un alignement sur la concentration moyenne. Il convient de transformer les réponses instrumentales observées à des réponses calculées ( $y_{ikj} \rightarrow y_{ikj,c}$ ) afin de les aligner sur cette concentration moyenne. Cet alignement est effectué par interpolation, en ajoutant à la réponse observée, la différence entre la valeur de la fonction de

réponse considérée à la concentration moyenne  $f(\bar{x}_{ikj})$  et la valeur de la fonction de réponse considérée à la concentration introduite  $f(x_{ikj})$ . Ainsi, l'alignement des répétitions  $n_{ik}$  du niveau de concentration  $C$  de la série  $s$  est effectué comme suit :

$$y_{ikj,c} = y_{ikj} + f(\bar{x}_{ik}) - f(x_{ikj}) \quad \text{Eq. II-14}$$

Avec :

- $i, k$  et  $j$  sont respectivement des indices de séries, de niveaux, et de répétitions ;
- $y_{ikj,c}$  est la réponse calculée ;
- $y_{ikj}$  est la réponse obtenue ;

Dans la validation analytique, l'alignement s'applique aux réponses obtenues avec les échantillons de validation en utilisant la fonction de réponse choisie à partir des standards de calibration.

Le Tableau II-6 présente les règles d'alignement pour trois différentes fonctions réponses.

Tableau II-6 : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses

| Fonction de réponse       | Règle d'alignement                                                                                                                                                                                |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Linéaire                  | $y_{ikj,c} = y_{ikj} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ik} - x_{ikj}]$                                                                                                                                    |
| Quadratique               | $y_{ikj,c} = y_{ikj} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ik} - x_{ikj}] + \hat{\gamma}_i [\bar{x}_{ik}^2 - x_{ikj}^2]$                                                                                      |
| Logistique à 4 paramètres | $y_{ikj,c} = y_{ikj} + (\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i) \left( \frac{1}{1 + (\hat{\gamma}_i / \bar{x}_{ik})^{\hat{\beta}_i}} - \frac{1}{1 + (\hat{\gamma}_i / x_{ikj})^{\hat{\beta}_i}} \right)$ |

### VI.3.3.2. Calcul des concentrations prédites

Dans cette approche de validation, les calculs se font avec les concentrations prédites et non pas avec les réponses. En effet, une fois les données sont alignées, il convient maintenant de calculer les concentrations prédites à partir des réponses de validation obtenues.

La prédiction est facile, il suffit d'utiliser la fonction inverse de la fonction de réponse déjà choisie à partir des données de calibration, selon le modèle mathématique (Eq.II.15) suivant :

$$x_{cal} = f^{-1}(Y) \quad \text{Eq. II-15}$$

Avec :

- $x_{cal}$  est la concentration calculée ou concentration retrouvée ;
- $f^{-1}(Y)$  est l'équation de prédiction inverse.

### VI.3.4. Critère de validation et intervalle de tolérance

#### VI.3.4.1. Estimation de la justesse

La justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique. Elle est exprimée par la différence entre la moyenne d'une série des valeurs mesurées et la valeur moyenne des concentrations calculées. Il existe plusieurs modes d'expression de la justesse, elle est exprimée en termes de biais absolu, biais relatif ou sous forme de recouvrement par rapport aux mesures réalisées :

$$biais_k = \hat{\mu}_k - \bar{x}_{k.in} \quad \text{Eq. II-16}$$

$$biais_k(\%) = \frac{\hat{\mu}_k - \bar{x}_{k.in}}{\bar{x}_{k.in}} \times 100 \quad \text{Eq. II-17}$$

$$recouvrement_k(\%) = \frac{\hat{\mu}_k}{\bar{x}_{C.in}} \times 100 \quad \text{Eq. II-18}$$

Avec

$$\hat{\mu}_k = \frac{1}{\sum_{i=1}^s n_{ik}} \sum_{i=1}^s \sum_{r=1}^{n_{ik}} x_{ikj,c} \quad \text{Eq. II-19}$$

- $\hat{\mu}_k$  est la moyenne des concentrations calculées au niveau C.
- $\bar{x}_{k.in}$  est la moyenne des concentrations introduites du niveau C.
- $x_{ikj,c}$  est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration k de la série i.

Nous rappelons que :

- i est l'indice de série :  $1 \leq i \leq s$ .
- k est l'indice du niveau de concentration :  $1 \leq k \leq C$ .
- j est l'indice de répétition :  $1 \leq j \leq r$ .

### VI.3.4.2. Estimation de la fidélité

La fidélité traduit uniquement la distribution des erreurs aléatoires liées au hasard, elle exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Elle permet d'estimer l'amplitude avec laquelle une méthode disperse les répétitions. C'est un critère très important pour l'interprétation finale d'un résultat et une caractéristique clé pour une méthode [80]. La fidélité est calculée à partir de l'écart-type des résultats d'essais. Elle est évaluée à deux niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra laboratoire).

L'estimation de la variance intra-série  $\hat{\sigma}_{Re,k}^2$  est une estimation de la variance de la répétabilité, tandis que la somme des estimations des variances intra — et inter-séries donne une estimation de la variance de la fidélité intermédiaire  $\hat{\sigma}_{F,I}^2$  [113].

- La répétabilité :

$$\hat{\sigma}_{r,k}^2 = \hat{\sigma}_{e,k}^2 \quad \text{Eq. II-20}$$

- La fidélité intermédiaire :

$$\hat{\sigma}_{F,I}^2 = \hat{\sigma}_{e,k}^2 + \hat{\sigma}_{b,k}^2 \quad \text{Eq. II-21}$$

### VI.3.4.3. Démarche de calcul des intervalles de tolérance

Les intervalles de tolérances ont reçu une réflexion accrue ces dernières décennies, en fait, le pouvoir prédictif de ces intervalles permet de tisser une bonne relation entre les performances quantitative définie lors de l'étape de validation et celle obtenue en routine. À ce niveau, la contribution des intervalles de tolérance est d'une importance particulière puisqu'il va « routiniser » certaines pratiques pour renforcer la fiabilité des performances d'une méthode analytique, par conséquent, assurer son maintien au cours du temps.

Actuellement, les intervalles de tolérance ont gagné une place importante dans plusieurs secteurs tels que : le contrôle de qualité, l'environnement, la santé et autres...

Parmi les types d'intervalles de tolérance, on trouve :

- $\beta$ -expectation tolerance interval » ( $\beta$ -ETI) ;
- $\beta$ -content,  $\gamma$ -confidence tolerance interval ( $\beta\gamma$ -CCTI).

Le calcul des limites de l'intervalle de tolérance de type  $\beta$ -content et  $\gamma$ -confidence est basé sur plusieurs approches à savoir : l'approximation de Satterthwaite selon l'approche de Mee [114]; l'approche de Hofman-Kringle par simulation de Monte Carlo [115] et l'approche de liao-lin-layer selon la procédure Modified large sample (MLS) [116].

#### VI.3.4.4. Approximation de Satterthwaite

Durant l'étape de validation analytique, un plan expérimental consiste à faire des mesures répétitives dans des jours différents. Le modèle statistique pour décrire les valeurs mesurées est donné par :

$$Y_{i,k} = \mu + b_i + e_{ik} \quad \text{Eq. II-22}$$

Avec  $k = 1, 2, \dots, C$  ;  $i = 1, 2, \dots, s$

Où  $Y_{ik}$  désigne la mesure du  $k^{\text{ième}}$  répétition faite au  $i^{\text{ième}}$  jour,  $\mu$  la moyenne générale inconnue,  $b_i$  représente l'effet aléatoire inter-séries,  $e_{ik}$  représente les termes d'erreur intra-séries. On suppose que  $b_i$  et  $e_{ik}$  sont tous indépendants ayant des distributions  $b_i \sim N(0, \sigma_b^2)$  et  $e_{ik} \sim N(0, \sigma_e^2)$ .

Donc  $Y_{ik} \sim N(\mu, \sigma_b^2 + \sigma_e^2)$  et  $\sigma_b^2$  et  $\sigma_e^2$  représentent les deux composantes de la variance du model.

Nous définissons :

$$\bar{Y} = \frac{1}{sC} \sum_{i=1}^s \sum_{k=1}^C Y_{ik}, \bar{Y} = \frac{1}{C} \sum_{k=1}^C Y_{ik}, SS_b = C \sum_{i=1}^s (\bar{Y}_i - \bar{Y})^2 \text{ et } SS_e = \sum_{i=1}^s \sum_{k=1}^C (Y_{ik} - \bar{Y}_i)^2 \quad \text{Eq. II-23}$$

Également, les carrés moyens sont définis par les modèles suivants :

$$CM_b = \frac{SS_b}{s-1} \text{ et } CM_e = \frac{SS_e}{s(C-1)} \quad \text{Eq. II-24}$$

Les estimateurs ANOVA de  $\sigma_b^2$  et  $\sigma_e^2$  sont donnés par :

$$\hat{\sigma}_b^2 = \frac{1}{C} (CM_b - CM_e) \text{ et } \hat{\sigma}_e^2 = CM_e \quad \text{Eq. II-25}$$

Les intervalles de tolérance bilatéraux de type «  $\beta, \gamma$ -content » que nous allons construire sont en fonctions de  $\bar{Y}$ ,  $\hat{\sigma}_b^2$  et  $\hat{\sigma}_e^2$ . Ils ont la forme suivante :

$$\bar{Y} \pm k\hat{\sigma}_m \quad \text{Eq. II-26}$$

Où :

$$\hat{\sigma}_m^2 = \hat{\sigma}_b^2 + \hat{\sigma}_e^2 \quad \text{Eq. II-27}$$

Et,  $k$  est le facteur de tolérance à déterminer. Ainsi,  $k$  doit satisfaire la condition suivante :

$$P_{\bar{Y}, \hat{\sigma}_b^2, \hat{\sigma}_e^2} \{P_Y[\bar{Y} - k\hat{\sigma}_m < Y < \bar{Y} + k\hat{\sigma}_m | \bar{Y}, \hat{\sigma}_m] \geq \beta\} = \gamma \quad \text{Eq. II-28}$$

avec  $\beta$  et  $\gamma$  sont respectivement la proportion minimale et le niveau de confiance de la population contenue entre les limites bilatérales.

Puisque  $\bar{Y} \sim N\left(\mu, \frac{s\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{sC}\right)$  indépendamment de  $N(\mu, \sigma_b^2 + \sigma_e^2)$ , nous avons :

$$\frac{Y - \bar{Y}}{\sqrt{(\sigma_b^2 + \sigma_e^2) + \frac{s\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{sC}}} \sim N(0,1) \quad \text{Eq. II-29}$$

Si nous utilisons l'approximation de Satterthwaite pour obtenir une approximation du khi-carré de la distribution associé à  $\hat{\sigma}_m^2$ . Nous écrivons :

$$R = \frac{\hat{\sigma}_b^2}{\hat{\sigma}_e^2} \text{ et } R_0 = \frac{\hat{\sigma}_b^2 + \hat{\sigma}_e^2}{C\hat{\sigma}_b^2 + \hat{\sigma}_e^2} = \frac{R + 1}{CR + 1} \quad \text{Eq. II-30}$$

Il faut noter que :

$$\frac{ss_b}{C\hat{\sigma}_b^2 + \hat{\sigma}_e^2} \sim \chi_{s-1}^2 \text{ et } \frac{SS_e}{\hat{\sigma}_e^2} \sim \chi_{s(C-1)}^2 \quad \text{Eq. II-31}$$

Ensuite, on peut conclure que :

$$\frac{\hat{\sigma}_m^2}{\sigma_m^2} \sim \frac{\chi_f^2}{f} \quad \text{Eq. II-32}$$

La condition à satisfaire par  $k$  peut être exprimée par :

$$p\left(-k \leq \frac{Y - \bar{Y}}{\sqrt{(\sigma_b^2 + \sigma_e^2) + \frac{C\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{sC}}} \leq k\right) = \beta \quad \text{Eq. II-33}$$

Compte tenu de l'approximation de Satterthwaite, le facteur  $k$  peut être obtenu selon la distribution de Student. Cela donne :

$$k = t_{f; \frac{1+\beta}{2}} \sqrt{1 + \frac{1}{sCR_0}} \quad \text{Eq. II-34}$$

Avec

$$f = \frac{(R + 1)^2}{(R + n^{-1})^2 \left/ (s - 1) + (1 - C^{-1}) \right/ (sC)} \quad \text{Eq. II-35}$$

Cependant, l'intervalle de tolérance ne peut pas être calculé en utilisant le facteur  $k$  ci-dessus, car il dépend de  $R_0$ , qui est une fonction du ratio de variances inconnues  $\frac{\sigma_b^2}{\sigma_e^2}$ . Mee [38] recommande de remplacer  $R$  par l'estimation :

$$\hat{R} = \max \left[ 0, \frac{1}{C} \left( \frac{MS_b}{MS_e} - 1 \right) \right] \quad \text{Eq. II-36}$$

Ainsi l'estimation de  $f$  est donnée par :

$$\hat{f} = \frac{(R + 1)^2}{(R + n^{-1})^2 \left/ (s - 1) + (1 - C^{-1}) \right/ (sC)} \quad \text{Eq. II-37}$$

Par conséquent l'estimation de  $k$  est :

$$\hat{k} = t_{\hat{f}; \frac{1+\beta}{2}} \sqrt{1 + \frac{1}{sC\hat{R}_0}} \times \sqrt{\hat{\sigma}_m^2} \quad \text{Eq. II-38}$$

Finalement, le  $\beta$ -expectation tolérance intervalle est donné par :

$$\bar{Y} + t_{\hat{f}; \frac{1+\beta}{2}} \sqrt{1 + \frac{1}{sC\hat{R}_0}} \times \sqrt{\hat{\sigma}_m^2} \quad \text{Eq. II-39}$$

#### VI.3.4.5. Simulation de Monte Carlo

Afin d'estimer le  $\beta$ ,  $\gamma$ -content tolérance intervalle, Lin et al. ont adopté le même concept utilisé pour le calcul de  $\beta$ -expectation tolérance intervalle [116]. Leur procédure consiste sur la forme de l'intervalle de tolérance suivante :

$$\bar{Y} \pm D \quad \text{Eq. II-40}$$

Avec  $D$  est la marge d'erreur statistique à déterminer. La condition à remplir par  $D$  est la suivante :

$$P_{\bar{Y}, \hat{\sigma}_b^2, \hat{\sigma}_e^2} \{P_Y[\bar{Y} - D < Y < \bar{Y} + D | \bar{Y}, \hat{\sigma}_m] \geq \beta\} = \gamma \quad \text{Eq. II-41}$$

Nous définissons :

$$\sigma_1^2 = \sigma_b^2 + \sigma_e^2 \text{ et } \sigma_2^2 = \frac{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{an} \quad \text{Eq. II-42}$$

D'après l'équation (Eq. II-43) nous pouvons écrire :

$$\sigma_1^2 + \sigma_2^2 = \left(1 + \frac{1}{a}\right) \frac{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{an} + \left(1 - \frac{1}{n}\right) \sigma_e^2 \quad \text{Eq. II-43}$$

Pour calculer D, il faut déterminer la limite de confiance supérieure pour  $\sigma_1^2 + \sigma_2^2$  en utilisant le concept de l'intervalle de confiance pivotale généralisé et la simulation de Monte Carlo.

L'algorithme suivant peut être utilisé pour calculer la marge d'erreur statistique D et, par conséquent, pour estimer l'intervalle de tolérance de type  $(\beta, \gamma\text{-content})$  bilatéral :

### Algorithme

- 1 A partir des données de validation, calculer les valeurs observées  $\bar{Y}$ ,  $ssb$  et  $sse$  ;
- 2 Soit M désigne le nombre de simulations. Pour  $i = 1, 2, \dots, M$ , effectuez les étapes suivantes :
- 3 Générer les variables aléatoires indépendantes

$$U_{b,i}^2 \sim \chi_{a-1}^2 \text{ et } U_{e,i}^2 \sim \chi_{a(n-1)}^2 \quad \text{Eq. II-44}$$

- 4 Calculer

$$D_{1,i} = \frac{\left(\frac{1}{n}\right) \left(1 + \frac{1}{a}\right) SS_b}{U_{b,i}^2} + \frac{\left(1 - \frac{1}{n}\right) SS_e}{U_{e,i}^2} \quad \text{Eq. II-45}$$

Le  $\gamma$  quantile des  $D_{1,i}$  valeur donne une estimation de la limite supérieure  $\gamma$  de confiance pour  $\sigma_1^2 + \sigma_2^2$ .

La racine carrée de cette limite de confiance multiplié par  $Z_{(1+\beta)/2}$  fournit la marge d'erreur statistique D nécessaire pour le calcul du  $\beta, \gamma\text{-content}$  tolérance intervalle.

### VI.3.4.6. Procédure MLS

La méthode proposée par Hoffman-Kringle s'applique à la construction des intervalles de tolérances pour des modèles à effet aléatoire. Elle est appliquée lorsqu'on a un jeu de données équilibrées ou non [115].

Pour illustrer cette méthode dans un modèle aléatoire à sens unique équilibré, on définit :

$$\sigma_1^2 = \sigma_b^2 + \sigma_e^2 \text{ and } \sigma_2^2 = \frac{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{an} \quad \text{Eq. II-46}$$

Ensuite depuis l'équation Eq. II-46, on peut écrire :

$$\sigma_1^2 + \sigma_2^2 = \left(1 + \frac{1}{a}\right) \frac{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{n} + \left(1 - \frac{1}{n}\right) \sigma_e^2 \quad \text{Eq. II-47}$$

La borne supérieure de confiance de la MLS procédure est donnée par la relation suivante :

$$S = \left[ \left(1 + \frac{1}{a}\right) \frac{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{n} + \left(1 - \frac{1}{n}\right) \sigma_e^2 \right] + \left[ \left(1 + \frac{1}{a}\right)^2 \frac{(n\sigma_b^2 + \sigma_e^2)^2}{n^2} \left( \frac{a-1}{\chi_{a-1;1-\gamma^2}} - 1 \right) + \left(1 - \frac{1}{n}\right)^2 \sigma_e^4 \left( \frac{a(n-1)}{\chi_{a(n-1);1-\gamma^2}} - 1 \right)^2 \right]^{0.5} \quad \text{Eq. II-48}$$

L'intervalle de tolérance avec un niveau de confiance  $\gamma$  est calculé par la relation suivante :

$$\bar{Y} \pm Z_{(1+\beta)/2} \sqrt{S} \quad \text{Eq. II-49}$$

### VI.3.5. Estimation d'incertitude par le profil d'incertitude

L'incertitude de mesure est définie comme étant « un paramètre associé au résultat d'une mesure, qui caractérise la dispersion des valeurs et pourrait être raisonnablement attribué au mesurande » [117, 118]. En fait, le processus d'estimation de ce paramètre comporte un ensemble d'étapes complexes, il prend toujours en considération les petits détails que parfois même les laboratoires n'arrivent pas à maîtriser. Par conséquent, plusieurs approches flexibles sont apparues dans un seul but d'aider les laboratoires à valoriser ce paramètre par l'alliance de stratégies de la validation analytique avec l'estimation d'incertitude de mesure qui est un acquis normatif ISO 17025.

L'approche du profil d'incertitude pour la validation des méthodes analytiques a été récemment introduite par notre laboratoire. Elle offre un cadre théorique intégrateur dans la mesure où elle prend en considération les données issues de la validation analytique. Elle présente, de ce fait, une perspective dynamique pour l'évaluation de l'incertitude de mesures.

Dans ce paragraphe, nous allons présenter la démarche d'estimation d'incertitude à partir du profil d'incertitude. En effet, en considérant le protocole LGC/VAM [119] et les recommandations du guide ISO/DTS 21748 [120], le modèle de base qui formule l'incertitude d'un mesurande  $Z$  est :

$$u^2(Y) = S_R^2 + u^2(\hat{\delta}) + \sum C_i^2 u^2(x_i) \quad \text{Eq. II-50}$$

Avec

- $S_R$  : l'écart-type de reproductibilité ;
- $u(\hat{\delta})$  : l'incertitude type liée au biais de la méthode ;
- $\sum C_i^2 u^2(x_i)$  : la somme des effets due à la déviation.

Selon l'approche du profil d'exactitude proposé par Feinberg et al [80]. Le modèle d'incertitude ne tient pas compte du troisième terme dans l'équation (Eq. II-50), puisque son effet est considéré comme faible devant les composantes principales d'incertitude. Par conséquent, l'équation d'incertitude devient comme suite :

$$u^2(Y) = S_R^2 + S_{\bar{y}}^2 \quad \text{Eq. II-51}$$

On considérant la méthode de Mee, la construction du profil d'exactitude en utilisant le  $\beta$ -expectation tolérance intervalle est exprimée par la présente équation:

$$\bar{Y} \pm t(\vartheta)k\hat{\sigma}_m \quad \text{Eq. II-52}$$

Or on sait que  $\hat{\sigma}_M$  est égale à  $S_R$ , donc on peut facilement montrer que :

$$u^2(Y) = K^2 \hat{\sigma}_m^2 \quad \text{Eq. II-53}$$

C'est ainsi que le modèle mathématique qui rassemble l'incertitude de mesure et l'intervalle de tolérance est exprimé par la relation suivante :

$$\bar{Y} \pm t(\vartheta)u(Y) \quad \text{Eq. II-54}$$

Si on développe l'équation (Eq. II-54), les limites d'incertitude seront comme suite :

$$U = \bar{Y} + t(\vartheta)u(Y) \quad \text{Eq. II-55}$$

Et

$$L = \bar{Y} - t(\vartheta)u(Y) \quad \text{Eq. II-56}$$

Avec

- $U$  : la limite de tolérance supérieure;
- $L$  : la limite de tolérance inférieure.

Finalement, l'expression de l'incertitude de mesure devient sous la forme suivante :

$$u(Y) = \frac{U - L}{2t(\vartheta)} \quad \text{Eq. II-57}$$

Avec

- $t(v)$  est  $(1+\gamma)/2$  quantile de la distribution  $t$  de student avec  $v$  degré de liberté.

Par ailleurs, Saffaj et al, ont proposé une équation pour construire le profil d'incertitude, qui sera utilisée comme outils de décision pour la validation analytique.

$$|\bar{Y} \pm ku(Y)| \leq \lambda \quad \text{Eq. II-58}$$

Avec

- $k$  : le facteur de couverture qui est égale à 2 lorsque le niveau de confiance est à (approximativement égal à) l'entourage de 95 % ;
- $\bar{Y}$  : la moyenne des résultats estimés ;
- $\lambda$  : la limite d'acceptation.

Également le profil d'incertitude peut être exprimé par l'équation suivante :

$$|Biais \pm ku(Y)| \leq \lambda \quad \text{Eq. II-59}$$

### VI.3.6. Construction du profil d'incertitude

La mise en œuvre du profil d'incertitude est réalisée selon les étapes suivantes :

- Choisir des limites d'acceptabilité appropriées en tenant compte de l'utilisation prévue de la méthode ;
- Générer tous les modèles d'étalonnage possible, en utilisant les données de calibration ;
- Calculer les concentrations prédites de tous les standards de validation en fonction du modèle de calibration sélectionné ;
- Calculer les  $\beta, \gamma$ -content tolérance intervalles bilatéraux pour chaque niveau, selon l'une des trois méthodes statistiques proposées ;
- Déterminer l'incertitude pour chaque niveau en utilisant l'équation (Eq. II-57) ;
- Construire le profil de l'incertitude conformément à l'équation (Eq. II-59) et établir le graphique 2D comme fonction de la concentration, les limites d'acceptabilité et de l'incertitude ;
- Comparer l'intervalle d'incertitude avec les limites d'acceptabilité  $(-\lambda, \lambda)$  ;
- Si l'intervalle d'incertitude tombe totalement dans  $(-\lambda, \lambda)$ , la méthode est acceptée, sinon, la méthode n'est pas valide.

### VI.3.7. Interprétation du profil d'incertitude

Les limites d'acceptabilité  $\pm\lambda$ . Elles servent à traduire les objectifs pratiques des utilisateurs. Elles délimitent un intervalle autour de la valeur de référence. Le plus souvent,

ces limites sont réglementaires ou issues de la réglementation. Mais dans le cas où il n'existe pas de référence établie, il convient de prendre en compte les attentes des utilisateurs finaux ou déterminées par consensus des spécialistes ;

La proportion  $\beta$ . Elle représente la proportion de futurs résultats qui seront en moyenne compris dans les intervalles de tolérance. La valeur choisie pour  $\beta$  dépend largement du champ d'application (contrôle sanitaire, contrôle de fabrication, etc.). Il est évident que plus  $\beta$  est petit, par exemple 70 %, plus la méthode risque de produire des résultats qui ne correspondent point aux spécifications annoncées.

Le terme de confiance  $\gamma$ . Il représente la probabilité d'avoir une proportion  $\beta$  des futurs résultats inclus dans les limites d'acceptation. Une valeur de  $\gamma$  égale à 95 % signifie qu'on a une probabilité de 95 % d'avoir la proportion  $\beta$  dans les limites  $\pm\lambda$ .

Dans un souci de suivre l'évolution de l'approche du profil d'incertitude ainsi que son application dans le domaine pharmaceutique deux applications seront consacrées dans ce manuscrit:

- Une application sur des données de littérature ;
- Et une application sur des données expérimentales.

### VI.4. Profil de risque

L'évaluation du risque est un outil récemment recommandé pour acquérir diverses informations permettant de comprendre et d'améliorer les procédures analytiques. Il permet une première confirmation des décisions prises à l'étape de la validation par profil d'incertitude, également, il fournit une probabilité de fiabilité nécessaire pour la mise en routine d'une méthode analytique [121].

Cette approche consiste à estimer la probabilité ( $\pi_{pr}$ ) d'obtenir un futur résultat en dehors des limites d'acceptation. Tout d'abord, Dewé et al. [122] a adapté l'utilisation de cette approche dans le transfert des méthodes analytiques. Elle consiste à calculer la probabilité d'obtenir des résultats compris dans les limites d'acceptation spécifiées  $[-\lambda, +\lambda]$  sur la base de la formule des intervalles de tolérance statistiques. En utilisant l'intervalle de tolérance de type ( $\beta$ -expectation), la probabilité de fiabilité est calculée pour chaque niveau de concentration comme suit :

$$\pi_i^{Bet} = P[Y_i > \mu_{T,i} - \lambda] + P[Y_i < \mu_{T,i} + \lambda] \quad \text{Eq.II-60}$$

$$= P \left[ t(f) > \frac{(\mu_{T,i} - \lambda) - \bar{Y}_i}{\hat{\sigma}_{F,i} \sqrt{1 + ((i\hat{R}_{i+1})/N(\hat{R}_i + 1))}} \right] \\ + P \left[ t(f) < \frac{(\mu_{T,i} + \lambda) - \bar{Y}_i}{\hat{\sigma}_{F,i} \sqrt{1 + ((i\hat{R}_{i+1})/N(\hat{R}_i + 1))}} \right]$$

Où  $s$  est le nombre d'essais et  $i$  le nombre de répétition par série,  $N = si$ .  $\bar{Y}_i$  est la concentration moyenne des résultats obtenus par la méthode pour le  $i^{\text{ème}}$  niveau de concentration et  $\hat{\sigma}_{F,i}$  est l'écart type de la fidélité intermédiaire pour chaque  $i^{\text{ème}}$  niveau de concentration.  $t(f)$  est une distribution selon la loi de Student avec  $f$  degrés de liberté calculés sur la base de l'approximation de Satterthwaite [123] et  $\hat{R}_i$  est le rapport entre la variance inter-série (fidélité intermédiaire) et la variance intra-série (ou de répétabilité) de chaque niveau de concentration .

Ensuite, Govaerts et al. [49], a utilisé l'évaluation du risque pour prendre une décision sur la validité d'une méthode analytique à deux niveaux : la validation préalable qui vise à démontrer que la méthode sera en mesure d'atteindre ses objectifs avant l'utilisation, et la validation en routine qui vise à vérifier si une méthode analytique reste valable dans le temps.

Selon l'approche une méthode analytique est considérée comme valide s'il est possible de prouver qu'une proportion suffisante des résultats analytiques devrait être comprise dans les limites d'acceptation données  $[-\lambda, \lambda]$  autour de la valeur nominale.

L'estimation de la probabilité de fiabilité maximale par vraisemblance selon la deuxième stratégie est donnée par l'équation suivante :

$$\pi_i^{ML} = P \left[ Z > \frac{(\mu_{T,i} - \lambda) - \bar{Y}_i}{\hat{\sigma}_{F,i}} \right] + P \left[ Z < \frac{(\mu_{T,i} + \lambda) - \bar{Y}_i}{\hat{\sigma}_{F,i}} \right] \quad \text{Eq.II-61}$$

Avec  $Z$  est une variable de la loi normale standard.

Récemment introduite par notre laboratoire, le profil de risque (Figure II-15) est un outil graphique simple et efficace, capable de juger la validité des méthodes analytiques en exploitant leurs critères de performances à savoir : le biais et l'incertitude [124]. Nous avons démontré la relation entre l'intervalle de tolérance et l'incertitude de mesure, ainsi nous avons proposé une formule innovante pour calculer le risque sur la base de l'incertitude de mesure:

$$\pi_i^{Risk} = P \left[ t(v) > \frac{\lambda(\%) - \text{biais}(\%)}{u(\%)} \right] + P \left[ t(v) < \frac{-\lambda(\%) - \text{biais}(\%)}{u(\%)} \right] \quad \text{Eq.II-62}$$

Avec

- $\lambda$  : la limite d'acceptation;

- $\text{bias } (\%)$  : le biais relative de la méthode;
- $u (\%)$  : incertitude relative de la méthode;
- $t(v)$  est le quantile  $\beta$  de la distribution de student avec  $v$  degrés de liberté calculée à l'aide de l'approximation de Satterthwaite [108].

La formule pour le calcul de la probabilité de fiabilité a été sollicitée pour évaluer le risque que les futures mesures d'une méthode d'analyse franchissent les limites d'acceptabilité, en tenant compte de chaque niveau de concentration utilisé pour la validation.

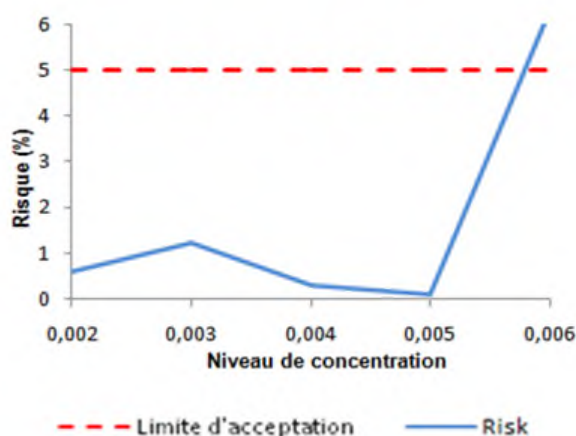


Figure II-15 : Présentation du profil de risque

## VII. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons montré l'importance d'utiliser des approches chimiométriques pour la lutte contre la contrefaçon. En effet, nous avons présenté les différentes étapes pour le développement et la validation d'une méthode analytique destinée principalement à la caractérisation des médicaments contrefaits. Ensuite, nous avons détaillé l'utilisation de la stratégie du DS relative à l'optimisation multicritère et l'espace de robustesse. En parallèle, afin de répondre clairement au problème de la validation analytique, une démarche statistique a été bien détaillée pour la mise en évidence du profil d'incertitude et du profil de risque. Enfin, pour la mise en œuvre des approches chimiométrique énoncées dans ce chapitre, nous avons proposé plusieurs applications pour la caractérisation des médicaments contrefaits dans les chapitres suivants.

**Chapitre III. Développement et validation d'une nouvelle méthode UPLC pour lutter contre la contrefaçon des médicaments de trouble d'érection**

#### I. Introduction

Aujourd'hui, les laboratoires pharmaceutiques en collaboration avec les autorités de santé doivent impérativement mettre en place des mesures préventives et des solutions techniques, non seulement pour protéger l'authenticité des produits pharmaceutiques, mais également pour veiller sur la vie des patients. Pour percevoir ces objectifs, de nouvelles méthodes analytiques ont été mises en place.

Devant cet état de fait, plusieurs techniques analytiques ont été utilisées pour caractériser une contrefaçon à savoir : (LC-UV, LC-MS, IR, RMN, X-ray diffraction, etc.) [70, 125-135]. Certaines techniques ont pour but d'identifier l'empreinte chimique du produit, tandis que d'autres s'appliquent pour déterminer la composition en matière de principe actif, composés toxiques et impuretés. En particulier, la chromatographie en phase liquide couplée à divers détecteurs est la technique fréquemment utilisée pour l'analyse de ces substances illicites [55, 129, 136-145].

À ce jour, différentes méthodes chromatographiques pour la caractérisation simultanée des substances inhibitrices de la PDE-5 ont été développées [55, 138, 144-148]. Également, presque tous les auteurs avaient recours à la technique d'optimisation univariée (variation of one variable-at-a-time) (OVAT), afin d'optimiser les paramètres expérimentaux de leurs méthodes analytiques. Cependant, la technique OVAT n'aboutit pas souvent à fournir des résultats satisfaisants, et elle est parfois incapable de répondre aux exigences recommandées par la directive ICH Q8 à savoir : la définition d'un espace de conception auquel la méthode conserve les performances nonobstant des fluctuations de certains paramètres.

D'autre part, un survol de la littérature a montré que les méthodes chromatographiques proposées sont focalisées uniquement sur l'identification de trois substances inhibitrices de la PDE-5 autorisée ainsi que leurs analogues. À contrario, aucune méthode HPLC ou UPLC n'a été signalée pour la détermination simultanée du sildénafil, tadalafil, vardénafil et udénafil, en préparations pharmaceutiques ou en médicaments contrefaits.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail sera dédié au développement d'une nouvelle stratégie analytique pour lutter contre la contrefaçon des médicaments de trouble d'érection. Notre objectif est de combiner un ensemble d'outils chimiométriques pour mettre au point une méthode chromatographique qui va servir de dispositif analytique pour lutter contre les médicaments contrefaits. En agissant de la sorte, on désire proposer une procédure

performante capable de détecter les comprimés originaux des comprimés illégaux des différentes molécules PDE-5i, en particulier : sildénafil, tadalafil, vardénafil et udénafil.

Dans un premier temps, plusieurs facteurs ont été sélectionnés tels que le pH, le débit de la phase mobile et le pourcentage du modificateur organique, afin de maximiser les chances d'identifier une séparation optimale. Ensuite, afin de fixer les valeurs optimales de chaque facteur influant, une optimisation par un plan de surface de type *Box-Behnken* a été exécutée à cet égard.

Par ailleurs, dans le but de combiner l'objectif de la méthode développée avec les principes directeurs de l'ICH Q8 [149], un espace de conception a été établi pour définir la zone de robustesse de la méthode optimisée. Cet espace de conception va permettre de mieux assimiler les paramètres critiques de la méthode UPLC et d'avoir le maximum de connaissance et d'information sur son mode opératoire. Par voie de conséquence, les données scientifiques qui découlent de cet espace peuvent servir de fondements à la gestion des risques relatifs à la qualité lors de l'utilisation future de la méthode en phase routine.

Cependant, l'espace de conception est incapable à lui seul de prédire les performances analytiques de la méthode une fois appliquée en phase routine. Il doit impérativement être soutenu par la validation analytique. À ce stade, la méthode chromatographique sera soumise à une évaluation de sa performance analytique à travers deux approches de validation à caractère holistique, récemment, proposée par notre laboratoire, nommée profil d'incertitude et profil de risque [108, 110, 121, 150]. Ces deux profils dérivés à partir de l'intervalle de tolérance et le concept d'incertitude seront exploités pour apprécier l'efficacité des mesures générées par la procédure UPLC. En dernier lieu, nous allons confronter la théorie à la pratique à travers l'analyse de 23 échantillons contrefaits contenant les 4 substances inhibitrices de PDE-5, pour refléter de manière vivante les points forts et les points faibles de notre procédure chromatographique.

## **II. Sélection de la méthode de dosage des PDE-5i**

### **II.1. Appareil**

Les analyses d'optimisation et de validation ont été réalisées avec un chromatographe de type Acquity UPLC® H CLASS system Waters. Le système se compose principalement d'un manager de solvant quaternaire, ainsi qu'un manager d'échantillon de type FTN et un détecteur de type PDA. Le traitement des données a été réalisé avec logiciel Empower3.

L'eau distillée a été produite en utilisant le CLASSIC UV ELGA LABWATER. Le pH de la solution tampon, a été contrôlé par Schott ProLab 3000 (Germany).

#### II.2. Standard

Les standards de référence udénafil, tadalafil, sildénafil citrate et vardénafil ont été fournis par le laboratoire national de contrôle de médicament (LNCM).

#### II.3. Solvant et réactif

L'Acétonitrile (HPLC — Grade), l'acide formique (98 %) et l'ammonium formate ont été fournis par LNCM.

La matrice utilisée dans la phase de validation comporte des excipients fonctionnels, elle permet de garantir les propriétés requises de la forme pharmaceutique. Elle comporte les composés suivant : Corn starch, sodium lauryl sulphate, colloidal silicone dioxide, lactose, Hydroxypropyl cellulose, talc, magnésium stearate, cellulose microcristalline, croscarmellose sodique et Instacoat.

#### II.4. Conditions chromatographiques

Les séparations ont été effectuées sur une colonne ACQUITY UPLC ® BEH C18-1.7µm 2.1×50 nm à une température qui varie entre 40 et 50°C en mode isocratique. Les expériences ont été effectuées avec un débit inférieur à 1mL/min et le volume d'injection était de 1µL. La phase mobile se compose d'un mélange d'une solution tampon : acide formiate d'ammonium de concentration 10 mM avec un pH (3.3) et d'Acétonitrile avec une proportion de (69 :31 v/v).

#### II.5. Préparation des échantillons pour la détection des médicaments contrefaits

À partir de 10 comprimés de chaque spécialité pharmaceutique pesés et broyés, une quantité égale à 800 mg de sildénafil, 520 mg d'udénafil, 150 mg de tadalafil et 150 mg de vardénafil ont été pesées, puis dissoutes dans un mélange ACN/EAU (70/30) dans une fiole de 50 ml. Ensuite, 1 ml de cette solution est transféré dans une fiole de 25 ml contenant 10 mL du même mélange dissout pendant 5 min au bain ultrason puis complétés jusqu'au trait de jauge avec l'éluant. Les solutions ont été directement filtrées à travers des filtres de 0.45 µm de diamètre des pores.

#### II.6. Préparation des standards

Un mélange de 4 inhibiteurs de la PDE-5 a été utilisé et préparé comme suit : dans une fiole de 25 mL, 5 mg ont été pesées de sildénafil, vardénafil, tadalafil et udénafil puis ont été

dissouts dans l'éluant. Ensuite, 1 ml de la solution mère est dilué dans une fiole de 50 ml avec un mélange ACN/EAU (70/30).

La concentration finale est de 0.004 mg/ml de chaque substance étudiée.

Pour les standards d'étalonnage (SE), des dilutions successives ont été réalisées en vue d'obtenir cinq niveaux de concentration. Trois répétitions pour chaque niveau de concentration ont été effectuées sur trois différents jours.

Pour les standards de validation (SV), une solution mère contenant tous les principes actifs a été préparée de la même manière que les SE, les excipients de chaque formulation pharmaceutique ont été ajoutés à la solution mère. La gamme d'étalonnage couvre un intervalle de 50 % à 150 % de la valeur nominale afin de respecter le guideline ICH.

Les SV ont été préparés dans la matrice, de manière à simuler le plus possible la formulation de médicament. Pour chaque niveau de concentration, trois répétitions ( $r = 3$ ) indépendantes ont été effectuées pendant trois différents jours ( $s = 3$ ).

## **II.7. Calcul**

L'étude des plans d'expérience ainsi que la construction de l'espace de conception ont été effectuées en utilisant le logiciel JMP 7. Le profil d'incertitude y compris les résultats de validation et l'estimation de l'incertitude ont été obtenus avec le logiciel MatlabR2006a.

## **III. Développement analytique**

### **III.1. Objectif**

Le développement analytique est une étape d'une grande importance dans le cycle de vie d'une méthode analytique. En effet grâce à l'utilisation des plans d'expérience, la mise au point d'une méthode devient facile à exécuter. La réalisation des expériences permet de retrouver les valeurs optimales des variables susceptibles d'influencer la réponse à optimiser.

Dans ce sens, nous avons choisi de passer directement à l'optimisation en nous servant des plans de surface de réponse. Pour aboutir à cet objectif, nous nous sommes servis du Box-Behnken comme plans d'optimisation, ainsi, nous avons opté pour un modèle d'ordre 2 pour obtenir une représentation optimale de la réponse dans le domaine expérimental d'intérêt.

L'expérimentation a consisté à mettre en évidence les effets de trois facteurs à savoir : le pH, le pourcentage du modificateur organique, et le débit sur la réponse étudiée.

### III.2. Ajustement d'un modèle d'ordre 2

Nous avons utilisé le plan de Box et Behnken dans le but de chercher les valeurs optimales des facteurs les plus influents. Ainsi, pour définir un modèle bien adapté (Eq.III-1), capable de mieux expliquer la relation qui existe entre les réponses et les facteurs et leurs interactions.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + e \quad \text{Eq.III-1}$$

Où

Y étant la réponse,  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  correspond étroitement aux facteurs pH, proportion en Acétonitrile et le débit,  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$  sont les effets linéaires de ces facteurs,  $b_{11}$ ,  $b_{22}$ ,  $b_{33}$  leurs effets quadratiques,  $b_{12}$ ,  $b_{23}$ ,  $b_{13}$  correspond aux effets des interactions entre deux facteurs et e l'erreur résiduelle.

Le choix des niveaux hauts et bas des trois facteurs retenus sont :

- Le pH de la phase mobile ;
- Le pourcentage du modificateur organique ;
- Le débit de la phase mobile (en ml par minute).

Les facteurs, niveaux de variation et unités sont regroupées dans le (Tableau III-1) :

Tableau III-1 : Facteurs indépendants et niveaux de variation retenus pour l'étude d'optimisation par le plan de Box-Behnken pour le dosage de quatre substances PDE-5i

| Facteurs Indépendant | Facteurs codés | Niveaux de variation | Unités   | Niveaux codé |
|----------------------|----------------|----------------------|----------|--------------|
| <b>pH</b>            | $X_1$          | 3.3                  | -        | -1           |
|                      |                | 3.5                  |          | 0            |
|                      |                | 3.7                  |          | 1            |
| <b>ACN</b>           | $X_2$          | 31                   | %        | -1           |
|                      |                | 34                   |          | 0            |
|                      |                | 37                   |          | 1            |
| <b>Débit</b>         | $X_3$          | 0.55                 | (ml/min) | -1           |
|                      |                | 0.6                  |          | 0            |
|                      |                | 0.65                 |          | 1            |

Les réponses choisies sont : le temps de rétention et les résolutions entre vardénafil-sildénafil, sildénafil-udénafil et udénafil-tadalafil.

Le plan d'expérience (DoE) consiste donc à réaliser 15 essais, comportant trois points au centre du domaine d'étude, afin d'estimer l'erreur expérimentale (Tableau III-2).

Tableau III-2 : Plan expérimental de *Box-Behnken* pour le dosage des substances PDE-5i

| Essai n° | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | Tr   | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> |
|----------|----------------|----------------|----------------|------|----------------|----------------|----------------|
| 1        | 3,3            | 31             | 0,6            | 1,57 | 4,02           | 8,86           | 4,59           |
| 2        | 3,5            | 37             | 0,65           | 0,75 | 2,44           | 4,43           | 5,13           |
| 3        | 3,5            | 34             | 0,6            | 1,09 | 3,10           | 6,27           | 5,20           |
| 4        | 3,3            | 37             | 0,6            | 0,81 | 2,49           | 4,78           | 5,30           |
| 5        | 3,3            | 34             | 0,55           | 1,18 | 3,15           | 6,54           | 5,35           |
| 6        | 3,5            | 34             | 0,6            | 1,09 | 3,06           | 6,19           | 5,25           |
| 7        | 3,5            | 31             | 0,55           | 1,71 | 3,92           | 8,54           | 4,72           |
| 8        | 3,3            | 34             | 0,65           | 1,18 | 3,15           | 6,55           | 5,39           |
| 9        | 3,7            | 34             | 0,65           | 1,02 | 2,91           | 6,24           | 5,24           |
| 10       | 3,7            | 37             | 0,6            | 0,81 | 2,35           | 4,62           | 5,46           |
| 11       | 3,7            | 34             | 0,55           | 1,21 | 2,96           | 6,38           | 5,35           |
| 12       | 3,5            | 31             | 0,65           | 1,46 | 3,85           | 8,48           | 4,42           |
| 13       | 3,5            | 34             | 0,6            | 1,09 | 3,07           | 6,47           | 5,35           |
| 14       | 3,5            | 37             | 0,55           | 0,88 | 2,48           | 4,48           | 5,43           |
| 15       | 3,7            | 31             | 0,6            | 1,56 | 3,73           | 8,41           | 4,83           |

### III.2.1. Validation statistique du modèle

Les résultats d'analyses de la variance effectuées à partir des modèles quadratiques calculés pour quatre réponses sont présentés dans les (Tableau III-3 à Tableau III-6).

D'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure que l'effet principal du modèle est significatif puisque la probabilité de la signification du risque p-value est inférieure à 0,05, cette valeur de p-value représente le risque de se tromper en acceptant l'hypothèse H1 qui dit que la variabilité due au modèle est supérieure à celle due aux résidus.

Tableau III-3 : Analyse de variance restituée par le modèle quadratique pour le temps de rétention

| Source de variation | Degré de liberté | Somme des carrés | Carré moyen | Fisher   | p-value |
|---------------------|------------------|------------------|-------------|----------|---------|
| Modèle              | 3                | 1.231437         | 0.41047     | 166.1516 | <0.0001 |
| Résidus             | 11               | 0.027175         | 0.00247     |          |         |
| Défaut d'ajustement | 5                | 0.013299         | 0.00266     | 1.1501   | 0.4275  |
| L'erreur pure       | 6                | 0.013879         | 0.002313    |          |         |
| Total               | 14               | 1.2586           |             |          |         |

Tableau III-4 : Analyse de variance restituée par le modèle quadratique pour la résolution 1

| Source de variation | Degré de liberté | Somme des carrés | Carré moyen | Fisher   | p-value |
|---------------------|------------------|------------------|-------------|----------|---------|
| Modèle              | 9                | 4.291393         | 0.47682     | 1069.866 | <0.0001 |
| Résidus             | 5                | 0.002228         | 0.00044     |          |         |
| Défaut d'ajustement | 3                | 0.000995         | 0.00033     | 0.538    | 0.7013  |
| L'erreur pure       | 2                | 0.001232         | 0.00061     |          |         |
| Total               | 14               | 4.29362          |             |          |         |

Tableau III-5 : Analyse de variance restituée par le modèle quadratique pour la résolution 2

| Source de variation | Degré de liberté | Somme des carrés | Carré moyen | Fisher  | p-value |
|---------------------|------------------|------------------|-------------|---------|---------|
| Modèle              | 9                | 32.3496          | 3.59441     | 355.664 | <0.0001 |
| Résidus             | 5                | 0.05053          | 0.01011     |         |         |
| Défaut d'ajustement | 3                | 0.01018          | 0.00339     | 0.1683  | 0.9095  |
| L'erreur pure       | 2                | 0.04034          | 0.02017     |         |         |
| Total               | 14               | 32.4001          |             |         |         |

Tableau III-6 : Analyse de variance restituée par le modèle quadratique pour la résolution 3

| Source de variation | Degré de liberté | Somme des carrés | Carré moyen | Fisher | p-value |
|---------------------|------------------|------------------|-------------|--------|---------|
| Modèle              | 4                | 1.41297          | 0.35304     | 34.524 | <0.0001 |
| Résidus             | 10               | 0.10225          | 0.01022     |        |         |
| Défaut d'ajustement | 4                | 0.03845          | 0.00961     | 0.9039 | 0.5170  |
| L'erreur pure       | 6                | 0.06380          | 0.01063     |        |         |
| Total               | 14               | 1.51445          |             |        |         |

De plus, la somme des carrés due à l'erreur est très faible par rapport à la somme totale. Ceci indique que le modèle est bien ajusté. L'analyse de la variance proposée ici est une analyse détaillée, en effet, la somme des carrés due aux résidus a été décomposée en somme due au manque d'ajustement et en somme due à « l'erreur pure ». Les répliques exécutées au centre du domaine expérimental ont permis de retrouver l'erreur pure, par conséquent ils ont permis d'effectuer le test du manque d'ajustement.

Les p-value obtenus indiquent que le test ne détecte aucune inadéquation de l'ajustement, par conséquent, il permet de tester l'hypothèse  $H_0$  : « le modèle est bien ajusté en moyenne ».

La figure ci-dessous indique une bonne relation entre les courbes des valeurs observées et des valeurs prévues, Figure III-1.

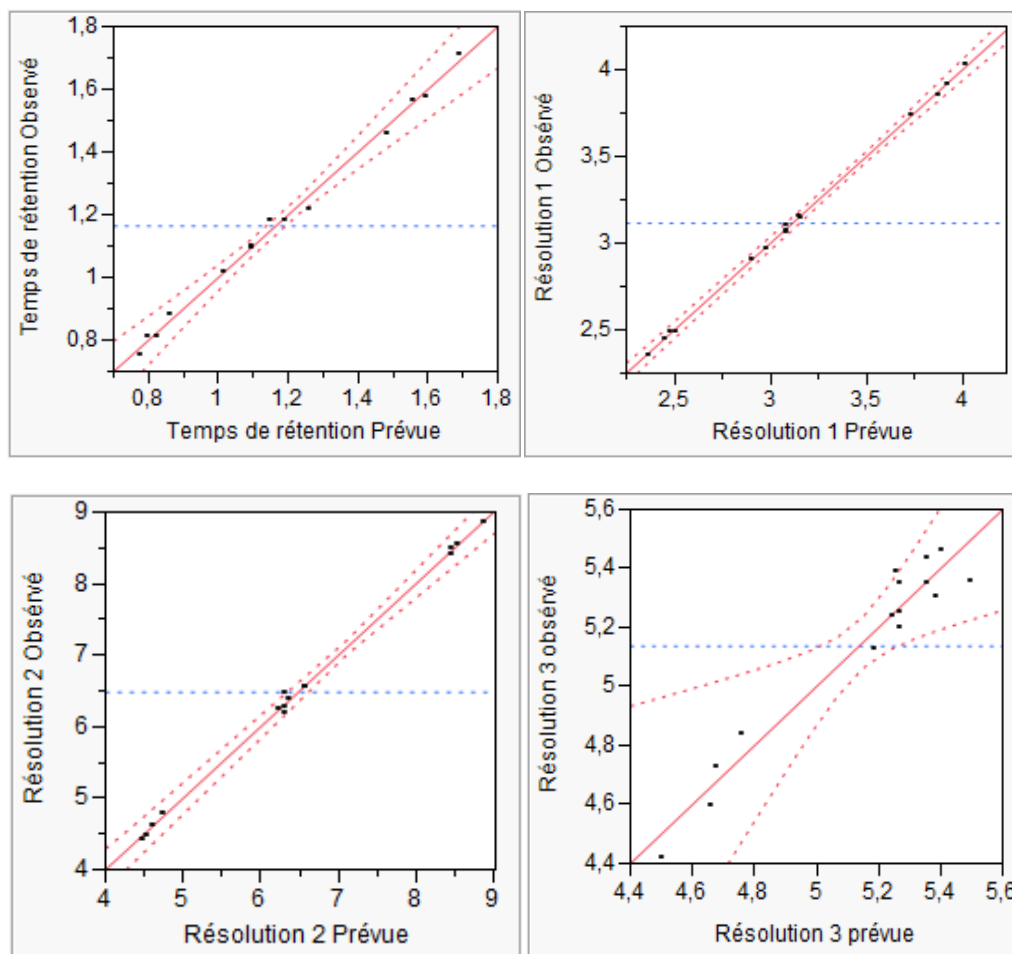


Figure III-1 : Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs estimées pour (le temps de rétention, la résolution 1, la résolution 2 et la résolution 3)

Le modèle rend correctement compte de la relation entre la réponse et les prédicteurs, puisque les courbes obtenues ont parfaitement l'allure d'une droite.

### III.2.2. Evaluation statistique et graphique des résidus

Une analyse plus fine des résidus permettant de juger de manière plus précise la qualité des modèles postulés est réalisée. Les Tableaux III-7, 8, 9, 10 présentent les valeurs des résidus qui correspondent à la différence entre les valeurs observées expérimentalement et les valeurs estimées par le modèle.

La distribution des erreurs résiduelles suit donc une loi normale  $e_i \sim N(0, \sigma^2)$ ,  $\sigma^2$  est estimée par  $CMr = 0,002, 0,0004, 0,0101$  et  $0,0102$  simultanément pour le temps de rétention, résolution 1, résolution 2 et la résolution 3. Les résidus standardisés calculés par la relation

### Chapitre III. Développement et validation d'une nouvelle méthode UPLC pour lutter contre la contrefaçon des médicaments de trouble d'érection

$e_i/s_e$ , nous donnent une indication sur les expériences dont le résultat est susceptible d'être aberrant. En général, une valeur supérieure à 2 ou inférieure à -2 est relative à un essai dont le résultat observé peut influencer significativement le modèle [151].

Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau ci-dessous:

Tableau III-7 : Résidus entre les valeurs observées et les valeurs prévues pour le temps de rétention

| N°Exp | Y <sub>exp</sub> | Y <sub>calc</sub> | Résidu | Résidu standardisé |
|-------|------------------|-------------------|--------|--------------------|
| 1     | 1,578            | 1,595             | -0,017 | -0,82              |
| 2     | 1,567            | 1,555             | 0,012  | 0,58               |
| 3     | 0,811            | 0,823             | -0,012 | -0,58              |
| 4     | 0,812            | 0,796             | 0,016  | 0,77               |
| 5     | 1,181            | 1,19              | -0,009 | -0,43              |
| 6     | 1,218            | 1,256             | -0,038 | -1,83              |
| 7     | 1,182            | 1,144             | 0,038  | 1,83               |
| 8     | 1,02             | 1,011             | 0,009  | 0,43               |
| 9     | 1,712            | 1,687             | 0,025  | 1,21               |
| 10    | 0,882            | 0,861             | 0,021  | 1,01               |
| 11    | 1,46             | 1,481             | -0,021 | -1,01              |
| 12    | 0,751            | 0,776             | -0,025 | -1,21              |
| 13    | 1,094            | 1,096             | -0,002 | -0,10              |
| 14    | 1,095            | 1,096             | -0,001 | -0,05              |
| 15    | 1,098            | 1,096             | 0,002  | 0,10               |

Tableau III-8 : Résidus entre les valeurs observées et les valeurs prévues pour la résolution 1

| N°Exp | Y <sub>exp</sub> | Y <sub>calc</sub> | Résidu | Résidu standardisé |
|-------|------------------|-------------------|--------|--------------------|
| 1     | 4,027            | 4,018             | 0,009  | 0,69               |
| 2     | 3,736            | 3,728             | 0,008  | 0,61               |
| 3     | 2,493            | 2,501             | -0,008 | -0,61              |
| 4     | 2,355            | 2,364             | -0,009 | -0,69              |
| 5     | 3,15             | 3,157             | -0,007 | -0,54              |
| 6     | 2,968            | 2,974             | -0,006 | -0,46              |
| 7     | 3,155            | 3,149             | 0,006  | 0,46               |
| 8     | 2,911            | 2,904             | 0,007  | 0,54               |
| 9     | 3,921            | 3,923             | -0,002 | -0,15              |
| 10    | 2,489            | 2,473             | 0,016  | 1,23               |
| 11    | 3,858            | 3,874             | -0,016 | -1,23              |
| 12    | 2,446            | 2,444             | 0,002  | 0,15               |
| 13    | 3,109            | 3,081             | 0,028  | 2,15               |
| 14    | 3,061            | 3,081             | -0,020 | -1,53              |
| 15    | 3,074            | 3,081             | -0,007 | -0,54              |

### Chapitre III. Développement et validation d'une nouvelle méthode UPLC pour lutter contre la contrefaçon des médicaments de trouble d'érection

Tableau III-9 : Résidus entre les valeurs observées et les valeurs prévues pour la résolution 2

| N°Exp | Y <sub>exp</sub> | Y <sub>calc</sub> | Résidu | Résidu standardisé |
|-------|------------------|-------------------|--------|--------------------|
| 1     | 8,862            | 8,875             | -0,013 | -0,21              |
| 2     | 8,413            | 8,457             | -0,044 | -0,72              |
| 3     | 4,768            | 4,724             | 0,044  | 0,72               |
| 4     | 4,62             | 4,607             | 0,013  | 0,21               |
| 5     | 6,543            | 6,555             | -0,012 | -0,20              |
| 6     | 6,383            | 6,364             | 0,019  | 0,31               |
| 7     | 6,551            | 6,57              | -0,019 | -0,31              |
| 8     | 6,24             | 6,228             | 0,012  | 0,20               |
| 9     | 8,542            | 8,517             | 0,025  | 0,41               |
| 10    | 4,483            | 4,515             | -0,032 | -0,52              |
| 11    | 8,486            | 8,454             | 0,032  | 0,52               |
| 12    | 4,431            | 4,456             | -0,025 | -0,41              |
| 13    | 6,278            | 6,314             | -0,036 | -0,59              |
| 14    | 6,194            | 6,314             | -0,12  | -1,96              |
| 15    | 6,471            | 6,314             | 0,157  | 2,56               |

Tableau III-10 : Résidus entre les valeurs observées et les valeurs prévues pour la résolution 3

| N°Exp | Y <sub>exp</sub> | Y <sub>calc</sub> | Résidu | Résidu standardisé |
|-------|------------------|-------------------|--------|--------------------|
| 1     | 4,599            | 4,656             | -0,057 | -0,71              |
| 2     | 4,837            | 4,758             | 0,079  | 0,98               |
| 3     | 5,303            | 5,381             | -0,078 | -0,97              |
| 4     | 5,46             | 5,403             | 0,057  | 0,71               |
| 5     | 5,354            | 5,353             | 0,001  | 0,01               |
| 6     | 5,358            | 5,492             | -0,134 | -1,66              |
| 7     | 5,391            | 5,257             | 0,134  | 1,66               |
| 8     | 5,241            | 5,242             | -0,001 | -0,01              |
| 9     | 4,729            | 4,673             | 0,056  | 0,69               |
| 10    | 5,433            | 5,356             | 0,077  | 0,95               |
| 11    | 4,42             | 4,497             | -0,077 | -0,95              |
| 12    | 5,13             | 5,186             | -0,056 | -0,69              |
| 13    | 5,2              | 5,268             | -0,068 | -0,84              |
| 14    | 5,253            | 5,268             | -0,015 | -0,19              |
| 15    | 5,352            | 5,268             | 0,084  | 1,04               |

Les résultats des Tableau III-7, Tableau III-8, Tableau III-9 et Tableau III-10 d'analyses des résidus indiquent qu'aucun résidu standardisé ne dépasse la valeur de 2 pour le temps de rétention et la résolution 3. Cependant, la plus grande erreur d'ajustement commise pour les deux réponses à savoir la résolution 1 et 2 (de l'ordre de 0.028 et 0.157, simultanément pour des réponses observées de 3.109 et 6.471) correspond à l'une des expériences dites « centrales » (expériences 13, 14 et 15). Ceci était prévisible, car il est impossible que la réponse moyenne prédite au centre du domaine par le modèle soit

### Chapitre III. Développement et validation d'une nouvelle méthode UPLC pour lutter contre la contrefaçon des médicaments de trouble d'érection

parfaitement ajustée aux trois valeurs différentes obtenues lors des trois répétitions de l'expérience (3.109, 3.061 et 3.074) et (6.278, 6.194 et 6.471). Au sens des moindres carrés, la meilleure réponse moyenne que peut prédire le modèle correspond à la moyenne de ces trois réponses, c'est-à-dire 3.08 et 6.3 ici (d'ailleurs, ces valeurs sont très proches de celles données par les modèles ajustés).

Les différents résidus peuvent aussi être représentés sous forme graphique.

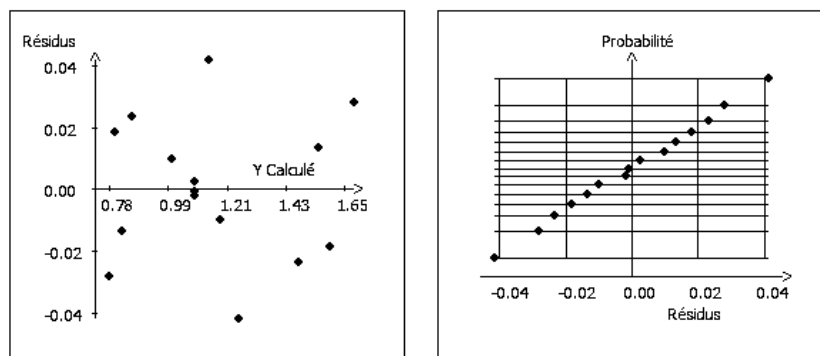


Figure III-2 : À Gauche : graphe de dispersion des valeurs de résidus, à droite : courbe d'Henry pour la vérification de normalité du Temps de rétention

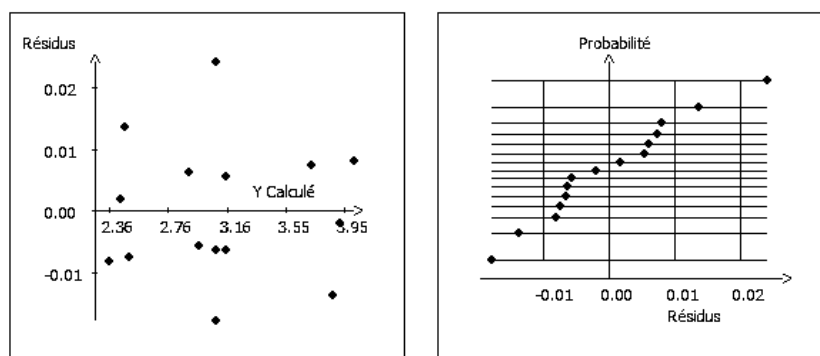


Figure III-3 : À Gauche : graphe de dispersion des valeurs de résidus, à droite : courbe d'Henry pour la vérification de normalité de la Résolution 1

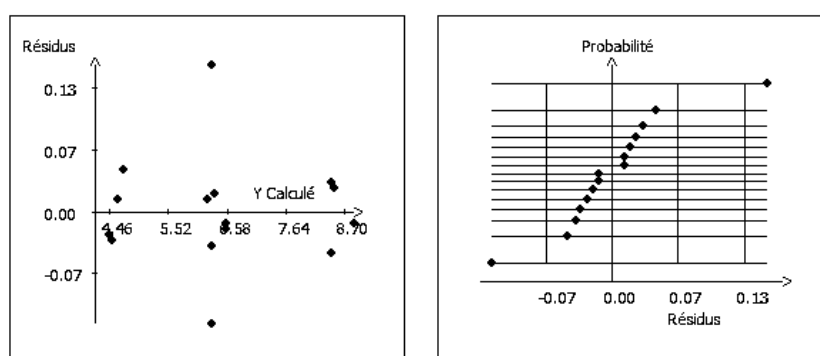


Figure III-4 : À Gauche : graphe de dispersion des valeurs de résidus, à droite : courbe d'Henry pour la vérification de normalité de la Résolution 2

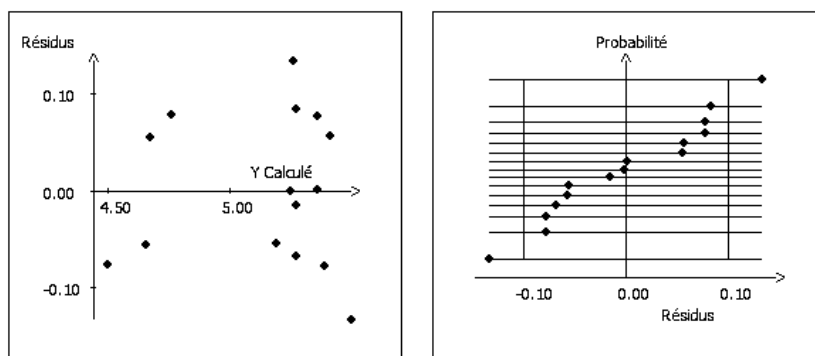


Figure III-5 : À Gauche : graphe de dispersion des valeurs de résidus, à droite : courbe d'Henry pour la vérification de normalité de la Résolution 3

La représentation graphique des résidus en fonction des expériences réalisées (Figure III-2 à Figure III-5) indique une dispersion aléatoire. Par ailleurs, le test d'Henry pour confirmer la normalité illustre clairement l'allure d'une droite. Ces résultats nous amènent à dire que ces résidus suivent pratiquement la loi normale, donc le choix du modèle peut être considéré judicieux.

### III.2.3. Signification des effets des facteurs

Les effets de tous les facteurs étudiés ainsi que les valeurs statistiques de t-Student et la probabilité observée (*p-value*) sont regroupés dans le Tableau III-11, Tableau III-12, Tableau III-13 et Tableau III-14. Les valeurs de t-Student sont employées pour déterminer la signification des coefficients de chaque paramètre, alors que les *p-value* sont définies comme plus petit niveau d'importance menant au rejet de l'hypothèse  $H_0$  ( $b_i=0$ ,  $\alpha=0,05$ ). En général, plus le *p-value* est petit, plus la grandeur de *t* est élevée, et plus le terme correspondant de coefficient est significatif.

Tableau III-11 : Effets des coefficients des modèles reliant le temps de rétention aux facteurs

| Facteur     | Coefficient | Effet  | Ecart-type | T-Student | p-value    |
|-------------|-------------|--------|------------|-----------|------------|
| Intercepte  | $b_0$       | 1.095  | 0.0012     | 911.65    | < 0.01 *** |
| pH          | $b_1$       | -0.016 | 0.0007     | -22.93    | 0.190 **   |
| % ACN       | $b_2$       | -0.382 | 0.0007     | -519.89   | < 0.01 *** |
| Débit       | $b_3$       | -0.072 | 0.0007     | -98.51    | 0.0103 *** |
| pH*pH       | $b_{1-1}$   | 0.022  | 0.0010     | 20.92     | 0.228 **   |
| %ACN*% ACN  | $b_{2-2}$   | 0.073  | 0.0010     | 68.00     | 0.0216 *** |
| Débit*Débit | $b_{3-3}$   | 0.031  | 0.0010     | 29.46     | 0.115 **   |
| % ACN*pH    | $b_{1-2}$   | 0.003  | 0.0010     | 2.88      | 10.2       |
| débit*pH    | $b_{1-3}$   | -0.049 | 0.0010     | -47.80    | 0.0437 *** |
| %ACN*Débit  | $b_{2-3}$   | 0.030  | 0.0010     | 29.06     | 0.118 **   |

### Chapitre III. Développement et validation d'une nouvelle méthode UPLC pour lutter contre la contrefaçon des médicaments de trouble d'érection

Tableau III-12 : Effets des coefficients des modèles reliant la résolution 1 aux facteurs

| Facteur     | Coefficient      | Effet  | Ecart-type | T-Student | p-value    |
|-------------|------------------|--------|------------|-----------|------------|
| Intercepte  | b <sub>0</sub>   | 3.081  | 0.01218    | 252.81    | < 0.01 *** |
| pH          | b <sub>1</sub>   | -0.107 | 0.00746    | -14.32    | < 0.01 *** |
| % ACN       | b <sub>2</sub>   | -0.720 | 0.00746    | -96.45    | < 0.01 *** |
| Débit       | b <sub>3</sub>   | -0.020 | 0.00746    | -2.65     | 4.56 *     |
| pH*pH       | b <sub>1-1</sub> | -0.031 | 0.01098    | -2.78     | 3.89 *     |
| %ACN*% ACN  | b <sub>2-2</sub> | 0.102  | 0.01098    | 9.28      | 0.0244 *** |
| Débit*Débit | b <sub>3-3</sub> | -0.005 | 0.01098    | -0.44     | 68.1       |
| % ACN*pH    | b <sub>1-2</sub> | 0.038  | 0.01055    | 3.62      | 1.52 *     |
| débit*pH    | b <sub>1-3</sub> | -0.015 | 0.01055    | -1.47     | 20.2       |
| %ACN*Débit  | b <sub>2-3</sub> | 0.005  | 0.01055    | 0.47      | 65.6       |

Tableau III-13 : Effets des coefficients des modèles reliant la résolution 2 aux facteurs

| Facteur     | Coefficient      | Effet  | Ecart-type | T-Student | p-value    |
|-------------|------------------|--------|------------|-----------|------------|
| Intercepte  | b <sub>0</sub>   | 6.314  | 0.05707    | 110.63    | < 0.01 *** |
| pH          | b <sub>1</sub>   | -0.133 | 0.03495    | -3.82     | 1.24 *     |
| % ACN       | b <sub>2</sub>   | -2.000 | 0.03495    | -57.23    | < 0.01 *** |
| Débit       | b <sub>3</sub>   | -0.030 | 0.03495    | -0.87     | 42.5       |
| pH*pH       | b <sub>1-1</sub> | 0.148  | 0.05144    | 2.87      | 3.50 *     |
| %ACN*% ACN  | b <sub>2-2</sub> | 0.204  | 0.05144    | 3.96      | 1.07 *     |
| Débit*Débit | b <sub>3-3</sub> | -0.033 | 0.05144    | -0.63     | 55.3       |
| % ACN*pH    | b <sub>1-2</sub> | 0.075  | 0.04942    | 1.52      | 18.8       |
| débit*pH    | b <sub>1-3</sub> | -0.038 | 0.04942    | -0.76     | 47.9       |
| %ACN*Débit  | b <sub>2-3</sub> | 0.001  | 0.04942    | 0.02      | 98.5       |

Tableau III-14 : Effets des coefficients des modèles reliant la résolution 3 aux facteurs

| Facteur     | Coefficient      | Effet  | Ecart-type | T-Student | p-value    |
|-------------|------------------|--------|------------|-----------|------------|
| Intercepte  | b <sub>0</sub>   | 5.268  | 0.07519    | 70.06     | < 0.01 *** |
| pH          | b <sub>1</sub>   | 0.031  | 0.04604    | 0.68      | 52.9       |
| % ACN       | b <sub>2</sub>   | 0.343  | 0.04604    | 7.44      | 0.0691 *** |
| Débit       | b <sub>3</sub>   | -0.087 | 0.04604    | -1.88     | 11.9       |
| pH*pH       | b <sub>1-1</sub> | 0.095  | 0.06777    | 1.40      | 22.1       |
| %ACN*% ACN  | b <sub>2-2</sub> | -0.313 | 0.06777    | -4.62     | 0.572 **   |
| Débit*Débit | b <sub>3-3</sub> | -0.027 | 0.06777    | -0.40     | 70.6       |
| % ACN*pH    | b <sub>1-2</sub> | -0.020 | 0.06512    | -0.31     | 76.8       |
| débit*pH    | b <sub>1-3</sub> | -0.038 | 0.06512    | -0.59     | 58.0       |
| %ACN*Débit  | b <sub>2-3</sub> | 0.002  | 0.06512    | 0.02      | 98.3       |

(\*\*\* : Coefficient hautement significatif; \*\* : Coefficient très significatif; \* : Coefficient significatif)

Les valeurs contenues dans les Tableau III-11 à Tableau III-14 présentent les coefficients du modèle mathématique calculé pour quatre réponses. Ainsi, les valeurs de p-value permettent de contrôler si l'effet considéré est significativement différent de zéro.

D'après les tableaux précédents, on remarque d'une part que la proportion en Acétonitrile est le facteur le plus significatif qui affecte toutes les réponses, d'autre part, le débit affecte le temps de rétention et la résolution 1, le pH affecte les résolutions 1 et 2. De plus, les termes quadratiques ont également un effet significatif tel que : le terme quadratique (pH-pH) contribue significativement sur les quatre réponses et le terme quadratique (% ACN-% ACN) affecte respectivement les résolutions 1 et 2. Il est aussi important de remarquer que l'effet d'interaction entre les facteurs 1-3 (entre le débit et le pH) génère un effet hautement significatif sur le temps de rétention, alors que l'interaction entre les facteurs 2 et 3 (entre le pourcentage du modificateur organique [% ACN] et le débit) génère un effet très significatif sur la même réponse. Également, l'effet de l'interaction entre les facteurs 1 et 2 (entre le pourcentage du modificateur organique [% ACN] et le pH) semble être significativement différent de zéro et génère un effet important sur la résolution 1 (entre Sildénafil et Vardénafil). Il ne semble donc pas y avoir d'effet d'interaction significatif entre le pourcentage du modificateur organique et le pH pour le temps de rétention, résolution 2 et résolution 3, de même pour l'interaction débit et pH sur la résolution 1, 2 et 3 ou bien l'interaction entre le pourcentage du modificateur organique et le débit sur la résolution 2 et 3.

#### **III.2.4. Modèle retenu**

D'après les résultats obtenus précédemment les réponses moyennes prédites ont été modélisées au sens des moindres carrés sous la forme suivante :

$$Y_1 = 1.095 - 0.382X_1 - 0.072X_2 + 0.073X_1^2 - 0.049X_2X_3 \quad \text{Eq.III-2}$$

$$Y_2 = 3.081 - 0.71X_1 - 0.019X_2 - 0.106X_3 + 0.101X_1^2 - 0.030X_2^2 + 0.038X_1X_2 \quad \text{Eq.III-3}$$

$$Y_3 = 6.314 - 0.135X_1 - 1.997X_2 + 0.149X_1^2 + 0.206X_2^2 \quad \text{Eq.III-4}$$

$$Y_4 = 5.268 + 0.342X_2 - 0.313X_2^2 \quad \text{Eq.III-5}$$

Les modèles ont été simplifiés par élimination des termes jugés non significatifs dans l'analyse précédente (p-value>0,05), en fait, ces modèles gardent la même qualité d'ajustement.

### Chapitre III. Développement et validation d'une nouvelle méthode UPLC pour lutter contre la contrefaçon des médicaments de trouble d'érection

Le pourcentage de variation expliquée par les modèles mathématiques obtenus est présenté dans le Tableau III-15.

Tableau III-15 : Facteurs Influent et variation expliqué par les modèles pour quatre réponses

| Réponse            | Facteurs Influent et interaction                           | Variation expliquée par le modèle |
|--------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Temps de rétention | %ACN<br>Débit<br>(%ACN×%ACN)<br>(Débit×pH)                 | 99.95%                            |
| Résolution 1       | %ACN<br>Débit<br>pH<br>(%ACN×%ACN)<br>(%ACN×pH)<br>(pH×pH) | 99.86%                            |
| Résolution 2       | %ACN<br>pH<br>(%ACN×%ACN)<br>(pH×pH)                       | 99.56%                            |
| Résolution 3       | %ACN<br>(%ACN×%ACN)                                        | 94.40%                            |

Le modèle calculé pour la résolution 3 rend compte d'environ 94 % de la variation des résultats expérimentaux. Les modèles calculés pour le temps de rétention, résolution 1 et résolution 2 dépassent 99 %.

#### III.2.5. Recherche des conditions optimales

L'ajustement de bonne qualité ayant été réalisé, l'étape finale consiste à rechercher les conditions optimales pour le problème posé c'est-à-dire les valeurs du pourcentage en modificateur organique (%ACN), du débit ainsi que le pH amenant à optimiser le temps de rétention ainsi que la résolution des quatre substances.

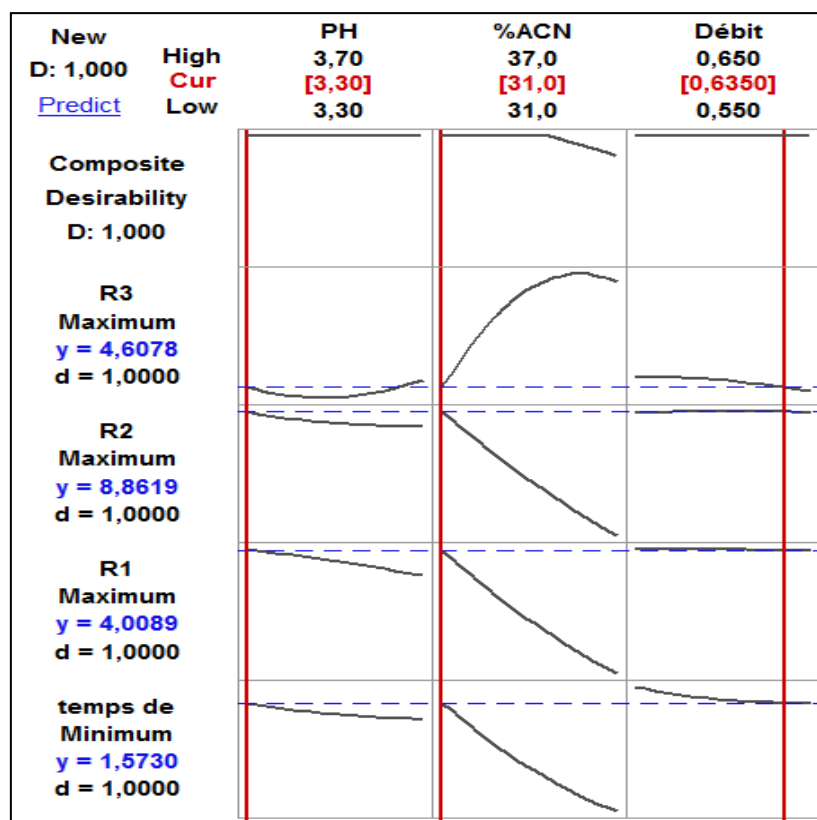


Figure III-6 : Profil de désirabilité pour identifier les réponses Optimales. (Performance maximale  $d=1$ , ( $pH=3.30$ ,  $\%ACN=31$  et débit= $0.635$ ))

Selon la Figure III-6, les conditions expérimentales donnant la valeur maximale de désirabilité ( $D = 1$ ) sont: modificateur organique de 31%, le pH de 3.30, et débit de 0.635 ml/min. Les valeurs des réponses prédites correspondant à la dernière valeur de  $D$  qui sont:  $t_r = 1.573$  min,  $Rs_{1,2} = 4.00$ ,  $Rs_{2,3} = 8.86$ ,  $Rs_{3,4} = 4.60$ . L'efficacité de prédiction du modèle a été confirmée en effectuant l'expérience dans les conditions optimales et le chromatogramme correspondant est présenté à la Figure III-9.

### III.3. Robustesse et espace de robustesse

Basé sur les modèles statistiques prédictifs du temps de rétention et des résolutions, un espace de conception a été établi, il a permis de déterminer les conditions expérimentales finales de la méthode, ainsi que l'évaluation de la robustesse sur le domaine expérimentale.

Le maintien de certaines conditions potentiel est primordial afin de construire l'espace de conception : une première condition requise pour la méthode; une bonne résolution suppose que ( $Rs \geq 1.5$ ), une deuxième considération à savoir le plus court temps de rétention ( $Tr$ ). Enfin, une dernière considération peut être adressée à la tolérance de robustesse d'un

paramètre ; plus le domaine de robustesse d'un paramètre est large plus le résultat sera flexible et durable.

L'espace de conception modélise l'influence simultanée de trois paramètres sur la réponse critique (Rs et Tr). La zone de robustesse de la méthode peut être visualisée par la zone blanche (Figure III-7), dans laquelle les résolutions critiques ne peuvent pas être inférieures à la valeur fixée pour un temps de rétention inférieur 1.6 minute.

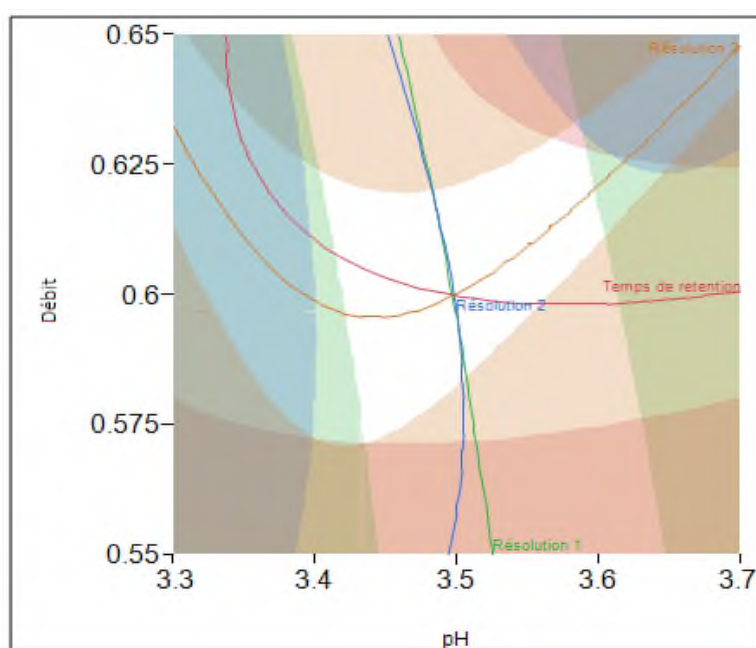


Figure III-7 : Espace de robustesse représentant la zone robuste de toutes les réponses sélectionnées par rapport aux trois facteurs indépendants (le pH de la solution tampon X1 et le débit X3), avec % ACN=31

La Figure III-7 montre un espace de conception (débit-pH-%ACN) dans lequel la robustesse peut être définie comme : débit  $0.6 \pm 0.025$  ml/min, pH  $3.5 \pm 0.1$ , et un niveau constant en % ACN (% ACN=31).

Pour appuyer ces résultats, nous avons réalisé un test de robustesse par le plan de Plackett-Burman [152]. Le choix des facteurs et leurs niveaux de variation, ainsi que la sélection du plan expérimental et les réponses ont été effectués sur la base des paramètres de l'espace de conception élaborés ci-dessus. Ensuite, après l'exécution des expériences et l'obtention des résultats, nous avons évalué les effets des facteurs sur les réponses quantitatives en parcourant deux outils analytiques, à savoir : test statistique et approche graphique.

L'effet de chaque facteur est calculé par l'équation suivante :

$$E_x = \frac{\sum Y(i)}{N/2} - \frac{\sum Y(j)}{N/2} \quad \text{Eq.III-6}$$

Avec  $\sum Y(i)$  et  $\sum Y(j)$  les sommes des réponses lorsque le facteur X est respectivement aux niveaux +1 et -1, N le nombre d'expériences du plan.

La signification des effets de chaque facteur a été statistiquement évaluée par comparaison avec le seuil critique (effet critique ou  $E_{\text{critique}}$ ) dérivé à partir de la loi t de Student [153]:

$$E_{\text{critique}} = t_{\text{critique}} \cdot (S_{\text{er}}) \quad \text{Eq.III-7}$$

Avec ( $S_{\text{er}}$ ) l'erreur type estimée sur un effet et  $t_{\text{critique}}$  la valeur du t de Student.

Un effet est considéré comme significatif si sa valeur absolue est plus grande que celle de l'effet critique (où le p-value correspondante est inférieure à 0,05). L'erreur type ( $E_{\text{er}}$ ) est estimée à partir des répétitions réalisées au centre du domaine expérimental.

Tableau III-16 : Estimation des effets de facteurs par le plan de Plackett-Burman (analyse statistique)

| Facteurs    | Temps de rétention | Résolution1 | Résolution2 | Résolution3 |
|-------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|
| pH          | 0.177              | 0.434       | 0.545       | 0.345       |
| % ACN       | 0.378              | 0.932       | 0.867       | 0.104       |
| Colonne [A] | 0.767              | 0.826       | 0.867       | 0.456       |
| Flow rate   | 0.869              | 0.849       | 0.945       | 0.054       |
| Température | 0.900              | 0.965       | 0.940       | 0.393       |

\* effet non significatif p-value>0.05

Au vu des résultats des calculs statistiques (Tableau III-16), nous remarquons que nos résultats ne sont pas affectés par de faibles modifications délibérées des paramètres analytiques.

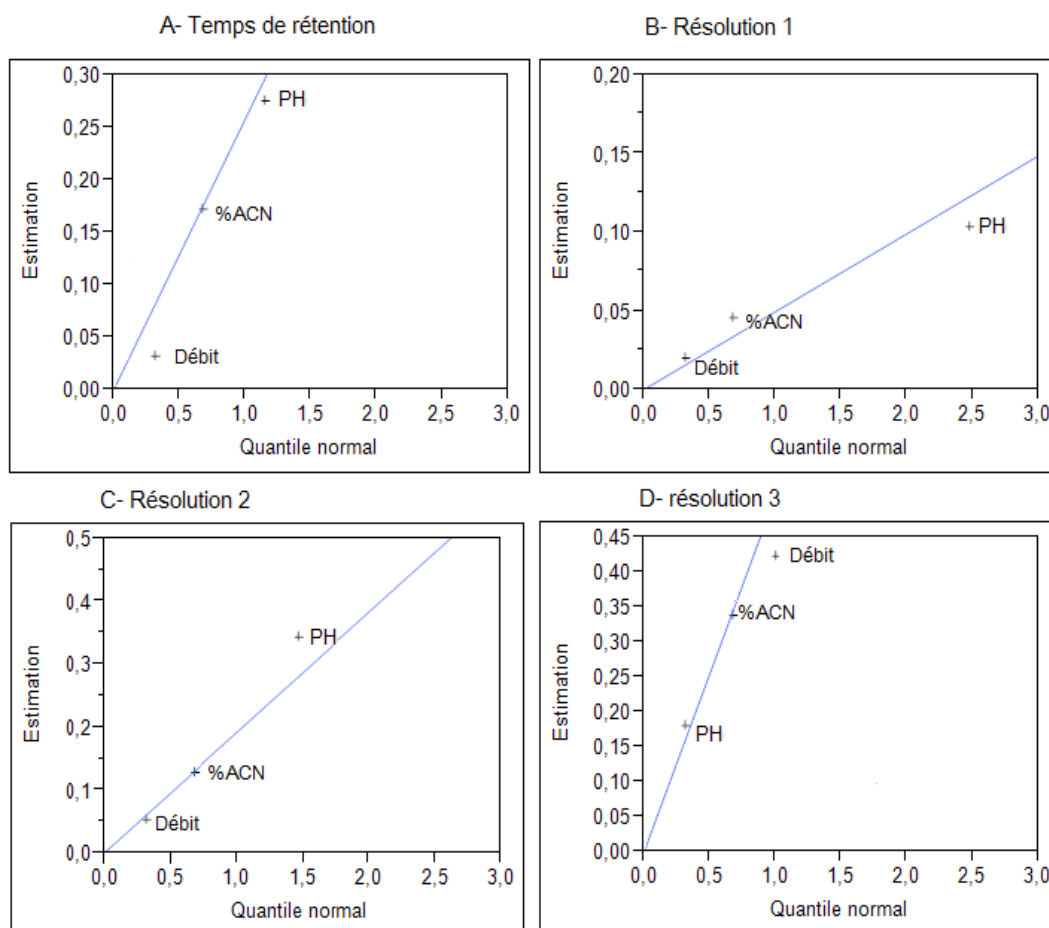


Figure III-8 : Graphique des quantiles demi-normaux pour l'estimation des effets de chaque facteur sur les réponses

Par ailleurs, les effets des facteurs peuvent aussi être interprétés graphiquement, donc pour évaluer la signification de chaque facteur, la distribution des effets estimés a été utilisée. La différence entre les valeurs moyennes des réponses obtenues aux deux niveaux du plan expérimental (-1) et (+1), indique l'effet de chaque facteur sur la réponse. Les marqueurs comprenant des facteurs ayant des effets faibles ou insignifiants (la différence observée entre les deux moyennes est faible) sur la réponse vont décrire (approximativement) une droite sur le graphique des quantiles demi-normaux (Figure III-8). Dès lors, plusieurs graphes peuvent être dessinés pour une évaluation visuelle rapide.

À partir des graphes des quantiles demi-normaux (Figure III-8), nous avons constaté qu'aucun facteur n'affecte la détermination des (PDE-5i). Ainsi, en considérant ces résultats, les différentes conditions expérimentales ont permis d'obtenir une séparation optimale avec un temps de rétention réduit.

### **III.4. Conclusion de l'étude du développement**

Cette étude a montré qu'un modèle polynomial d'ordre 2 semble modéliser correctement la dite méthode chromatographique étudiée ici. Egalement, Il apparait que les conditions expérimentales optimales, c'est-à-dire celles permettant de minimiser le temps de rétention et de maximiser la séparation entre les différents pics chromatographiques sont obtenues pour les niveaux codés suivants :

$$X_1= 3.5, X_2=31, X_3= 0.6.$$

En revenant aux unités initiales ceci correspond donc aux réglages donnés ci-dessous : pH de 3.5, modificateur organique (% ACN=31) et débit de 0.6 ml/min.

Il convient maintenant de réaliser concrètement une ou plusieurs expériences en fixant ces niveaux-là afin de vérifier si le temps de rétention ainsi que les résolutions obtenues correspondent bien aux valeurs moyennes prédites par les modèles (Figure III-9).

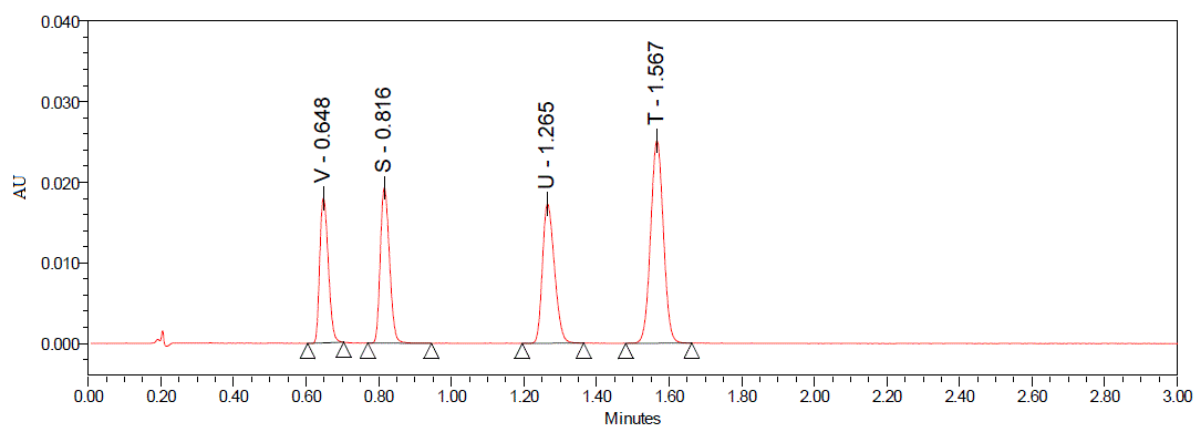


Figure III-9 : Chromatogramme obtenu lors du dosage de quatre substances inhibitrices de la PDE-5i dans des les conditions optimales

Dans un cadre très innovant la méthodologie des plans d'expériences a été utilisée conjointement avec le design space, afin d'optimiser simultanément l'analyse chromatographique et estimer la robustesse de la méthode sur le domaine expérimental.

## **IV. Prévalidation**

### **IV.1. Conformité du système**

Le test d'aptitude du système analytique est évalué à partir de la comparaison des coefficients de variation d'une méthode de dosage obtenu avec les valeurs de référence. L'USP [154] insiste sur le fait que le coefficient de variation d'une méthode de dosage doit

être inférieur ou égal à 2 %. On remarque bien que les coefficients de variation du temps de rétention CV % -(Tr) et les coefficients de variation des aires de pics CV %-Aire pic) ne dépassent pas 2 % pour 6 injections répétitives (Tableau III-17) [155]. Par ailleurs, le Centre D'évaluation des Médicaments et de Recherche (CEDR) recommande une résolution  $R_s > 2$  entre le pic d'intérêt et le pic d'interférence potentielle le plus proche (impureté, excipient, produit de dégradation, étalon interne, etc.) [156].

Tableau III-17 : Test d'aptitude du système analytique (CV<2%)

|                | Vardénafil | Sildénafil | Tadalafil | Udénafil |
|----------------|------------|------------|-----------|----------|
| CV%-(Tr)       | 0.19       | 0.22       | 0.15      | 0.17     |
| CV%-(Aire pic) | 0.5        | 0.8        | 0.9       | 0.5      |
| Résolution     | -          | 3.74       | 3.51      | 7.25     |

#### IV.2. La sélectivité

La sélectivité de la méthode a été évaluée par la comparaison des chromatogrammes typiques obtenus en analysant une solution de blanc (la phase mobile), une solution de standard d'étalonnage (étalon) et une solution de standard de validation (étalon + excipient). Les résultats obtenus indiquent l'absence absolue de pics ou d'interférence au temps de rétention qui correspond aux pics de quatre substances (Figure III-10).

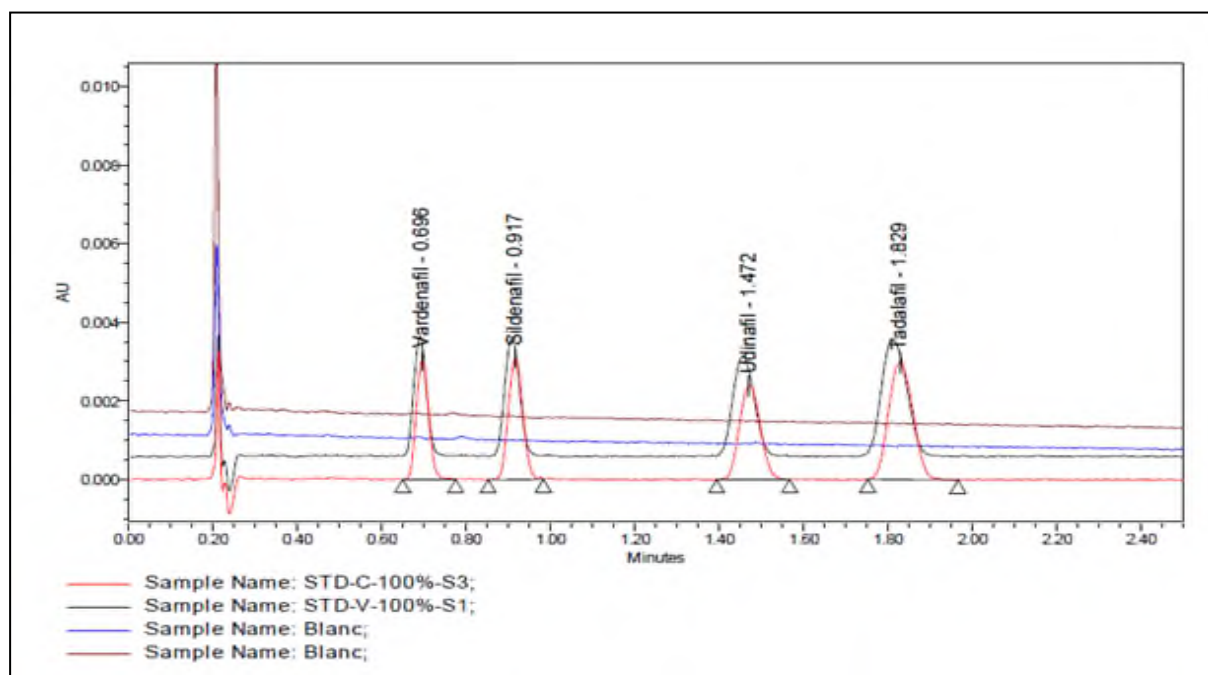


Figure III-10 : Chromatogramme typique de l'analyse de standard d'étalonnage, de validation et la phase mobile

### IV.3. Détermination d'intervalle de dosage

Nous avons choisi une gamme de concentration similaire pour chaque substance PDE-5i, afin de démontrer l'existence d'une relation linéaire entre les concentrations et les réponses (aires) :

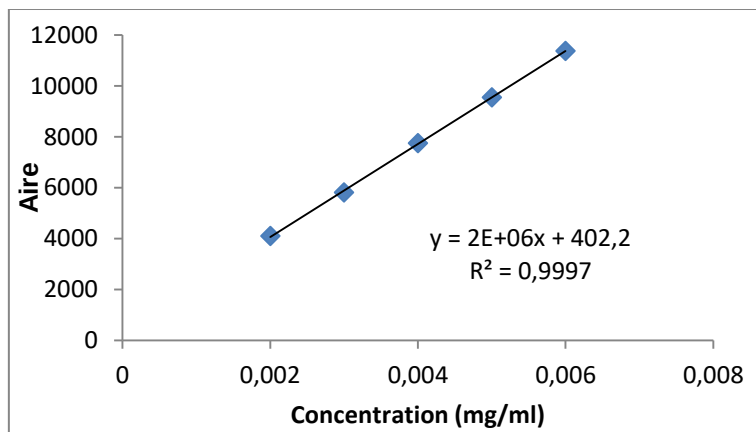


Figure III-11 : Intervalle de dosage de sildénafil 0.002 à 0.006 mg/ml

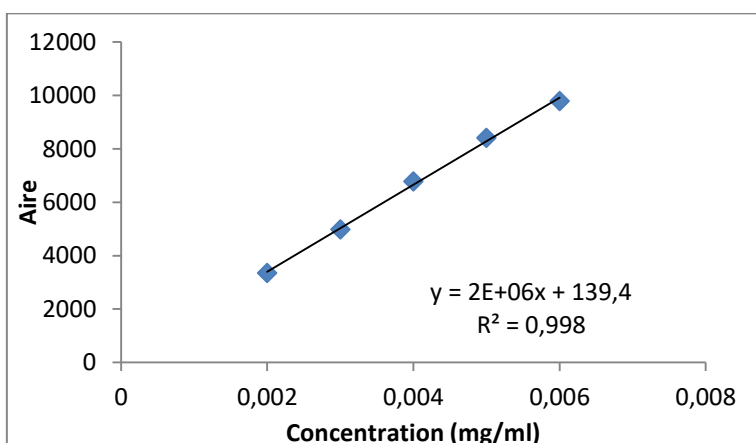


Figure III-12 : Intervalle de dosage de vardénafil 0.002 à 0.006 mg/ml

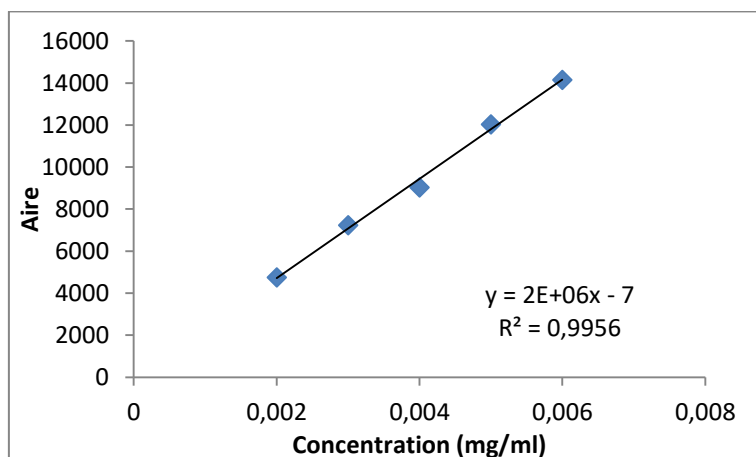


Figure III-13 : Intervalle de dosage de udénafil 0.002 à 0.006 mg/ml

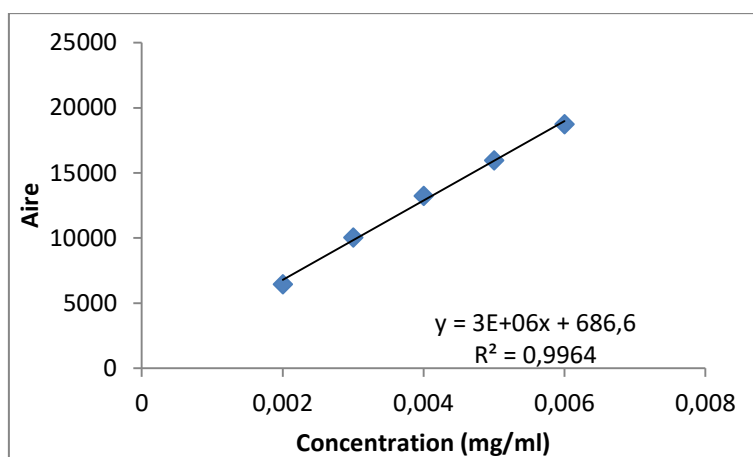


Figure III-14 : Intervalle de dosage de tadalafil 0.002 à 0.006 mg/ml

D'après les (Figure III-11 à Figure III-14), on constate l'existence d'une relation linéaire entre les concentrations et les réponses (aires). Sur la base de ces résultats, le protocole expérimental établi pour l'étude de validation est résumé par le Tableau III-18 et le Tableau III-19.

Tableau III-18 : Protocole expérimental des standards de calibration

| Niveau               | Niveau (%)                                          | P <sub>et</sub> (mg) | V <sub>d1</sub> (ml) | P <sub>ed1</sub> (ml) | V <sub>d2</sub> (ml) | Conc (µg/ml) |
|----------------------|-----------------------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|--------------|
| 1                    | 50                                                  | 5                    | 25                   | 1                     | 100                  | 0.002        |
| 2                    | 75                                                  |                      |                      | 4                     | 200                  | 0.003        |
| 2                    | 100                                                 |                      |                      | 1                     | 50                   | 0.004        |
| 4                    | 125                                                 |                      |                      | 2.5                   | 100                  | 0.005        |
| 5                    | 150                                                 |                      |                      | 3                     | 100                  | 0.006        |
| Nombre de série      | 3 séries, à raison d'une série par jour             |                      |                      |                       |                      |              |
| Nombre de répétition | 3 répétitions, pour chaque niveau dans chaque série |                      |                      |                       |                      |              |

Tableau III-19 : Protocole expérimental des standards de validation

| Niveau               | Niveau (%)                                          | P <sub>et</sub> (mg) | V <sub>d1</sub> (ml) | P <sub>ed1</sub> (ml) | V <sub>d2</sub> (ml) | Conc (µg/ml) |
|----------------------|-----------------------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|--------------|
| 1                    | 50                                                  | 5                    | 25                   | 1                     | 100                  | 0.002        |
| 2                    | 75                                                  |                      |                      | 4                     | 200                  | 0.003        |
| 2                    | 100                                                 |                      |                      | 1                     | 50                   | 0.004        |
| 4                    | 125                                                 |                      |                      | 2.5                   | 100                  | 0.005        |
| 5                    | 150                                                 |                      |                      | 3                     | 100                  | 0.006        |
| Nombre de série      | 3 séries, à raison d’une série par jour             |                      |                      |                       |                      |              |
| Nombre de répétition | 3 répétitions, pour chaque niveau dans chaque série |                      |                      |                       |                      |              |

## V. Validation de la méthode de caractérisation des PDE-5i

### V.1. Choix de la fonction de réponse

Avant de passer à la détermination de la fonction réponse, une évaluation d'alignement des résultats est nécessaire.

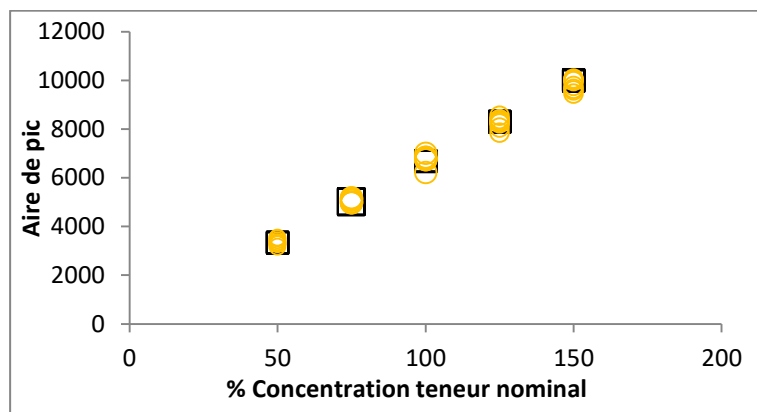


Figure III-15 : Plans d'étalonnage et de validation du composé sildénafil. Les réponses de validation sont représentées par des carrés noirs, celles d'étalonnage par cercle jaune

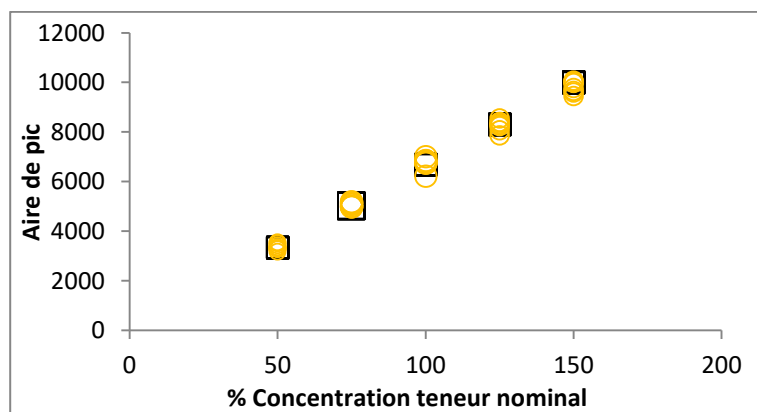


Figure III-16 : Plans d'étalonnage et de validation du composé vardénafil. Les réponses de validation sont représentées par des carrés noirs, celles d'étalonnage par cercle jaune

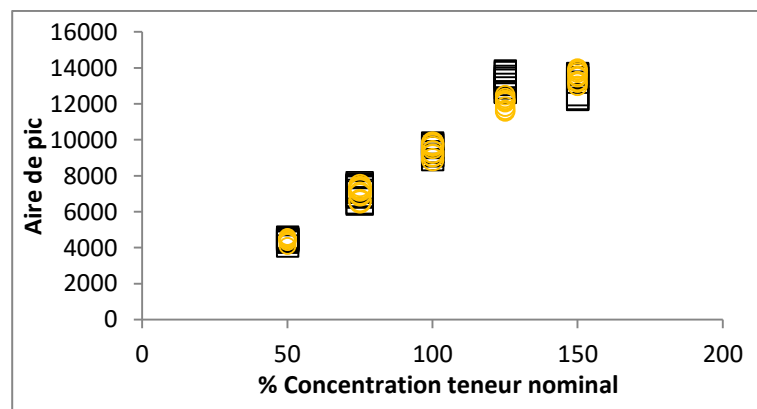


Figure III-17 : Plans d'étalonnage et de validation du composé udénafil. Les réponses de validation sont représentées par des carrés noirs, celles d'étalonnage par cercle jaune

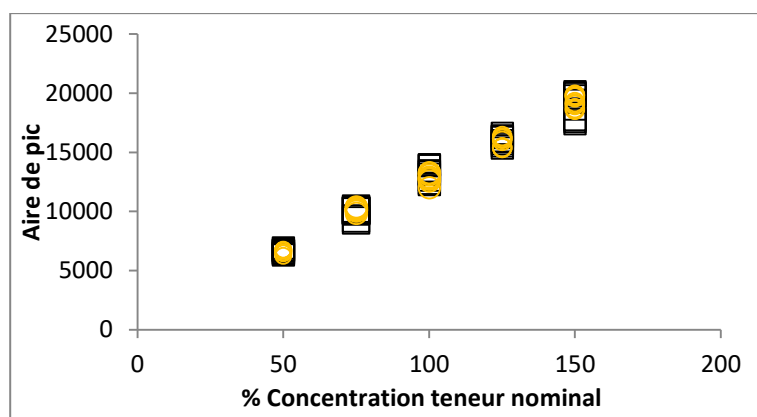


Figure III-18 : Plans d'étalonnage et de validation du composé udenafil. Les réponses de validation sont représentées par des carrés noirs, celles d'étalonnage par cercle jaune

Les Figures III-15, III-16, III-17 et III-18 illustrent simultanément les données des plans d'étalonnage et de validation des substances PDE-5i, les quatre substances présentent le même aspect, à savoir un bon alignement. On remarque que les réponses sont bien alignées verticalement. Par conséquent, on n'aura pas besoin d'aligner nos résultats pour la construction du profil d'incertitude.

Le choix de la fonction de réponse peut emprunter deux voies distinctes et différentes :

La première méthode est basée sur l'étude de la distribution des résidus standardisés entre les valeurs obtenues et les valeurs prédites par le modèle (Figure III-19 à Figure III-22).

Les modèles suivants ont été sélectionnés pour évaluer les paramètres de la validation: modèle de régression linéaire simple, modèle de régression linéaire passant par 0 en utilisant le niveau de concentration le plus élevé (0-Max), modèle de régression linéaire pondéré ( $1/x$ ,  $1/x^2$ ), modèle de régression linéaire quadratique, modèle de régression linéaire après une transformation logarithmique et une transformation racine carrée.

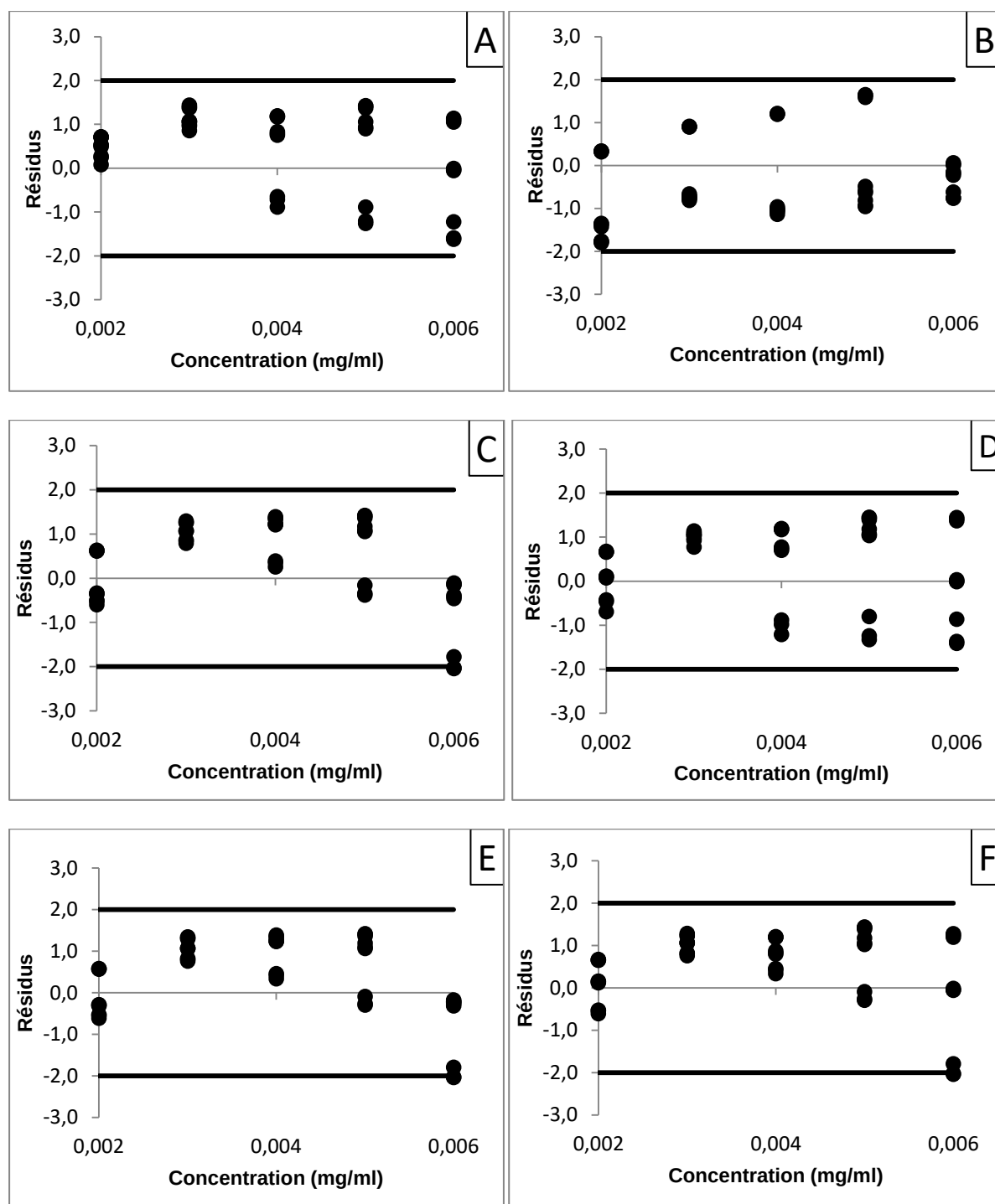


Figure III-19 : Distribution de résidus obtenus pour différents modèles d'étalonnage pour la substance sildénafil. (A) Modèle linéaire simple, (B) Modèle 0-Max, (C) Modèle linéaire quadratique, (D) Modèle linéaire simple pondéré, (E) Modèle quadratique pondéré, (F) Modèle linéaire après transformation racine carrée

D'après la Figure III-19, il est intéressant de remarquer que les résidus obtenus par le modèle linéaire simple et le modèle linéaire pondérer ( $1/x$ ) appartient à l'intervalle  $\pm 2$ . Cependant le modèle 0-Max présent un résidu à l'extérieur de l'intervalle  $\pm 2$  au niveau de

### Chapitre III. Développement et validation d'une nouvelle méthode UPLC pour lutter contre la contrefaçon des médicaments de trouble d'érection

concentration 0.002 µg/ml, également, plusieurs résidus sortent de l'intervalle  $\pm 2$  au niveau de concentration 0.006 µg/ml pour le modèle de régression linéaire quadratique, modèle de régression linéaire quadratique pondéré et le modèle de régression linéaire après transformation racine carrée.

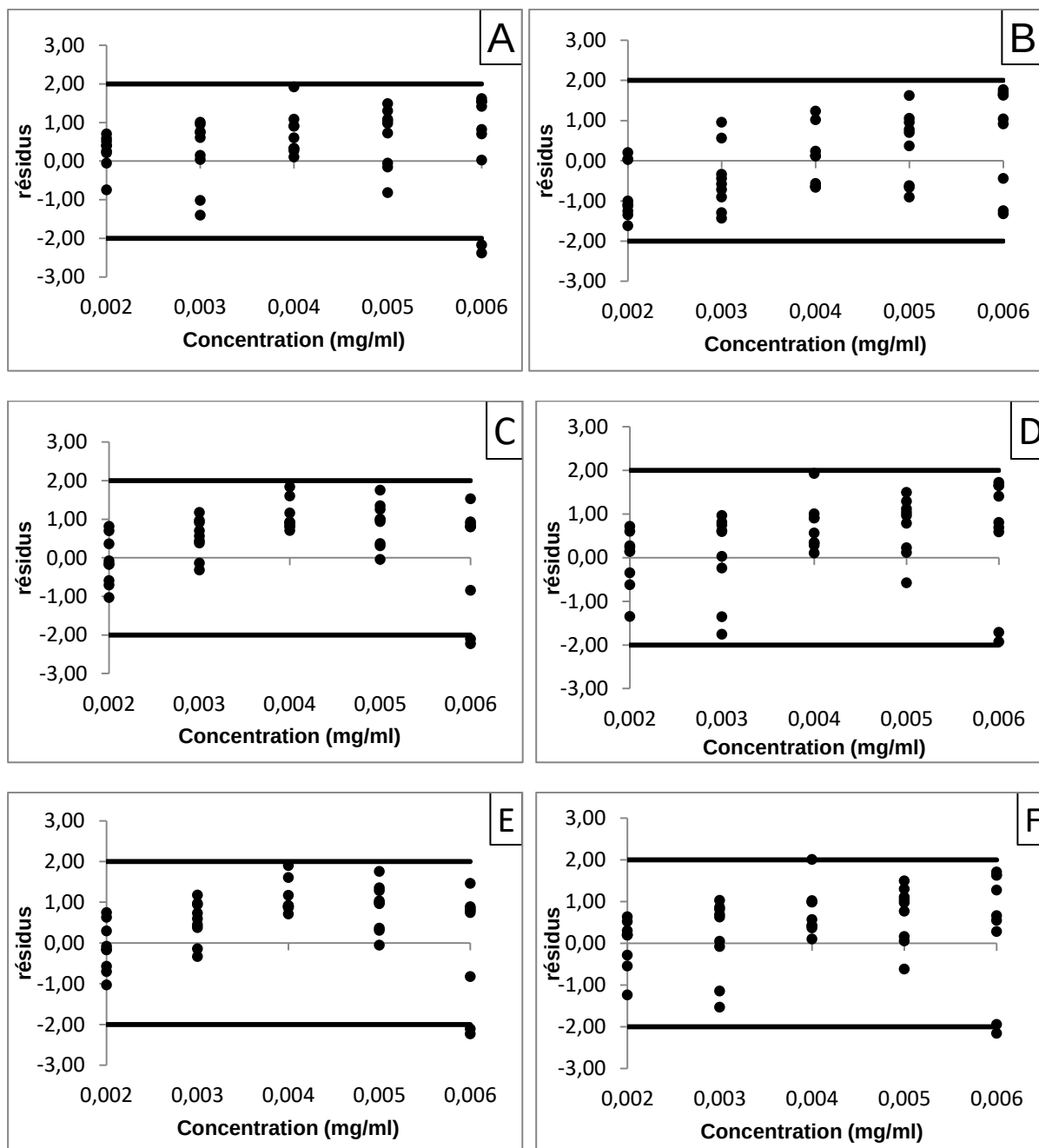


Figure III-20 : Distribution de résidus obtenus pour différents modèles d'étalonnage pour la substance vardénafil. (A) Modèle linéaire simple, (B) Modèle 0-Max, (C) Modèle linéaire quadratique, (D) Modèle linéaire simple pondéré, (E) Modèle quadratique pondéré, (F) Modèle linéaire après transformation racine carrée

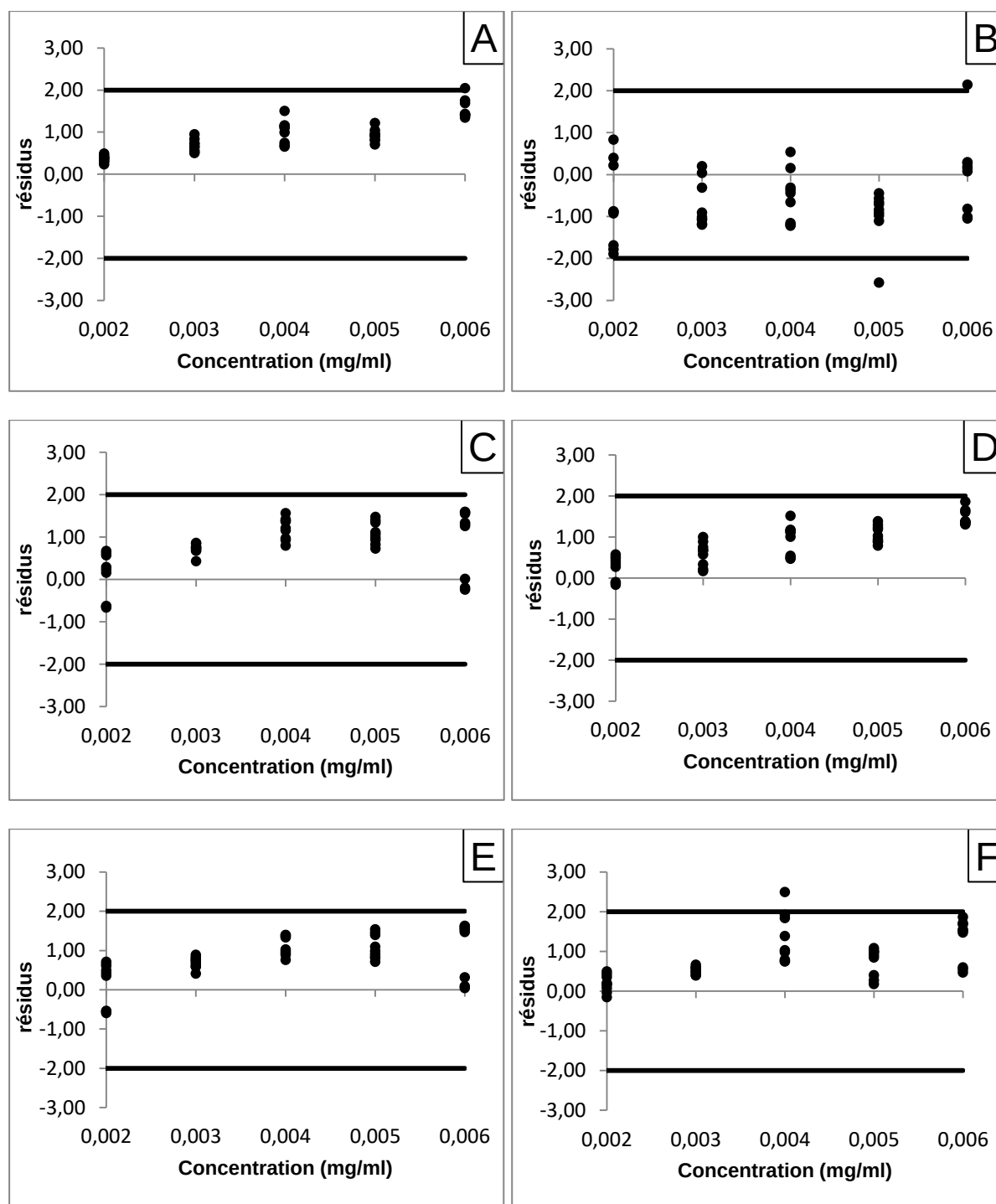


Figure III-21 : Distribution de résidus obtenus pour différents modèles d'étalonnage pour la substance udénafil. (A) Modèle linéaire simple, (B) Modèle 0-Max, (C) Modèle linéaire quadratique, (D) Modèle linéaire simple pondéré, (E) Modèle quadratique pondéré, (F) Modèle linéaire après transformation racine carrée

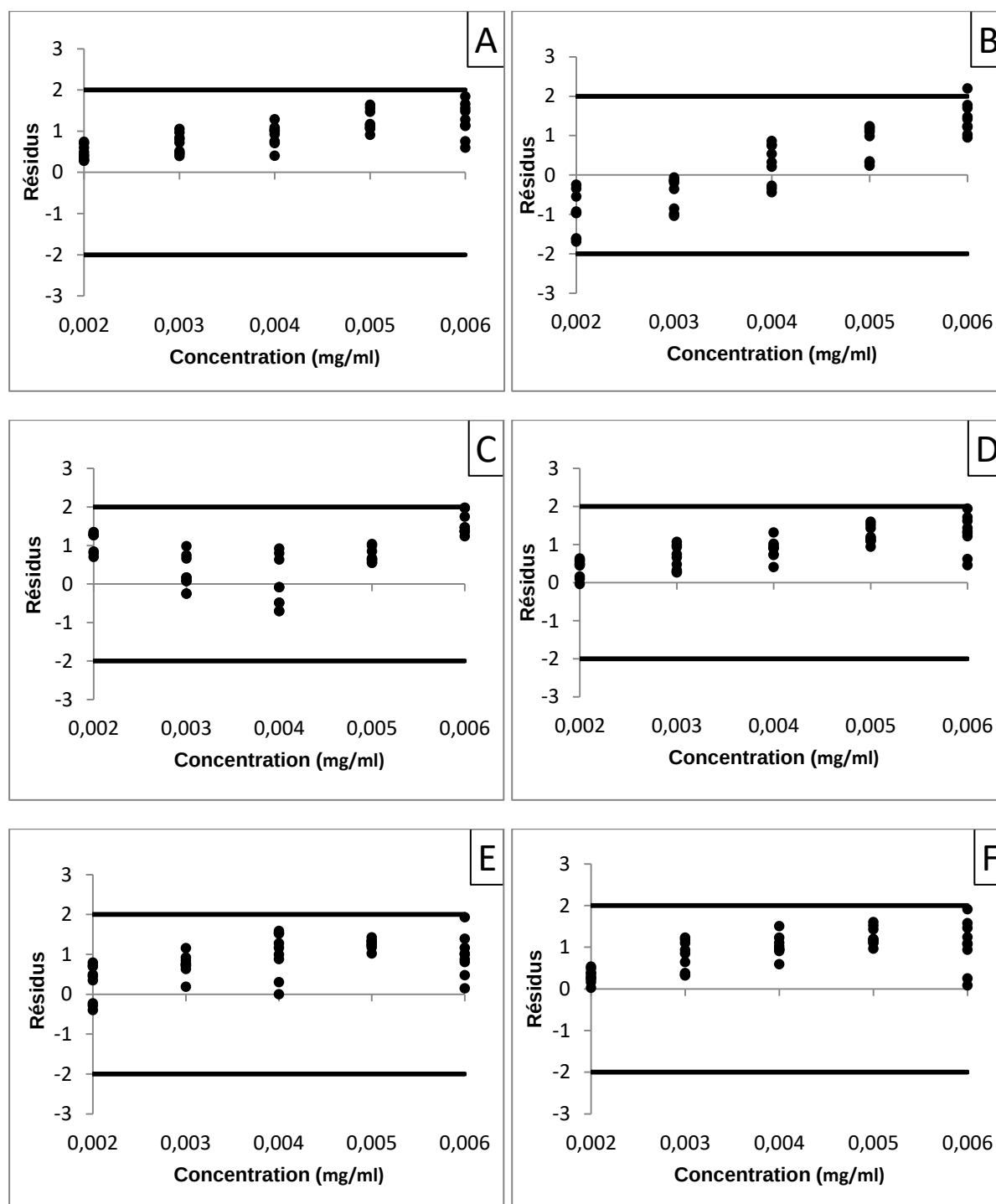


Figure III-22 : Distribution de résidus obtenus pour différents modèles d'étalonnage pour la substance tadalafil. (A) Modèle linéaire simple, (B) Modèle 0-Max, (C) Modèle linéaire quadratique, (D) Modèle linéaire simple pondéré, (E) Modèle quadratique pondéré, (F) Modèle linéaire après transformation racine carrée

Le résidu standardisé le plus élevé (de l'ordre de -2.38 pour le niveau de concentration 0.006) correspond à l'une des expériences qui sort de l'intervalle  $\pm 2$  pour le modèle de régression linéaire simple, également, ces résidus élevés sont retrouvés dans la l'ensemble des modèles de régression à l'exception du modèle 0-Max (Figure III-20). Pour ce modèle, il est prévisible que la plupart des résidus restent à l'intérieur de l'intervalle  $\pm 2$ , par conséquent, ce modèle sera considéré par la suite pour le calcul des autres paramètres pour la substance vardénafil.

Concernant la substance udénafil, on vérifie aisément la distribution des résidus avec les deux modèles à savoir : modèle de régression linéaire simple, modèle de régression linéaire quadratique et le modèle de régression linéaire quadratique pondéré (Figure III-21). Pour la substance tadalafil les résidus qui appartient à l'intervalle  $\pm 2$  ont été obtenus avec les modèles suivants : modèle de régression linéaire simple, modèle de régression linéaire simple pondérée et le modèle de régression linéaire après une transformation racine carrée (Figure III-22). Remarquons que pour les modèles 0-Max, le modèle de régression linéaire quadratique et le modèle de régression linéaire quadratique pondéré présentent un résidu à l'extérieur de l'intervalle  $\pm 2$  pour le biveau de concentration 0.006 $\mu\text{g/ml}$ .

La deuxième méthode consiste à évaluer les limites d'incertitude à l'intérieur des limites d'acceptabilité.

Selon les recommandations de l'USP, et pour avoir une idée sur l'efficacité d'un principe actif, l'intervalle standard d'activité des produits manufacturés est compris entre 95% et 105% ou entre 90% et 110% de la quantité étiqueté [157, 158] . De plus, aucune méthode officielle d'analyse de l'uniformité de la teneur par HPLC n'a été rapportée dans la pharmacopée américaine (USP), la British Pharmacopoeia (BP) ou l'European Pharmacopoeia (EP) pour les quatre substances PDE-5i, pour cela nous avons décidé de choisir  $\pm 10\%$  comme valeur pou les limites d'acceptation.

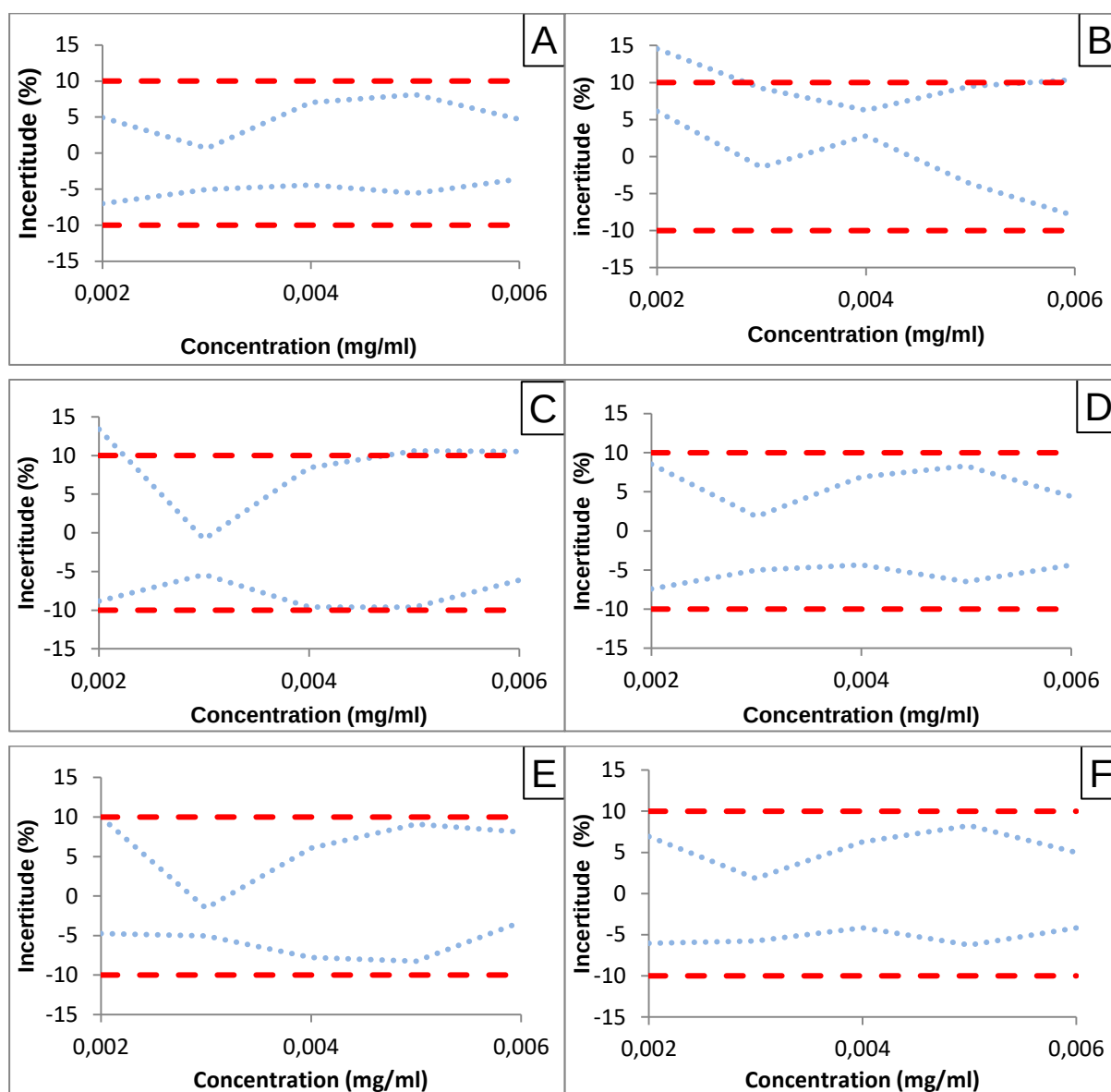


Figure III-23 : Evaluation des limites d'incertitude à l'intérieur des limites d'acceptabilité pour différents modèles d'étalonnage pour la substance sildénafil. (A) Modèle linéaire simple, (B) Modèle 0-Max, (C) Modèle linéaire quadratique, (D) Modèle linéaire simple pondéré, (E) Modèle quadratique pondéré, (F) Modèle linéaire après transformation racine carrée

D'après la Figure III-23, il est intéressant de remarquer que les limites d'incertitude obtenues par le modèle linéaire simple, le modèle linéaire pondérer ( $1/x$ ) et le modèle linéaire après transformation racine carrée appartient aux limites d'acceptabilité  $\pm 10\%$ . Cependant, le modèle 0-Max présent des valeurs d'incertitude à l'extérieur des limites d'acceptabilité a plusieurs niveaux de concentration, également, des valeurs d'incertitude sortent des limites d'acceptabilité au niveau de concentration 0.002 mg/ml pour le modèle de régression linéaire quadratique et modèle de régression linéaire quadratique pondéré.

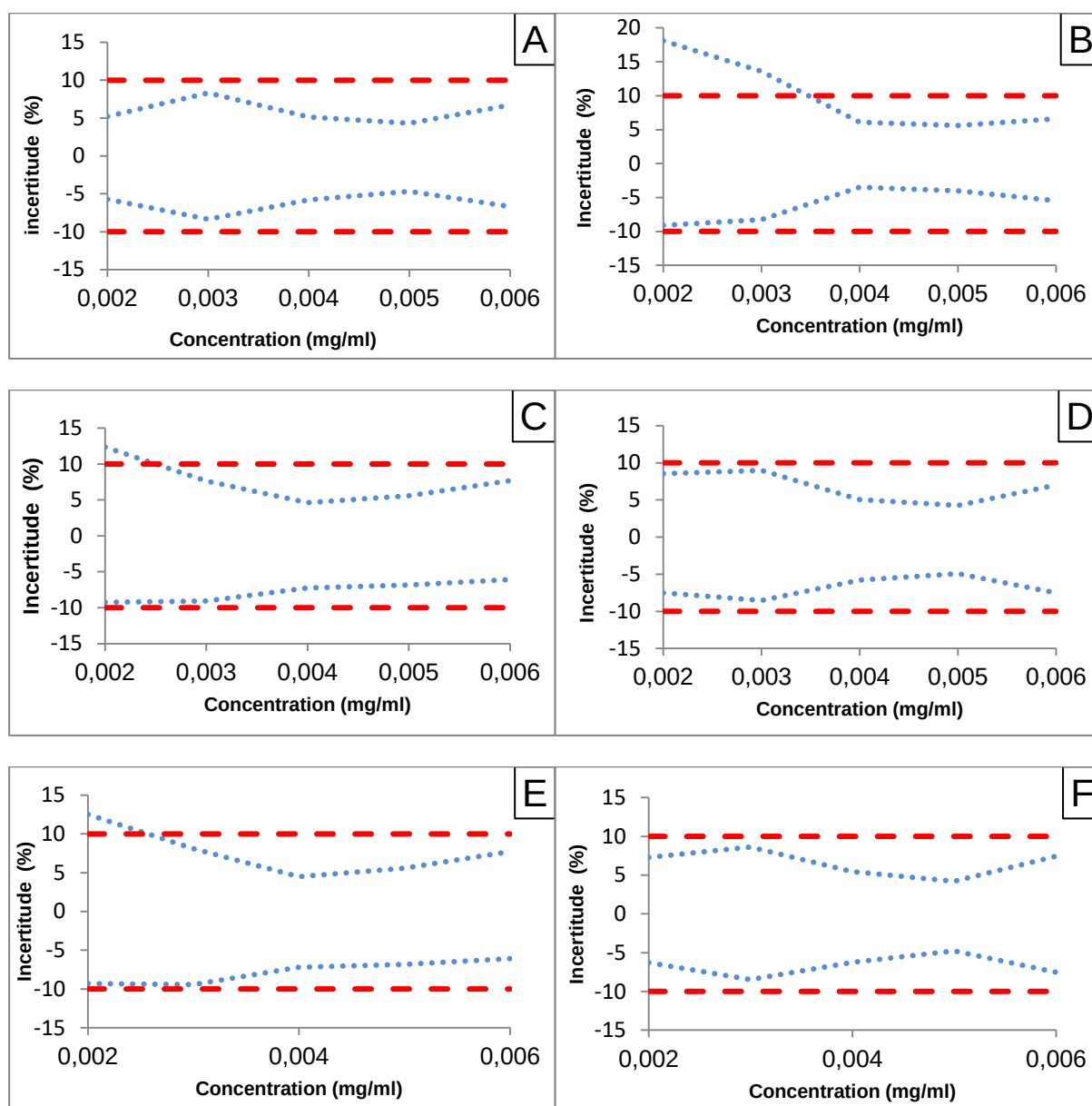


Figure III-24 : Evaluation des limites d'incertitude à l'intérieur des limites d'acceptabilité pour différents modèles d'étalonnage pour la substance vardénafil. (A) Modèle linéaire simple, (B) Modèle 0-Max, (C) Modèle linéaire quadratique, (D) Modèle linéaire simple pondéré, (E) Modèle quadratique pondéré, (F) Modèle linéaire après transformation racine carrée

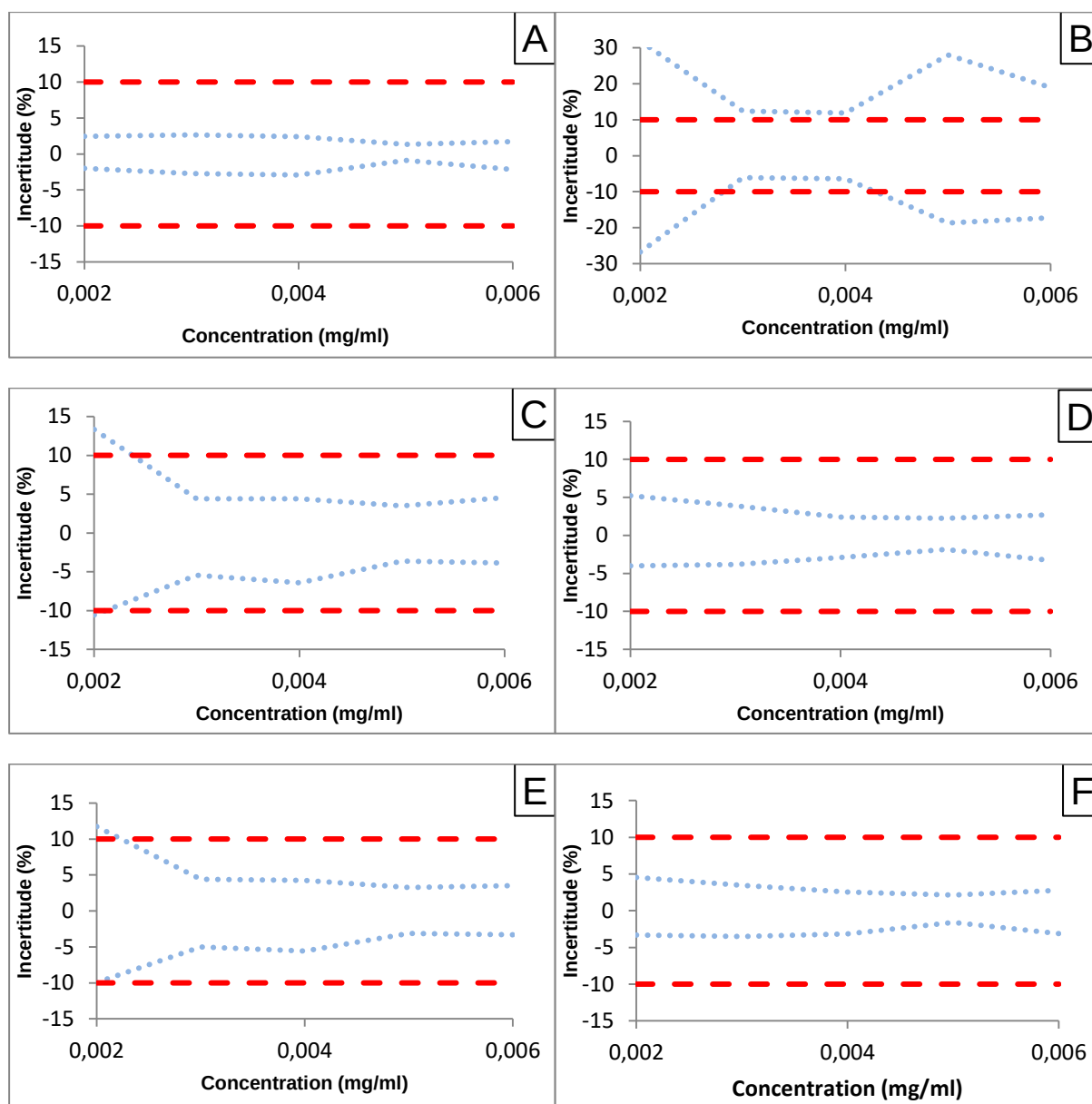


Figure III-25 : Evaluation des limites d'incertitude à l'intérieur des limites d'acceptabilité pour différents modèles d'étalonnage pour la substance udénafil. (A) Modèle linéaire simple, (B) Modèle 0-Max, (C) Modèle linéaire quadratique, (D) Modèle linéaire simple pondéré, (E) Modèle quadratique pondéré, (F) Modèle linéaire après transformation racine carrée

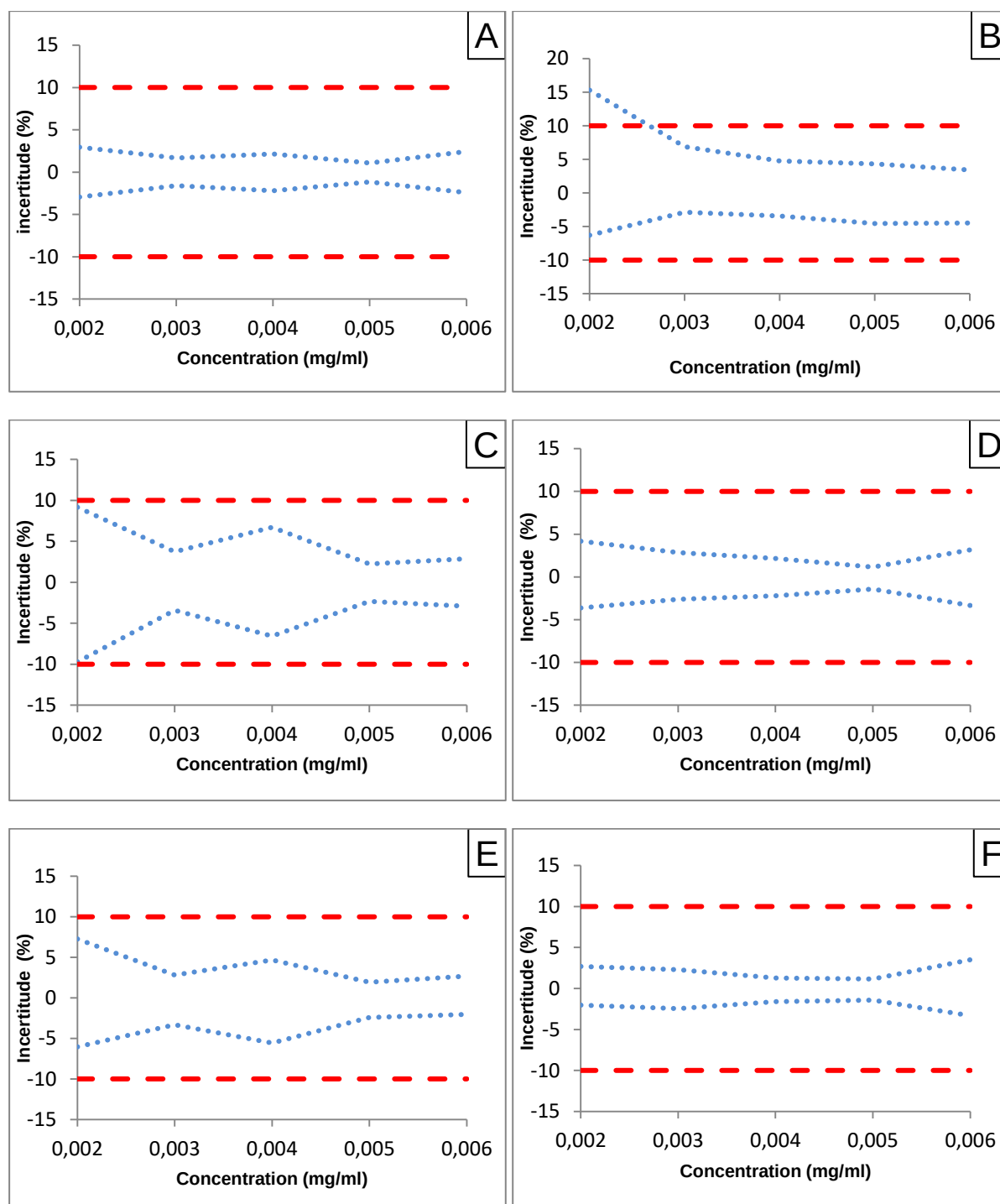


Figure III-26 : Evaluation des limites d'incertitude à l'intérieur des limites d'acceptabilité pour différents modèles d'étalonnage pour la substance tadalafil. (A) Modèle linéaire simple, (B) Modèle 0-Max, (C) Modèle linéaire quadratique, (D) Modèle linéaire simple pondéré, (E) Modèle quadratique pondéré, (F) Modèle linéaire après transformation racine carrée

L'évaluation des limites d'incertitude vis-à-vis les limites d'acceptabilité conduit à définir le modèle de régression le plus adéquat. D'après la Figure III-23 à Figure III-26, on constate que les profils les plus favorables qui permettent d'atteindre notre objectif sont ceux

### Chapitre III. Développement et validation d'une nouvelle méthode UPLC pour lutter contre la contrefaçon des médicaments de trouble d'érection

obtenus avec le modèle de régression linéaire simple, linéaire simple pondéré et après transformation racine carrée pour l'ensemble des substances PDE-5i, également, le modèle linéaire quadratique pondéré semble évaluer correctement les limites d'incertitude pour la substance tadalafil. Par contre, avec le modèle 0-Max, le modèle de régression linéaire quadratique et le modèle de régression quadratique pondéré il est impossible d'obtenir des limites d'incertitude à l'intérieur des limites d'acceptabilité.

Maintenant que le choix de la fonction réponse a été réalisé par les deux méthodes, l'étape qui suit consiste à évaluer ces résultats. Nous remarquons une étroite corrélation entre les résultats obtenus par les deux méthodes pour le sildénafil, udénafil et tadalafil, cependant, il est difficile de retrouver cette concordance pour le vardénafil. Pour cela nous avons décidé d'opter pour la méthode flexible qui offre plus de choix qui n'est autre que la deuxième.

À travers le modèle de calibration retenu (Tableau III-20), les concentrations de standards de validation ont été calculées en retour ce qui permet d'obtenir le biais relatif moyen pour chaque niveau de concentration et de retrouver les limites supérieures et inférieures d'incertitude pour une proportion  $\beta$  et une confiance  $\gamma$ .

Tableau III-20 : Modèles de régression retenus pour l'évaluation des critères de la validation analytique

| Substances | Modèle de régression | Séries    | Ordonnée à l'origine | Pente   | R <sup>2</sup> (%) |
|------------|----------------------|-----------|----------------------|---------|--------------------|
| Sildenafil | Linéaire simple      | Série n°1 | 496,73               | 1806200 | 99                 |
|            |                      | Série n°2 | 566,73               | 1762033 | 99,2               |
|            |                      | Série n°3 | 710,27               | 1735133 | 98,8               |
| Vardénafil | Linéaire simple      | Série n°1 | 59.3                 | 1658067 | 99,5               |
|            |                      | Série n°2 | 217.4                | 1596367 | 99,6               |
|            |                      | Série n°3 | 346.1                | 1583133 | 99,1               |
| Udénafil   | Linéaire simple      | Série n°1 | 120.6                | 2333567 | 98,6               |
|            |                      | Série n°2 | 268.7                | 2260600 | 98,3               |
|            |                      | Série n°3 | 194.6                | 2298000 | 97,8               |
| Tadalafil  | Linéaire simple      | Série n°1 | 170,4                | 3214100 | 99,6               |
|            |                      | Série n°2 | 673,7                | 3063367 | 99,6               |
|            |                      | Série n°3 | 604,3                | 3081300 | 98,6               |

Pour chaque série de mesure, et en s'appuyant sur les modèles de régression retrouvés, les concentrations de standards de validation ont été calculées en retour.

À travers le calcul précédant, nous avons obtenu le biais relatif moyen pour tous les niveaux de concentration, ainsi que l'intervalle de tolérance de futures mesures pour une proportion  $\beta$  égale à 95 % avec un niveau de confiance  $\gamma$  égale à 95 %.

Nous avons examiné les profils d'incertitudes obtenus pour quatre substances. Ainsi, en considérant le modèle de régression linéaire simple, les limites d'incertitude relative (LIR) n'excèdent pas les limites d'acceptabilité de 10 % pour les quatre substances (Figure III-27).

Étant donné que les (LIR) n'excèdent pas les limites d'acceptabilité à différents niveaux de concentration, l'objectif de ladite méthode demeure atteint. Cet objectif repose sur le fait de caractériser les substances inhibitrices de la PDE-5 dans des échantillons contrefaits avec une probabilité de futures mesures qui ne dépasse pas la limite d'acceptabilité de 10 %.

En conséquence, le modèle de régression linéaire simple a été le plus adéquat pour la prédiction inverse. Il a assuré des résultats fiables qui s'accordent avec l'objectif de cette méthode. Le choix des profils d'incertitude a été effectué à travers les résultats (de la Figure III-23 à Figure III-26).

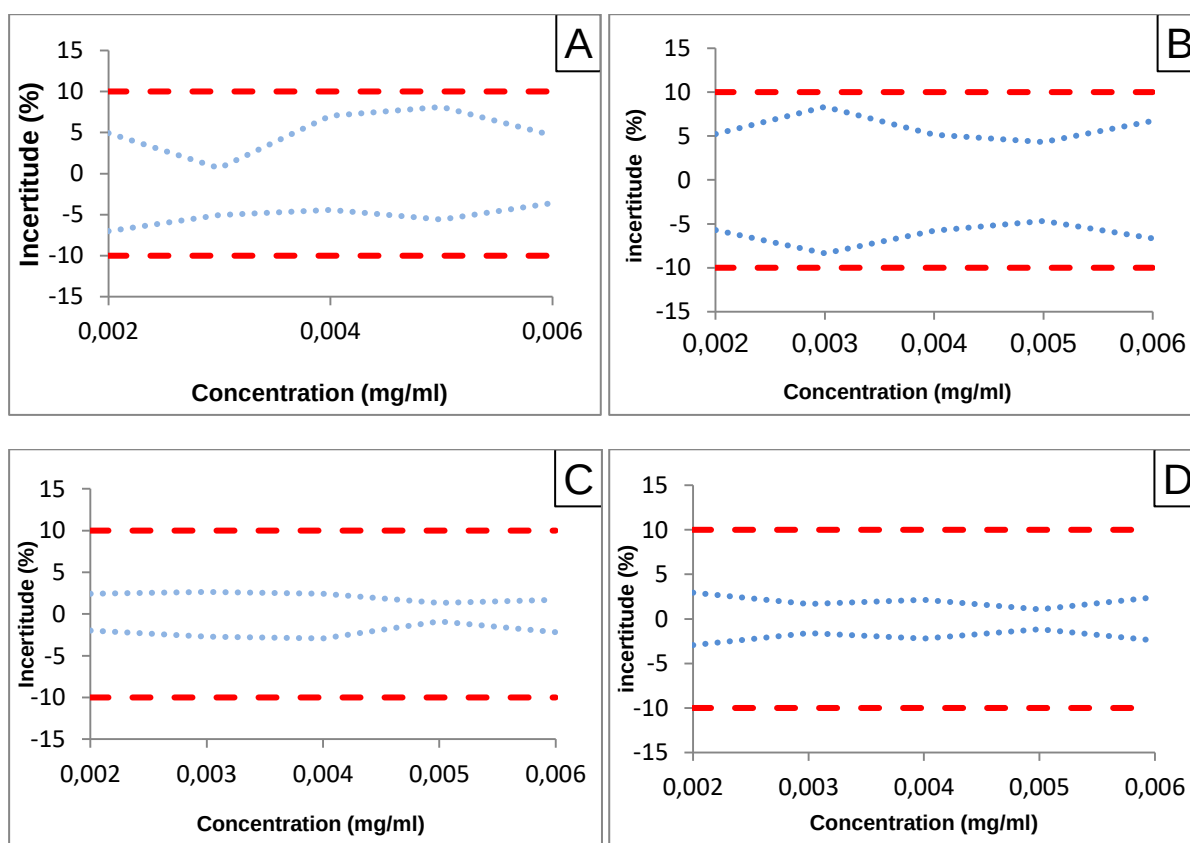


Figure III-27 : Profil d'incertitude du dosage des (PDE-5) par UPLC-DAD dans une matrice pharmaceutique. (A : Sildénafil, B : Vardénafil, C : Udénafil et D : Tadalafil), (Fonction de réponse : linéaire simple), les limites d'acceptabilité définies à 10%

## V.2. Justesse

La justesse est un critère considérable dans la validation analytique, il évalue l'erreur systématique d'une méthode analytique [101]. Elle est représentée par les biais relatifs, qui sont déterminés à partir des concentrations retrouvées. Les biais relatifs obtenus pour l'ensemble des substances sont inférieurs à 2 % (Tableau III-21). En considérant ces résultats, la justesse de la méthode est satisfaisante.

## V.3. Fidélité

La Fidélité est une indication de l'erreur aléatoire [101]. Elle a été estimée à deux niveaux à savoir la répétabilité et la fidélité intermédiaire, en considérant chaque niveau de concentration utilisé en validation.

Le Tableau III-21 résume les coefficients de variation de répétabilité et de la précision intermédiaire. Les résultats n'excèdent pas la valeur de 1.4 %, ils ont un rapport de Horwitz maximal inférieur à 0.5 [159]. Ces valeurs indiquent une homogénéité des échantillons de validation, par conséquent, une fidélité acceptable de la méthode développée.

Tableau III-21 : Résultats de la fidélité et la justesse pour une méthode de dosage des PDE-5

| Substance  | Niveau de concentration (µg/ml) | Justesse  |              | Fidélité         |                            |
|------------|---------------------------------|-----------|--------------|------------------|----------------------------|
|            |                                 | Biais (%) | Recouvrement | Répétabilité (%) | Fidélité intermédiaire (%) |
| Sildénafil | 0,002                           | -1,04     | 98,96        | 0,67             | 0,93                       |
|            | 0,003                           | -2,15     | 97,85        | 0,59             | 0,59                       |
|            | 0,004                           | 1,29      | 101,29       | 0,54             | 0,90                       |
|            | 0,005                           | 1,25      | 101,25       | 1,34             | 1,34                       |
|            | 0,006                           | 0,55      | 100,55       | 1,22             | 1,22                       |
| Vardenafil | 0,002                           | -0,24     | 99,76        | 0,78             | 0,86                       |
|            | 0,003                           | -0,02     | 99,98        | 1,15             | 1,30                       |
|            | 0,004                           | -0,33     | 99,67        | 1,08             | 1,08                       |
|            | 0,005                           | -0,18     | 99,82        | 0,57             | 0,69                       |
|            | 0,006                           | 0,04      | 100,04       | 0,55             | 1,20                       |
| Udenafil   | 0,002                           | 0,57      | 100,57       | 0,76             | 1,00                       |
|            | 0,003                           | -1,98     | 98,02        | 0,59             | 0,72                       |
|            | 0,004                           | -0,47     | 99,53        | 0,39             | 0,84                       |
|            | 0,005                           | -0,28     | 99,72        | 0,30             | 0,97                       |
|            | 0,006                           | -0,89     | 99,11        | 0,39             | 0,55                       |
| Tadalafil  | 0,002                           | -1,02     | 98,98        | 0,67             | 0,69                       |
|            | 0,003                           | 1,98      | 101,98       | 0,64             | 0,64                       |
|            | 0,004                           | 0,61      | 100,61       | 0,31             | 0,93                       |
|            | 0,005                           | 0,14      | 100,14       | 1,86             | 1,86                       |
|            | 0,006                           | 0,37      | 100,37       | 0,57             | 0,60                       |

#### V.4. Profil d'incertitude

Les intervalles de tolérance ont été établis selon la méthode de Mee [114], les valeurs de  $\beta$  et  $\gamma$  ont été fixés à 95 % et 95 % respectivement. Les limites d'incertitude calculées sont exprimées en valeurs relatives (Tableau III-22). D'après les résultats du Tableau, la méthode a été validée avec succès pour le dosage des quatre substances, étant donné que valeurs des limites d'incertitude relative ne dépassent pas limite d'acceptations de  $\pm 10$  %.

Les profils ainsi obtenus Figure III-27, montrent qu'aucune limite d'incertitude n'a dépassé les limites d'acceptabilité  $\pm 10\%$ . Cet outil décisionnel déclare la validité de la méthode.

Tableau III-22 : Résultats de la validation analytique du dosage des (PDE-5) par UPLC-DAD dans une matrice pharmaceutique en utilisant le profil d'incertitude

| Paramètres estimé                  | Niveau de Concentration | Sildénafil   | Vardénafil  | Udénafil      | Tadalafil     |
|------------------------------------|-------------------------|--------------|-------------|---------------|---------------|
| Biais (%)                          | 1                       | -1.05        | -0.23       | 0.22          | 0             |
|                                    | 2                       | -2.18        | -0.01       | -0.03         | 0.03          |
|                                    | 3                       | 1.30         | -0.32       | -0.25         | -0.02         |
|                                    | 4                       | 1.26         | -0.17       | 0.22          | -0.04         |
|                                    | 5                       | 0.53         | 0.037       | -0.22         | 0             |
| Répétabilité (RSD%)                | 1                       | 0.68         | 0.78        | 0.17          | 0.37          |
|                                    | 2                       | 0.58         | 1.15        | 0.40          | 0.25          |
|                                    | 3                       | 0.54         | 1.08        | 0.28          | 0.25          |
|                                    | 4                       | 1.30         | 0.57        | 0.22          | 0.07          |
|                                    | 5                       | 1.19         | 0.55        | 0.12          | 0.27          |
| Fidélité intermédiaire (RSD%)      | 1                       | 1.02         | 0.86        | 0.41          | 0.45          |
|                                    | 2                       | 0.58         | 1.30        | 0.43          | 0.26          |
|                                    | 3                       | 0.95         | 1.08        | 0.43          | 0.34          |
|                                    | 4                       | 1.30         | 0.69        | 0.22          | 0.22          |
|                                    | 5                       | 1.19         | 1.20        | 0.38          | 0.38          |
| Limites d'incertitude relative (%) | 1                       | [-3.6, 1.5]  | [-2.4, 1.9] | [-1.98, 2.42] | [-2.94, 2.94] |
|                                    | 2                       | [-3.5, -0.8] | [-3.3, 3.3] | [-2.72, 2.65] | [-1.60, 1.67] |
|                                    | 3                       | [-1.5, 3.0]  | [-2.9, 2.2] | [-2.92, 2.42] | [-2.21, 2.15] |
|                                    | 4                       | [-1.9, 4.4]  | [-2.0, 1.7] | [-0.88, 1.33] | [-1.16, 1.07] |
|                                    | 5                       | [-2.1, 3.2]  | [-5.2, 5.3] | [-2.16, 1.71] | [-2.42, 2.42] |
| Incertitude élargie relative       | 1                       | 5.97         | 5.46        | 2.20          | 2.94          |
|                                    | 2                       | 2.84         | 8.34        | 2.68          | 1.64          |
|                                    | 3                       | 5.72         | 5.47        | 2.67          | 2.18          |
|                                    | 4                       | 6.85         | 4.49        | 1.11          | 1.11          |
|                                    | 5                       | 4.13         | 6.69        | 1.94          | 2.42          |
| Risque (%)                         | 1                       | 0.92         | 0.13        | 0.36          | 0.009         |
|                                    | 2                       | 0.10         | 1.08        | 0.00          | 0.00          |
|                                    | 3                       | 2.37         | 0.27        | 0.07          | 0.008         |
|                                    | 4                       | 1.48         | 0.08        | 0.00          | 0.14          |
|                                    | 5                       | 0.52         | 4.14        | 0.42          | 0.02          |
| Décision                           |                         | Valide       | Valide      | Valide        | Valide        |

### **V.5. Limite de quantification**

La limite de quantification est la plus faible quantité de substance analysée dans des conditions expérimentales bien définies [160]. Elle a été estimée en utilisant la relation suivante :

$$LQ = 10 \times \frac{S_{a0}}{a_1} \quad \text{Eq.III-8}$$

avec

$S_{a0}$  : l'écart type de la réponse ;

$a_1$  : la pente de la courbe d'étalonnage.

Tableau III-23 : Valeurs estimées de la Limite de Quantification pour les quatre (PDE-5i)

| <b>Substances</b> | <b>LQ (µg/ml)</b> |
|-------------------|-------------------|
| Sildénafil        | 0.00034           |
| Vardénafil        | 0.00093           |
| Udénafil          | 0.00218           |
| Tadalafil         | 0.00115           |

Le Tableau III-23, donne un aperçu de la LQ estimée pour chacun des substances considérées.

### **V.6. Linéarité**

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité à obtenir, à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage, des résultats directement proportionnels à la concentration de la substance à examiner dans l'échantillon [101].

Nous avons appliqué l'approche basée sur les intervalles de tolérances absolues (ITA). Ainsi pour qu'une méthode soit démontrée linéaire, il faudrait que les limites de tolérance absolues soient comprises dans les limites d'acceptabilité prédéfinies.

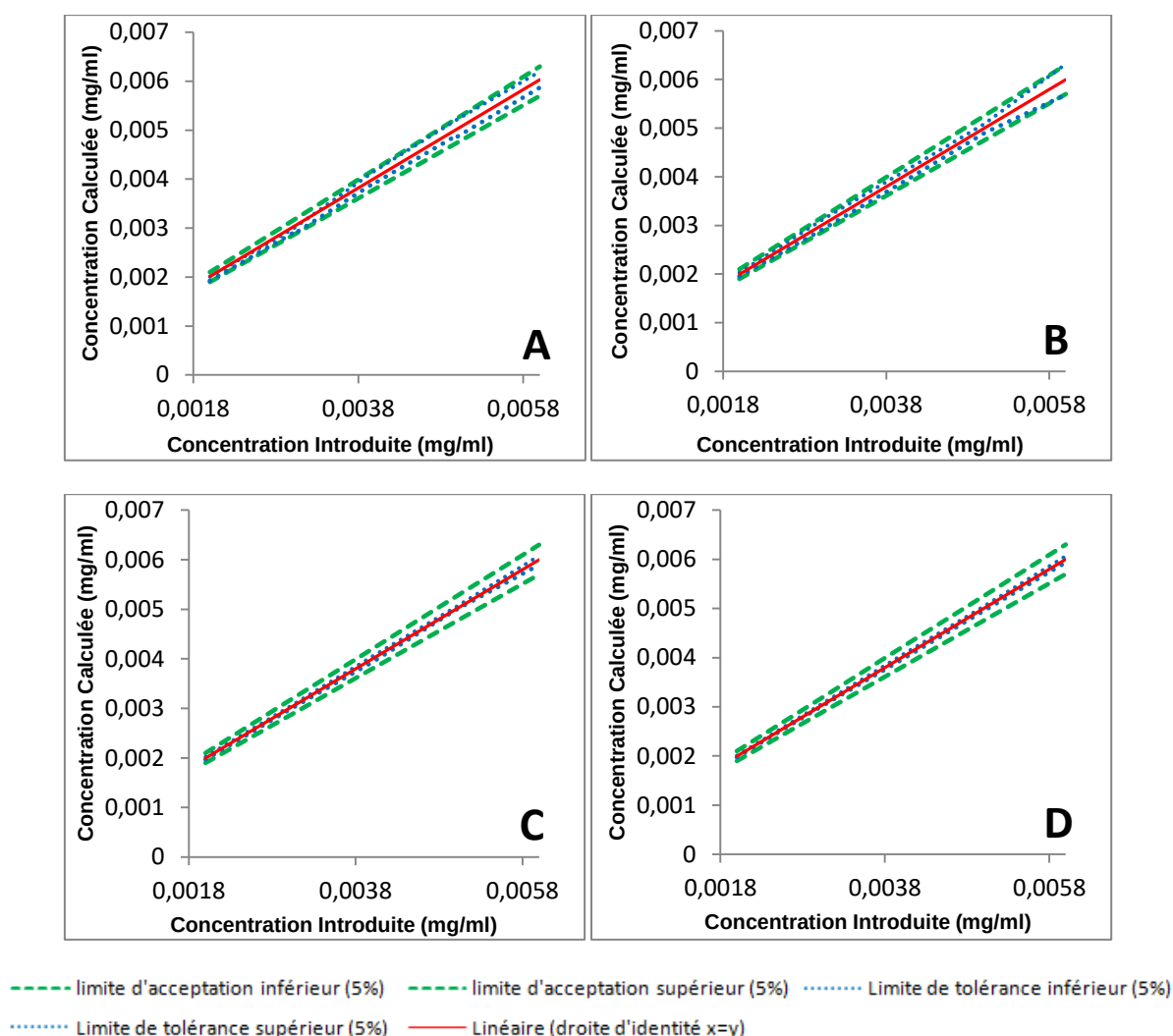


Figure III-28 : Profil de linéarité de la méthode UPLC pour la détermination de : Sildénafil (A)-Vardénafil (B)-Udénafil (C) et Tadalafil (D)

Effectivement, la Figure III-28 montres clairement que les limites de tolérance absolues sont comprises dans les limites d'acceptabilité de  $\pm 5\%$ , donc la linéarité de la méthode UPLC développée est ainsi démontrée.

### V.7. Profil de risque

Le profil de risque a été examiné en considérant chaque niveau de concentration utilisé en validation. C'est un outil récemment recommandé pour acquérir diverses informations capables de comprendre et améliorer les procédures analytiques [121]. Plusieurs fonctions de réponse ont été évaluées pour calculer la probabilité que les futures mesures générées par notre méthode chromatographique outrepassent les limites d'acceptation.

Seules trois fonctions de réponse permettent d'estimer le risque de futures mesures à l'intérieur des limites d'acceptation, à savoir : linéaire simple, linéaire pondéré et le modèle

### Chapitre III. Développement et validation d'une nouvelle méthode UPLC pour lutter contre la contrefaçon des médicaments de trouble d'érection

après une transformation de racine carrée (Figure III-29). Cependant en considérant les deux derniers modèles, le risque d'avoir des mesures futures en dehors des limites d'acceptabilité de 5 % est important pour le vardénafil au niveau de concentration 0.006 mg/mL. Par contre, le modèle de régression linéaire simple est capable de fournir de futures mesures incluses dans la limite d'acceptation. Pour se faire et pour rester dans l'unicité du modèle appliqué, nous avons considéré le modèle de régression linéaire simple pour établir le profil de risque afin de justifier les résultats obtenus avec le profil d'incertitude.

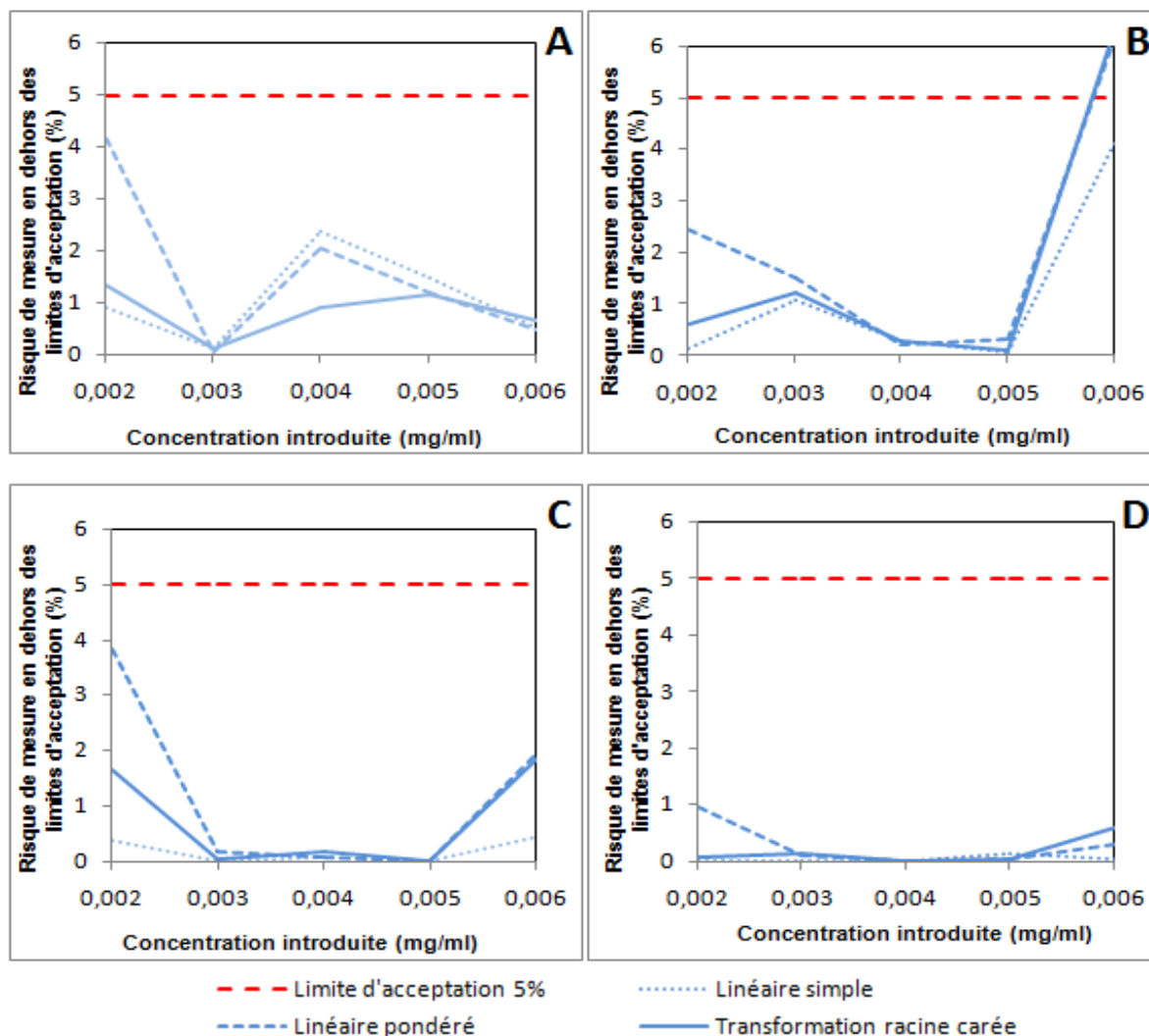


Figure III-29 : Profil de risque de la méthode UPLC-UV pour la détermination des quatre substances inhibitrices de la PDE-5 dans une matrice pharmaceutique pour la limite d'acceptabilité 5%. Le risque maximal toléré a été fixé à 5%. (A : Sildénafil, B : Vardénafil, C : Udénafil et D : Tadalafil)

La Figure III-29 montre que le risque d'avoir de futures mesures en dehors des limites d'acceptabilité de 5% est pratiquement faible pour tous les niveaux de concentration examinés. Ces résultats sont en parfaite concordance avec ceux obtenus par le profil

### Chapitre III. Développement et validation d'une nouvelle méthode UPLC pour lutter contre la contrefaçon des médicaments de trouble d'érection

d'incertitude. En considérant le modèle de régression simple, le risque ne dépasse pas 5% pour les quatre substances, on conclut que la méthode est valide.

#### V.8. Application sur des échantillons réels

La méthode proposée a été appliquée à l'analyse de 23 échantillons réels, y compris des suppléments alimentaires, des médicaments contrefaits et des préparations à base d'herbes destinées pour le Dysfonctionnement érectile. Les préparations de ces échantillons ont été adaptées de manière à ce que les concentrations se situent dans les intervalles de dosage. Les chromatogrammes obtenus dans l'analyse de ses échantillons sont présentés dans l'annexe 1.

Tableau III-24 : Taux de récupération des substances actif dans des échantillons contrefaits

| Echantillons | Type                          | Taux de récupération en principe actif (%) |           |            |          | Impureté inconnu |
|--------------|-------------------------------|--------------------------------------------|-----------|------------|----------|------------------|
|              |                               | Sildénafil                                 | Tadalafil | Vardenafil | Udénafil |                  |
| M1           | Comprimé                      | 147                                        | -         | -          | -        | -                |
| M2           | Comprimé                      | 392                                        | -         | -          | -        | -                |
| M3           | Comprimé                      | <1                                         | -         | -          | -        | +1               |
| M4           | Comprimé                      | 176                                        | -         | -          | -        | -                |
| M5           | Comprimé                      | 113                                        | -         | -          | -        | -                |
| M6           | Comprimé                      | 50                                         | -         | -          | -        | -                |
| M7           | Comprimé                      | 142                                        | -         | -          | -        | -                |
| M8           | Comprimé                      | 156                                        | -         | -          | -        | -                |
| M9           | Comprimé                      | 5                                          | -         | -          | -        | -                |
| M10          | Gélule                        | 52                                         | -         | -          | -        | -                |
| M11          | Gélule                        | <1                                         | <1        | <1         | <1       | -                |
| M12          | Sirop                         | 1mg per g                                  | -         | -          | -        | -                |
| M13          | Sirop                         | 1mg per g                                  | -         | -          | -        | -                |
| CA           | Miel                          | 53 (1dose)                                 | -         | -          | -        | -                |
| CA           | Miel                          | 41 (1dose)                                 | -         | -          | -        | -                |
| CA           | Miel                          | 56 (3dose)                                 | -         | -          | -        | -                |
| CA           | Miel                          | 56 (3dose)                                 | -         | -          | -        | -                |
| CA           | Préparation à base de plantes | -                                          | <1        | <1         | -        | -                |
| CA           | Préparation à base de plantes | <1                                         | -         | -          | -        | -                |
| CA           | Préparation à base de plantes | -                                          | -         | -          | -        | -                |
| C1           | Bonbon                        | <1                                         | -         | -          | -        | -                |
| C2           | Bonbon                        | <1                                         | <1        | -          | -        | +1               |
| C3           | Bonbon                        | -                                          | <1        | -          | -        | +5               |

(M : médicament, CA : complément alimentaire, C : bonbon), (- : non détecté, + : au moins une impureté détecté).

La quantité nominale revendiquée en sildénafil égale à 100 mg, le taux de récupération d'un échantillon conforme est compris entre 98% et 102%.

Les concentrations des 4 (PDE-5i) détectées dans les échantillons contrefaits sont présentées en taux de récupération par rapport aux quantités nominales revendiquées (Tableau III-24). Les résultats ont montré que (91 %) d'échantillons contenaient au moins un des composés ciblés. Parmi les échantillons étudiés, le sildénafil a été retrouvé dans 78 % d'échantillons à des concentrations allant de 0.18 mg à 400 mg par union posologique. De plus, le tadalafil a été retrouvé dans 17 % d'échantillons avec une variation inférieure à 1 mg par échantillons, par contre, la composition d'un seul échantillon était négative.

Dans la plupart des échantillons, la substance sildénafil a été retrouvée, mais, comme le montre le Tableau 8, la plupart des produits étaient d'une manière ou d'une autre non conformes. Par exemple, la teneur en sildénafil doit se situer entre (98,0 et 102,0 pour cent selon la pharmacopée européenne 8.0) par rapport à la quantité nominale déclarée [161]. Pour les échantillons codés M1→M9 (Tableau III-24), la quantité de sildénafil récupérée varie entre (6 %-392 %) par rapport à la quantité nominale revendiquée de 100 mg, alors que pour l'échantillon M6, 98 % de la quantité revendiquer pour 50 mg a été mesurée, de plus, la quantité des autres inhibiteurs mesurée dans ces échantillons était faible voir inexistante. Compte tenu là (sous/sur-estimation) des quantités revendiquées en principe actif, ces échantillons sont toutefois considérés comme non conforme. De même, les autres échantillons codés (M10→M13, CA et C) n'étaient pas conformes, car le contenu des 4 principes actifs était inférieur aux critères d'acceptation.

## VI. Conclusion

Dans ce chapitre, une nouvelle stratégie analytique a été développée et appliquée avec succès pour la caractérisation des médicaments de trouble d'érection contrefait. Des outils chimiométriques, ont été exploités pour mettre au point notre méthode UPLC. Il s'agissait de l'utilisation de la méthodologie des plans d'expérience, le design space ainsi que les profils d'incertitude et de risque pour démontrer que notre procédure chromatographique fonctionne de manière fiable et peut être utilisé conformément à l'usage pour lequel elle est prévue.

En phase de développement, nous avons constaté que la séparation de quatre substances inhibitrices de la Phosphodiesterase type 5 par la méthode UPLC semble être parfaitement modélisé par un modèle polynomial d'ordre deux. En effet, la méthodologie des plans d'expériences a permis de mettre en évidence l'impact de variation du pH de la phase mobile, du pourcentage du modificateur organique ainsi que l'influence du débit de la phase

mobile. De plus, le concept « design space » a permis de définir la zone de robustesse de la méthode.

En ce qui concerne la qualité et la fiabilité des mesures générés, notre technique séparative a fait l'objet d'une validation analytique via deux approches à savoir : le profil d'incertitude et le profil de risque. Les résultats obtenus montrent que l'incertitude des futures mesures ne dépasse pas les limites d'acceptabilité pour un risque inférieur à 5 %. Cela revient à dire que ladite méthode est disponible et apte pour le contrôle routinier des médicaments contrefaits.

**Chapitre IV. Capacité du profil d'incertitude à statuer sur la validité des méthodes destinées à l'analyse des médicaments contrefaits**

### I. Introduction

Le contrôle analytique d'un médicament est indispensable pour démontrer son efficacité pendant toute sa durée de validité. Ainsi, les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de prouver que les méthodes d'analyses employées sont parfaitement valides et fiables non seulement pour déterminer l'usage auquel ils sont prévus, mais également pour évaluer la qualité de tous les échantillons futurs, authentiques ou contrefaits.

Nous consacrons le dernier chapitre à évaluer la capacité du profil d'incertitude à statuer sur la validité des méthodes destinées à l'analyse des médicaments contrefaits. En effet, notre objectif est de voir si cette nouvelle stratégie récemment introduite par notre laboratoire peut éventuellement aider comme outil chimiométrique pour garantir les résultats émanant des méthodes analytiques qui sont au service à la lutte contre la falsification des produits pharmaceutiques.

En résumé, ce chapitre expose les résultats de la validation de quatre techniques analytiques :

- Le dosage de la quinine sulfate dans des comprimés de qualité inférieure par Spectrophotométrie UV-Visible.
- La caractérisation de la Quinine dihydrochloride dans des gouttes orales contrefaites par la Spectroscopie NIR.
- La caractérisation des solvants résiduels dans les médicaments falsifiés par une méthode GC-MS.
- Et la caractérisation d'un médicament à base de sulbactam et céftriaxon de qualité inférieure une méthode HPLC.

### II. Spectrophotométrie UV-Visible pour le dosage de la quinine sulfate dans des comprimés de qualité inférieure

#### II.1. Domaine d'application

Dans un premier temps, nous avons exploité les données d'un exemple de méthode spectrophotométrique « **UV-Visible** » utilisée principalement pour le contrôle de qualité des médicaments de qualité inférieure [162]. La présente étude présente porte sur la validation d'une méthode spectrophotométrique UV-Visible : méthode pour la détermination de la quinine sulfate dans des comprimés de quinine 500 mg.

## **II.2. Plan expérimental de la validation**

Dans cet exemple, J. K. Mbinze et al. [162] ont développé une méthode simple et rapide faisant intervenir la spectrophotométrie UV-Visible, conçue pour le contrôle de qualité des médicaments de qualité inférieure. La stratégie analytique est hautement recommandée afin d'avoir une idée générale sur la composition des produits, ainsi, d'analyser leurs empreintes chimiques. Également, cette technique a plusieurs avantages tels que : simplicité, rapidité et surtout la non ou peu d'utilisation des solvants organiques.

La méthode a été validée selon l'approche du SFSTP en utilisant le  $\beta$ -expectation tolérance intervalle pour construire le profil d'exactitude. Le plan expérimental pour l'étalonnage et la validation a été réalisé respectivement comme suit :

$$3 \times 3 \times 3 = 27 \text{ et } 5 \times 3 \times 3 = 45.$$

Le modèle linéaire passant par 0 est le modèle de régression approprié. Le risque a été fixé à 5 %, alors que les limites d'acceptabilité  $\lambda$  ont été fixées à  $\pm 10$  %.

Le Tableau IV-1 regroupe les résultats des paramètres principaux de validation de la méthode.

Tableau IV-1 : Paramètres de validation de la Méthode Spectrophotométrique UV-Visible pour le dosage de la Quinine sulfate dans la forme (comprimé)

| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Biais (%) | Répétabilité (%) | Fidélité intermédiaire (%) |
|------------------------------------|-----------|------------------|----------------------------|
| 2                                  | 0.26      | 1.41             | 1.41                       |
| 4                                  | 1.58      | 1.11             | 1.42                       |
| 6                                  | 0.36      | 0.99             | 1.07                       |
| 8                                  | 0.75      | 0.73             | 0.73                       |
| 10                                 | 0.33      | 0.53             | 0.83                       |

## **II.3. Résultats et discussion**

Le profil d'incertitude est un outil décisionnel graphique à la fois simple et efficace dont l'objectif principal est surtout de rassembler deux concepts importants à savoir la validation analytique et l'incertitude de mesure. C'est un outil qui utilise la notion de l'incertitude basée sur l'erreur totale pour évaluer la performance des méthodes analytiques. Il stipule que pour qu'une méthode soit valide si est seulement si les limites d'incertitude (L, U) s'insère totalement dans les limites d'acceptation  $(-\lambda, \lambda)$ .

## Chapitre IV. Capacité du profil d'incertitude à statuer sur la validité des méthodes destinées à l'analyse des médicaments contrefaits

A partir des données du plan expérimental et moyennant différents valeurs de  $\beta$ -content, les limites d'incertitude ont été estimées ainsi que leurs profils correspondant ont été construit.

Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau IV-2. Les profils d'incertitude obtenus est illustré sur la Figure IV-1. Comme on peut le voir à partir des résultats, la méthode est valable, puisque les différentes limites d'intervalles d'incertitude ne dépassent pas les limites d'acceptation ( $\lambda = 10\%$ ) pour toutes les proportions considérées :  $\beta = 66.7, 90$  et  $95\%$ . Tout aussi important, on constate que les valeurs d'incertitude élargie estimée par le profil d'incertitude montrent toujours des valeurs plus importantes que celle estimée par le profil d'exactitude Tableau IV-3.

Tableau IV-2 : Résultats de validation de la méthode Spectrophotométrique UV-Visible pour la détermination de la Quinine sulfate (comprimé) le profil d'incertitude ( $\beta=66.7\%$  et  $90\%$ ,  $\gamma=95\%$ ). (Limite d'acceptabilité  $\lambda = 10\%$ )

| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | B, $\gamma$ -Content tolérance intervalle |           |                                 |           |                                 |           |
|------------------------------------|-------------------------------------------|-----------|---------------------------------|-----------|---------------------------------|-----------|
|                                    | ( $\beta=66.7$ et $\gamma=95\%$ )         |           | ( $\beta=90$ et $\gamma=95\%$ ) |           | ( $\beta=95$ et $\gamma=95\%$ ) |           |
|                                    | Limite d'incertitude (%)                  |           | Limite d'incertitude (%)        |           | Limite d'incertitude (%)        |           |
|                                    | Inférieur                                 | Supérieur | Inférieur                       | Supérieur | Inférieur                       | Supérieur |
| 2                                  | -4,0766                                   | 4,0966    | -6,8648                         | 6,8848    | -8,1396                         | 8,1596    |
| 4                                  | -4,6027                                   | 4,7227    | -7,7653                         | 7,8853    | -9,2063                         | 9,3263    |
| 6                                  | -3,3512                                   | 3,3912    | -5,645                          | 5,685     | -6,692                          | 6,732     |
| 8                                  | -2,0558                                   | 2,1758    | -3,4993                         | 3,6193    | -4,1593                         | 4,2793    |
| 10                                 | -2,5748                                   | 2,6348    | -4,3387                         | 4,3987    | -5,1416                         | 5,2016    |

Il convient d'être très prudent avec de telle démarche, car, l'augmentation de ces valeurs provoque un élargissement de l'intervalle d'incertitude quitte à avoir la confirmation à posteriori que certains effets d'incertitude négliger par l'approche de l'erreur totale. Cette augmentation est en mesure d'assurer la déviation de l'intervalle d'incertitude à l'intérieur des limites d'acceptabilité comme l'expose la Figure IV-1.

Tableau IV-3 : Valeurs d'incertitude élargie de la méthode Spectrophotométrique UV-Visible pour la détermination de la Quinine sulfate

| Concentration<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | $\beta$ -Expectation<br>tolérance intervalle<br>( $\beta=95\%$ ) | Incrtitude élargie (%)                    |                                 |                                 |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                                       |                                                                  | B, $\gamma$ -Content tolérance intervalle |                                 |                                 |
|                                       |                                                                  | ( $\beta=66.7$ et<br>$\gamma=95\%$ )      | ( $\beta=90$ et $\gamma=95\%$ ) | ( $\beta=95$ et $\gamma=95\%$ ) |
| 2                                     | 2,78                                                             | 4,0866                                    | 6,8748                          | 8,1496                          |
| 4                                     | 3,12                                                             | 4,6627                                    | 7,8253                          | 9.2663                          |
| 6                                     | 2,28                                                             | 3,3712                                    | 5,665                           | 6,732                           |
| 8                                     | 1,54                                                             | 2,1158                                    | 3,5593                          | 4,2193                          |
| 10                                    | 1,86                                                             | 2,6048                                    | 4,3687                          | 5,1716                          |

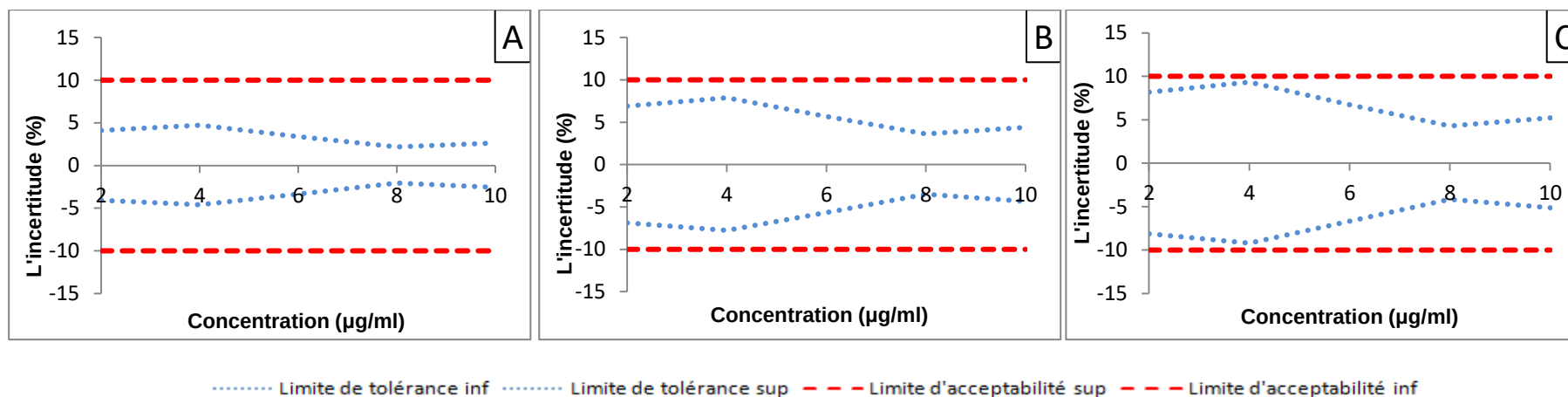


Figure IV-1 : Profil d'incertitude de la méthode de détermination de la Quinine sulfate (comprimé) (A)  $\beta=66.7$  et  $\gamma=95\%$ , (B)  $\beta=90\%$  et  $\gamma=95\%$  et (C)  $\beta=90\%$  et  $\gamma=95\%$ . (Limite d'acceptabilité  $\lambda = \pm 10\%$ )

### **III. Spectrophotométrie NIR pour caractériser la Quinine dihydrochloride dans des gouttes orales**

#### **III.1. Domaine d'application**

De plus en plus utilisée dans le secteur pharmaceutique, la Spectroscopie proche infrarouge est l'une des méthodes primaires utilisées dans la lutte contre la contrefaçon des médicaments, elle présente plusieurs avantages à savoir : l'analyse rapide, non destructive et ne nécessite pas d'étape de préparation. Compte tenu de ces avantages, Mbinze et al.[163] propose le développement et la validation d'une méthode NIR capable de déterminer et quantifier la Quinine dihydrochloride dans des solutions de gouttes orales à 20% (P/V).

#### **III.2. Plan expérimental de la validation**

Le modèle prédictif NIR a été validé par l'approche de l'erreur totale en se basant sur le profil d'exactitude. L'évaluation des critères de la validation a été réalisée suivant un plan expérimental pour l'étalonnage et la validation comme suit :  $3 \times 3 \times 3 = 27$  et  $5 \times 3 \times 3 = 45$ .

La régression des moindres carrés partiels a été utilisée pour générer le modèle prédictif adéquat. La méthode a été validée avec l'approche «erreur totale» dans l'intervalle de concentration de 50 % à 150 % de la valeur nominale, la valeur de  $\beta$ -expectation a été choisie égale à 95%, alors que les limites d'acceptabilité  $\lambda$  sont fixées à  $\pm 10\%$ . De plus, Les résultats des paramètres principaux de validation de la méthode sont résumés dans le Tableau IV-4.

Tableau IV-4 : Paramètres de validation de la Méthode spectroscopique NIR pour le dosage de la Quinine dihydrochloride

| <b>Concentration (µg/ml)</b> | <b>Biais (%)</b> | <b>Répétabilité (%)</b> | <b>Fidélité intermédiaire (%)</b> |
|------------------------------|------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| 50                           | -0.19            | 1.12                    | 1.36                              |
| 75                           | 0.05             | 0.63                    | 0.76                              |
| 100                          | 1.63             | 1.24                    | 1.24                              |
| 125                          | 0.37             | 0.29                    | 1.33                              |
| 150                          | -0.98            | 0.79                    | 0.82                              |

### III.3. Résultats et discussion

Afin de statuer sur la validité de la méthode NIR pour la caractérisation de la Quinine dihydrochloride dans des solutions de gouttes orales, nous avons appliqué l'approche du profil d'incertitude. Ainsi, la validité de la méthode a été vérifiée moyennant différentes valeurs de  $\beta$ -content.

Les limites supérieures et inférieures d'incertitude calculées selon la méthode de Mee et exprimées en valeur relative (%) sont présentées sur la Figure IV-2 en fonction des concentrations introduites.

Comme on peut le voir à partir des résultats (Tableau IV-5), la méthode a été validée avec succès, étant donné que les intervalles d'incertitude sont inclus dans les limites d'acceptation  $\lambda = 10\%$  pour tous les niveaux de concentration testés.

À partir des résultats du Tableau IV-6, on remarque que les incertitudes élargies relatives ne dépassent pas les limites d'acceptabilité fixées à 10 % pour chaque niveau de concentration.

Remarquons que l'augmentation importante des valeurs d'incertitude (Tableau IV-6) provoque un élargissement de l'intervalle d'incertitude, mais sans qu'il dépasse les limites d'acceptabilité.

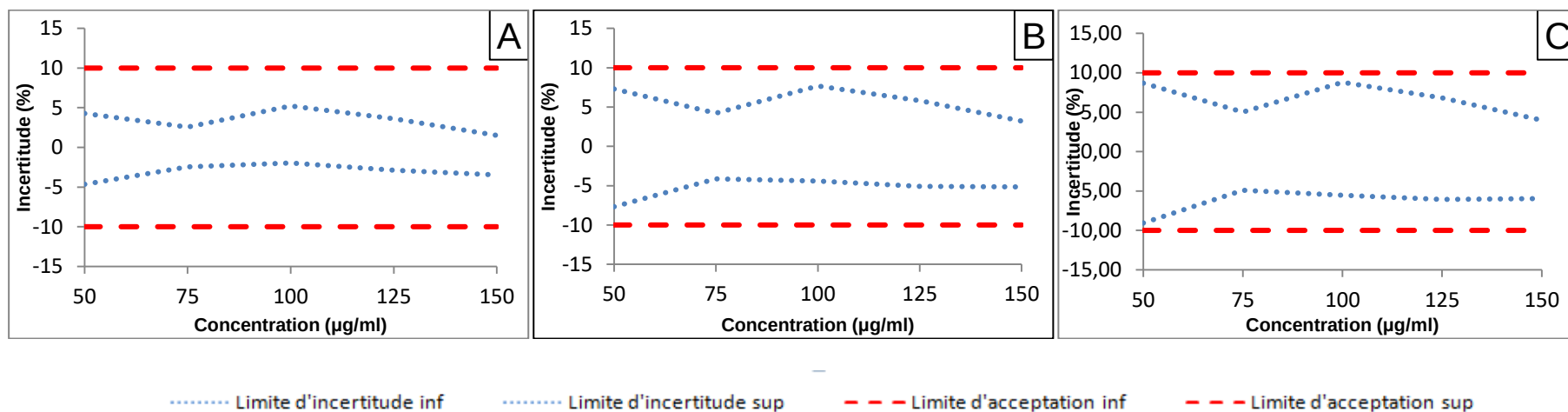
Tableau IV-5 : Résultats de validation de la méthode de détermination de la Quinine dihydrochloride par le profil d'incertitude ( $\beta=66.7\%$ , 90, 95%,  $\gamma=95\%$ ).

(Limite d'acceptabilité  $\lambda= 10\%$ )

| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | B, $\gamma$ -Content tolérance intervalle |           |                                 |           |                                 |           |
|------------------------------------|-------------------------------------------|-----------|---------------------------------|-----------|---------------------------------|-----------|
|                                    | ( $\beta=66.7$ et $\gamma=95\%$ )         |           | ( $\beta=90$ et $\gamma=95\%$ ) |           | ( $\beta=95$ et $\gamma=95\%$ ) |           |
|                                    | Limites de tolérance (%)                  |           | Limite d'incertitude (%)        |           | Limite d'incertitude (%)        |           |
|                                    | Inférieur                                 | Supérieur | Inférieur                       | Supérieur | Inférieur                       | Supérieur |
| 50                                 | -4,6542                                   | 4,2742    | -7,6844                         | 7,3044    | -9.07                           | 8.69      |
| 75                                 | -2,4431                                   | 2,5431    | -4,1355                         | 4,2355    | -4.91                           | 5.01      |
| 100                                | -1,9639                                   | 5,2239    | -4,4159                         | 7,6759    | -5.54                           | 8.80      |
| 125                                | -2,8806                                   | 3,6206    | -5,0773                         | 5,8173    | -6.08                           | 6.82      |
| 150                                | -3,4737                                   | 1,5137    | -5,1725                         | 3,2125    | -5.95                           | 3.99      |

Tableau IV-6 : Valeurs d'incertitude élargie de la méthode de détermination de la Quinine dihydrochloride

| Concentration<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | $\beta$ -Expectation<br>tolérance intervalle<br>( $\beta=95\%$ ) | Incertitude élargie (%)                   |                                 |                                 |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                                       |                                                                  | B, $\gamma$ -Content tolérance intervalle |                                 |                                 |
|                                       |                                                                  | ( $\beta=66.7$ et<br>$\gamma=95\%$ )      | ( $\beta=90$ et $\gamma=95\%$ ) | ( $\beta=95$ et $\gamma=95\%$ ) |
| 2                                     | 2.95                                                             | 4,4642                                    | 7,4944                          | 8.88                            |
| 4                                     | 1.65                                                             | 2,4931                                    | 4,1855                          | 4.96                            |
| 6                                     | 2.62                                                             | 3,5939                                    | 6,0459                          | 7.17                            |
| 8                                     | 3.06                                                             | 3,2506                                    | 5,4473                          | 6.45                            |
| 10                                    | 1.74                                                             | 2,4937                                    | 4,1925                          | 4.97                            |



## **IV. Caractérisation des solvants résiduels dans les médicaments contrefaits par une méthode GC-MS**

### **IV.1. Domaine d'application**

L'analyse des solvants résiduels dans les préparations pharmaceutiques est un élément important du contrôle de la qualité des médicaments. En général, une analyse quantitative utilisant la chromatographie en phase gazeuse est utilisée afin de vérifier les limites en solvants résiduels imposées par les autorités compétentes. Deconinck et al. [50] propose le développement et la validation d'une méthode CG/MS pour la détection et la quantification de solvants résiduels dans les comprimés et gélules contrefaits.

### **IV.2. Plan expérimental de la validation**

La validation de la méthode a été effectuée conformément aux exigences de la directive ISO17025 en utilisant l'erreur totale approche. Le plan expérimental pour l'étalonnage et la validation a été réalisé respectivement comme suit :  $3 \times 3 \times 3 = 27$  et  $3 \times 3 \times 3 = 27$ .

La régression linéaire par la méthode des moindres carrés et la linéarité a été confirmée dans un intervalle de concentrations allant de 0,5 à 10 ppm, couvrant la plage dans laquelle l'analyse du solvant résiduel est habituellement effectuée. Les limites d'acceptabilité  $\lambda$  sont fixées à  $\pm 10\%$ .

Le Tableau IV-7 regroupe les résultats des paramètres principaux de validation de la méthode. Toutes ces données ont été exploitées pour estimer l'incertitude de mesure et construire le profil d'incertitude.

Tableau IV-7 : Paramètres de validation de la méthode GC-MS pour la détermination des solvants résiduels

| Solvant                  | Concentration (ppm) | Biais (%) | Répétabilité (%) | Fidélité intermédiaire (%) |
|--------------------------|---------------------|-----------|------------------|----------------------------|
| Éthanol                  | 0.5                 | -1.71     | 0.90             | 2.44                       |
|                          | 1                   | -1.49     | 2.93             | 3.45                       |
|                          | 10                  | 0.01      | 2.49             | 2.49                       |
| Isopropanol              | 0.5                 | 1.31      | 2.39             | 2.64                       |
|                          | 1                   | 0.55      | 1.84             | 1.84                       |
|                          | 10                  | 0.00      | 2.25             | 2.25                       |
| Acétone                  | 0.5                 | -1.64     | 2.18             | 2.24                       |
|                          | 1                   | 0.69      | 1.10             | 1.47                       |
|                          | 10                  | -0.01     | 2.65             | 2.65                       |
| Acétate d'éthyle         | 0.5                 | -3.06     | 2.15             | 2.44                       |
|                          | 1                   | 1.04      | 1.06             | 1.06                       |
|                          | 10                  | -0.02     | 2.32             | 2.32                       |
| Chloroforme              | 0.5                 | -2.38     | 1.43             | 2.03                       |
|                          | 1                   | 0.56      | 2.06             | 2.06                       |
|                          | 10                  | -0.01     | 1.59             | 1.59                       |
| Tétrachlorure de carbone | 0.5                 | 0.21      | 0.95             | 1.35                       |
|                          | 1                   | -0.23     | 1.55             | 1.55                       |
|                          | 10                  | 0.00      | 1.51             | 1.51                       |
| Benzène                  | 0.5                 | -0.73     | 1.00             | 1.42                       |
|                          | 1                   | 1.11      | 1.85             | 1.85                       |
|                          | 10                  | 0.01      | 1.48             | 1.48                       |
| Toluène                  | 0.5                 | -2.14     | 1.25             | 2.31                       |
|                          | 1                   | -0.09     | 2.15             | 2.21                       |
|                          | 10                  | -0.02     | 1.53             | 1.53                       |
| Dichlorométhane          | 0.5                 | -4.75     | 3.56             | 3.62                       |
|                          | 1                   | 1.07      | 1.30             | 1.75                       |
|                          | 10                  | -0.03     | 2.34             | 2.34                       |
| Éthylbenzène             | 0.5                 | -2.57     | 1.76             | 2.54                       |
|                          | 1                   | 0.58      | 2.21             | 2.21                       |
|                          | 10                  | -0.02     | 1.73             | 1.73                       |

### IV.3. Résultats et discussion

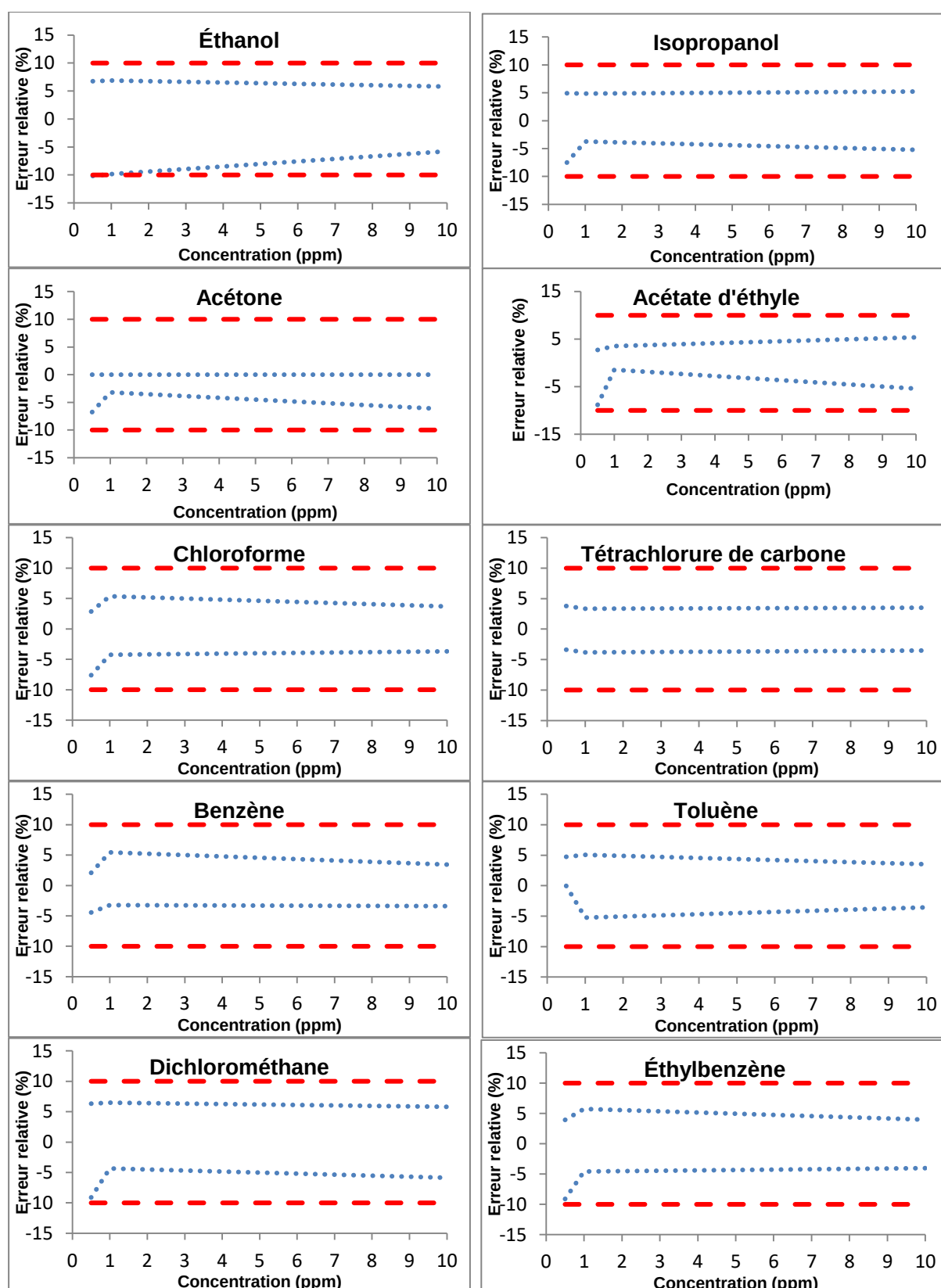
Dans ce travail, nous avons investigué les résultats du profil d'exactitude, en effet, en considérant les résultats du Tableau IV-8 ainsi que les profils d'exactitude Figure IV-3, les limites de tolérance inférieure obtenues pour le solvant éthanol montrent qu'il y a une légère déviation par rapport aux limites d'acceptabilité  $\pm 10$  %. En d'autres termes les deux premiers niveaux de concentration du solvant éthanol montrent un pourcentage élevé contrairement au troisième niveau. Ceci va poser problème puisque cette déviation peut entraîner la non-validité de la méthode. Afin de remédier à ce genre de situation deux solutions sont envisageable : Considérant la classe de solvant éthanol, les solvants de la classe 3 peuvent être considérés comme des solvants de moindre toxicité, ne présentant que peu de dangers pour la santé.

## Chapitre IV. Capacité du profil d'incertitude à statuer sur la validité des méthodes destinées à l'analyse des médicaments contrefaits

La classe 3 ne contient aucun solvant connu pour présenter des risques pour la santé dans le respect des limites autorisées pour les produits à usage pharmaceutique [164, 165]. Par conséquent, les résultats obtenus ici restent assez corrects pour prendre une décision sur la validité de la méthode tout au long du domaine d'application. Cependant, il n'existe pas d'études relatives à une toxicité à long terme ou à un effet carcinogène pour bon nombre de solvants de la classe 3. Pour cela nous passerons à la deuxième solution alternative qui est l'utilisation du profil d'incertitude.

Tableau IV-8 : Résultats de validation de la Méthode GC-MS. ( $\beta$ -Expectation tolérance intervalle ( $\beta=66.7\%$ ))

| Solvant                  | Concentration (ppm) | Incertitude élargie (%) | Limites de tolérance (%) |           |
|--------------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------|-----------|
|                          |                     |                         | Inférieur                | Supérieur |
| Éthanol                  | 0.5                 | 5.32                    | -10.18                   | -6.76     |
|                          | 1                   | 7.26                    | -9.87                    | 6.88      |
|                          | 10                  | 5.19                    | -5.77                    | 5.80      |
| Isopropanol              | 0.5                 | 5.49                    | -7.52                    | 4.91      |
|                          | 1                   | 3.86                    | -3.74                    | 4.85      |
|                          | 10                  | 4.69                    | -5.23                    | 5.22      |
| Acétone                  | 0.5                 | 4.60                    | -6.77                    | 3.49      |
|                          | 1                   | 3.18                    | -3.20                    | 4.58      |
|                          | 10                  | 5.51                    | -6.15                    | 6.13      |
| Acétate d'éthyle         | 0.5                 | 5.02                    | -8.84                    | 2.72      |
|                          | 1                   | 2.23                    | -1.45                    | 3.52      |
|                          | 10                  | 4.83                    | -5.40                    | 5.37      |
| Chloroforme              | 0.5                 | 4.28                    | -7.62                    | 2.86      |
|                          | 1                   | 4.32                    | -4.26                    | 5.37      |
|                          | 10                  | 3.31                    | -3.69                    | 3.68      |
| Tétrachlorure de carbone | 0.5                 | 2.03                    | -3.38                    | 3.79      |
|                          | 1                   | 3.22                    | -3.82                    | 3.35      |
|                          | 10                  | 3.14                    | -3.51                    | 3.50      |
| Benzène                  | 0.5                 | 3.03                    | -4.44                    | 2.08      |
|                          | 1                   | 3.90                    | -3.23                    | 5.45      |
|                          | 10                  | 3.07                    | -3.41                    | 3.43      |
| Toluène                  | 0.5                 | 4.96                    | -0.03                    | 4.76      |
|                          | 1                   | 4.62                    | -5.24                    | 5.06      |
|                          | 10                  | 3.18                    | -3.56                    | 3.52      |
| Dichlorométhane          | 0.5                 | 6.02                    | -9.12                    | 6.34      |
|                          | 1                   | 3.900                   | -4.34                    | 6.48      |
|                          | 10                  | 4.93                    | -5.86                    | 5.80      |
| Éthylbenzène             | 0.5                 | 5.35                    | -9.12                    | 3.93      |
|                          | 1                   | 4.64                    | -4.58                    | 5.74      |
|                          | 10                  | 3.60                    | -4.03                    | 3.99      |



..... Limite de tolérance inf ..... Limite de tolérance sup - - - Limite d'acceptabilité sup - - - Limite d'acceptabilité inf

Figure IV-3 : Profils d'exactitude la méthode GC-MS pour la caractérisation des solvants résiduels. (Limites d'acceptabilité  $\lambda = \pm 10\%$ )

Le Tableau IV-9 présente les résultats de la validation analytique de la Méthode GC-MS pour la caractérisation des solvants résiduels par le profil d'incertitude. Nous avons considéré ici un  $\beta=66.7\%$  et  $\gamma=90\%$  pour les solvants de classe 2 et 3, alors que pour les solvants de classe 1 nous avons choisis un  $\beta=95\%$  et  $\gamma=90\%$ .

Avec l'utilisation du profil d'incertitude, nous avons déterminé le pourcentage des valeurs qui peuvent dévier des limites d'acceptabilité avec une probabilité de 90 % pour les deux types de classe de solvants. Également, les incertitudes élargies relatives obtenues ne dépassent pas les limites d'acceptabilité fixées à 10 % pour chaque niveau de concentration.

Tout aussi important, on constate que l'incertitude de mesure estimée par le profil d'incertitude montre toujours une valeur plus grande que celle estimée par le profil d'exactitude.

À partir de la Figure IV-3 et Figure IV-4, il est clair que les deux approches mènent à la même décision : la validité de la méthode tout au long du domaine d'application, puisque les intervalles de tolérance et d'incertitude ne dépassent pas les limites d'acceptabilité fixées à  $\pm 10\%$ .

## Chapitre IV. Capacité du profil d'incertitude à statuer sur la validité des méthodes destinées à l'analyse des médicaments contrefaits

Tableau IV-9 : Résultats de la validation analytique de la Méthode GC-MS pour la caractérisation des solvants résiduels par le profil d'incertitude

| Solvant                  | Classe Solvant | Alpha-bêta                    | Concentration (ppm) | Incetitude | Limite d'incertitude Inf (%) | Limite d'incertitude Sup (%) | Incetitude élargie (%) |
|--------------------------|----------------|-------------------------------|---------------------|------------|------------------------------|------------------------------|------------------------|
| Éthanol                  | 3              | $\gamma=0,9$<br>$\beta=0,667$ | 0,5                 | 3,16       | -8,03                        | 4,61                         | 6,32                   |
|                          |                |                               | 1                   | 4,81       | -11,12                       | 8,14                         | 9,63                   |
|                          |                |                               | 10                  | 3,04       | -6,08                        | 6,10                         | 6,09                   |
| Isopropanol              | 3              | $\gamma=0,9$<br>$\beta=0,667$ | 0,5                 | 3,56       | -5,82                        | 8,44                         | 7,13                   |
|                          |                |                               | 1                   | 2,25       | -3,95                        | 5,05                         | 4,50                   |
|                          |                |                               | 10                  | 2,75       | -5,50                        | 5,50                         | 5,50                   |
| Acétone                  | 3              | $\gamma=0,9$<br>$\beta=0,667$ | 0,5                 | 2,55       | -6,75                        | 3,47                         | 5,11                   |
|                          |                |                               | 1                   | 0,80       | -0,91                        | 2,29                         | 1,60                   |
|                          |                |                               | 10                  | 3,24       | -6,49                        | 6,47                         | 6,48                   |
| Acétate d'éthyle         | 3              | $\gamma=0,9$<br>$\beta=0,667$ | 0,5                 | 1,98       | -7,02                        | 0,90                         | 3,96                   |
|                          |                |                               | 1                   | 1,29       | -1,55                        | 3,63                         | 2,59                   |
|                          |                |                               | 10                  | 2,83       | -5,69                        | 5,65                         | 5,67                   |
| Chloroforme              | 2              | $\gamma=0,9$<br>$\beta=0,9$   | 0,5                 | 1,55       | -5,49                        | 0,73                         | 3,11                   |
|                          |                |                               | 1                   | 4,24       | -7,93                        | 9,05                         | 8,49                   |
|                          |                |                               | 10                  | 3,27       | -6,56                        | 6,54                         | 6,55                   |
| Tétrachlorure de carbone | 1              | $\gamma=0,9$<br>$\beta=0,95$  | 0,5                 | 3,83       | -7,46                        | 7,88                         | 7,67                   |
|                          |                |                               | 1                   | 3,79       | -7,81                        | 7,35                         | 7,58                   |
|                          |                |                               | 10                  | 3,69       | -7,39                        | 7,39                         | 7,39                   |
| Benzène                  | 1              | $\gamma=0,9$<br>$\beta=0,95$  | 0,5                 | 4,03       | -8,79                        | 7,33                         | 8,06                   |
|                          |                |                               | 1                   | 4,52       | -7,94                        | 10,1                         | 9,05                   |
|                          |                |                               | 10                  | 3,62       | -7,23                        | 7,25                         | 7,24                   |
| Toluène                  | 2              | $\gamma=0,9$<br>$\beta=0,667$ | 0,5                 | 5,34       | 3,18                         | -8.51                        | 4.23                   |
|                          |                |                               | 1                   | 4,71       | 2.80                         | -5.69                        | 5.51                   |
|                          |                |                               | 10                  | 3,15       | 1.87                         | -3.76                        | 3.72                   |
| Dichlorométhane          | 2              | $\gamma=0,9$<br>$\beta=0,667$ | 0,5                 | 7,63       | 4.53                         | -13.8                        | 4.31                   |
|                          |                |                               | 1                   | 4,20       | 0.93                         | -0.80                        | 2.94                   |
|                          |                |                               | 10                  | 4,82       | 2.86                         | -5.75                        | 5.69                   |
| Éthylbenzène             | 3              | $\gamma=0,9$<br>$\beta=0,667$ | 0,5                 | 3,62       | -9,82                        | 4,68                         | 7,25                   |
|                          |                |                               | 1                   | 2,70       | -4,89                        | 5,91                         | 5,40                   |
|                          |                |                               | 10                  | 2,11       | -4,25                        | 4,21                         | 4,23                   |

## Chapitre IV. Capacité du profil d'incertitude à statuer sur la validité des méthodes destinées à l'analyse des médicaments contrefaits

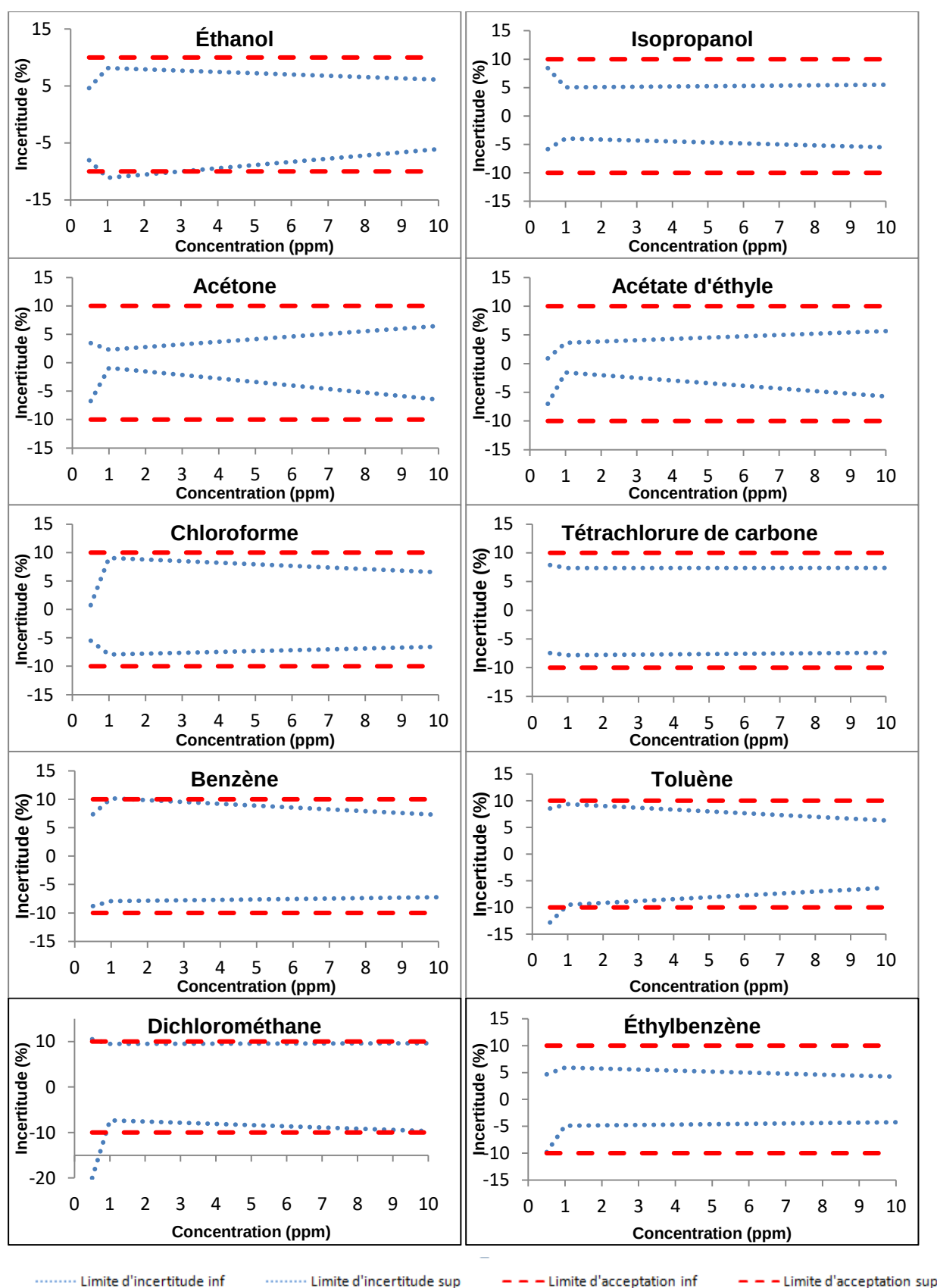


Figure IV-4 : Profils d'incertitude la méthode GC-MS pour la caractérisation des solvants résiduels. (Limites d'acceptabilité  $\lambda = \pm 10\%$ )

**V. Caractérisation de l'association du sulbactam et céftriaxone par une méthode LC afin de combattre la qualité inférieure d'un médicament**

**V.1. Domaine d'application**

Les techniques non séparatives étudiées auparavant ne permettent pas toujours de caractériser la composition d'un médicament contrefait. Il existe en effet des situations où l'utilisation de certaines de ces techniques analytiques peut s'avérer inutile, parce qu'ils sont incapables d'identifier la formule brute d'une substance chimique. Afin de pallier à ce type de problème, il est possible d'utiliser la chromatographie liquide à haute performance comme une technique alternative. À cette fin, J.K. Mbinze et al. [97] propose une nouvelle méthode chromatographique entièrement validée pour la détermination de deux principes actifs couramment utilisés en association, le sulbactam et la céftriaxone, et ce en utilisant le profil d'exactitude.

**V.2. Plan expérimental de la validation**

La méthode de dosage de l'association céftriaxone et sulbactame a été validée selon l'approche de l'erreur totale en se basant sur le profil d'exactitude. L'évaluation des critères de la validation a été réalisée suivant un plan expérimental pour l'étalonnage et la validation comme suit :  $5 \times 3 \times 3 = 45$  et  $5 \times 3 \times 3 = 45$ .

Le modèle de régression linéaire a été utilisé pour générer le modèle prédictive adéquat. La méthode a été validée dans un intervalle de concentration de 160 à 480 µg/ml pour céftriaxone et de 80 à 240 µg/ml pour sulbactame, la valeur de  $\beta$ -expectation a été choisie égale à 95%, alors que les limites d'acceptabilité  $\lambda$  sont fixées à  $\pm 5\%$ . Ainsi, pour construire le profil d'incertitude, les résultats des paramètres de validation ont été considérés (Tableau IV-10).

Tableau IV-10 : Paramètres de validation de la méthode de dosage céftriaxone et sulbactame

| Solvant     | Concentration (µg/ml) | Biais (%) | Répétabilité (%) | Fidélité intermédiaire (%) |
|-------------|-----------------------|-----------|------------------|----------------------------|
| Céftriaxone | 160                   | -0.85     | 0.41             | 0.87                       |
|             | 240                   | -0.10     | 0.48             | 0.54                       |
|             | 320                   | -0.71     | 0.75             | 0.77                       |
|             | 400                   | -2.38     | 0.44             | 0.73                       |
|             | 480                   | -0.84     | 0.26             | 0.56                       |
| Sulbactam   | 80                    | 0.76      | 0.19             | 0.27                       |
|             | 120                   | 1.61      | 0.52             | 0.52                       |
|             | 160                   | 1.14      | 0.68             | 0.74                       |
|             | 200                   | 0.87      | 0.14             | 0.14                       |
|             | 240                   | 0.43      | 0.24             | 0.32                       |

### V.3. Résultats et discussion

Généralement, le choix d'une approche de validation analytique doit être judicieusement effectué, il dépend principalement de l'objectif poursuivi par l'analyste. Étant donné que dans ce travail nous envisageons de mener une étude pour statuer sur la validité d'une méthode analytique par l'application du profil d'incertitude, nous avons estimé pertinent d'investiguer les résultats du profil d'exactitude.

D'après les résultats du Tableau IV-11, on constate que les limites de tolérance obtenues pour une proportion  $\beta=95\%$  sont toujours à l'intérieur des limites d'acceptabilité. Mais, il convient d'être plus prudent pour le niveau bas de la concentration 400  $\mu\text{g/ml}$ , car la limite de tolérance inférieure s'approche de la limite d'acceptabilité (Figure IV-5). Cette petite déviation peut entraîner la validité de la méthode dans un intervalle de concentration compris entre 160 à 320  $\mu\text{g/ml}$  pour le Céftriaxone, cependant, aucune déviation à signaler pour le Sulbactam.

Tableau IV-11 : Résultats de validation du dosage de la céftriaxone et sulbactam par le profil d'exactitude. ( $\beta$  - Expectation tolérance intervalle ( $\beta=95\%$ ))

| Substance   | Concentration Introduite ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Limite de tolérance inférieure (%) | Limite de tolérance supérieure (%) |
|-------------|-----------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Céftriaxone | 160                                           | -4.17                              | 2.46                               |
|             | 240                                           | -1.53                              | 1.32                               |
|             | 320                                           | -2.62                              | 1.20                               |
|             | 400                                           | -4.81                              | 0.04                               |
|             | 480                                           | -2.97                              | 1.29                               |
| sulbactam   | 80                                            | -0.05                              | 1.58                               |
|             | 120                                           | 0.34                               | 2.88                               |
|             | 160                                           | -0.75                              | 3.03                               |
|             | 200                                           | -0.25                              | 1.99                               |
|             | 240                                           | -0.50                              | 1.36                               |

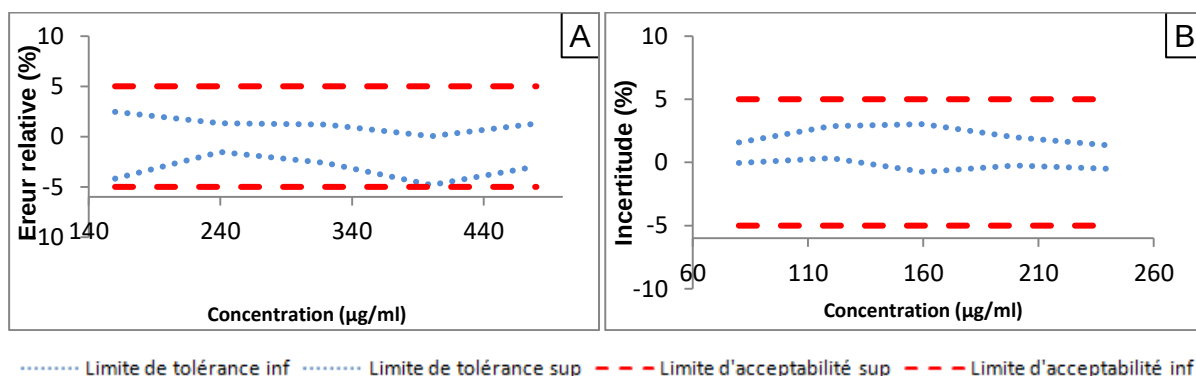


Figure IV-5 : Profils d'exactitude de la méthode du dosage de A : céftriaxone et B : sulbactam. ( $\beta$ -Expectation tolérance intervalle ( $\beta=95\%$ ))

Par rapport aux exemples précédant, l'application du profil d'incertitude a entraîné une déviation importante. En effet, pour une proportion  $\beta = 95 \%$  avec une probabilité  $\gamma = 90 \%$ , il existe une déviation pour trois niveaux de concentration à savoir : 160, 300 et 400  $\mu\text{g/ml}$  pour le céftriaxone. Également une déviation au niveau de la concentration 160  $\mu\text{g/ml}$  a été relevée pour le Sulbactam. Prenons cependant garde au fait que, avec ces caractéristiques la méthode n'est pas valide pour le céftriaxone. Par contre, on peut se réserver à valider la méthode dans un intervalle de concentration compris entre 80 et 140  $\mu\text{g/ml}$  pour le Sulbactam.

D'après l'évaluation des limites de tolérance et d'incertitude par rapport aux limites d'acceptabilité, il est clair que les deux approches mènent à deux décisions différentes. La Figure IV-5 montre que la méthode est valide pour une proportion  $\beta=95 \%$  selon l'approche du profil d'exactitude, alors que l'approche du profil d'incertitude ne conduit pas à la même décision (Figure IV-6 et la Figure IV-7).

D'après l'approche du profil d'incertitude, l'évaluation des valeurs de l'incertitude élargie par rapport aux limites d'acceptabilité permet de prendre une décision sur la validité de la méthode. En considérant les résultats du Tableau IV-12 et du Tableau IV-13, on remarque que les valeurs de l'incertitude élargie ne dépassent pas les limites d'acceptabilité pour chaque niveau de concentration, par conséquent la méthode peut être déclarée valide. En plus, ladite approche permet de déterminer le pourcentage des valeurs qui peuvent dévier des limites d'acceptabilité pour différente proportion et probabilité.

D'où l'intérêt de cette approche qui réside dans sa capacité de combiner deux notions primordiales pour l'accréditation du laboratoire selon la norme ISO 17025.

## Chapitre IV. Capacité du profil d'incertitude à statuer sur la validité des méthodes destinées à l'analyse des médicaments contrefaits

Tableau IV-12 : Résultats de la validation analytique de la Méthode de dosage céftriaxone par le profil d'incertitude

| Solvant     | Alpha-bêta                     | Concentration (µg/ml) | Incertitude | Limite d'incertitude Inf (%) | Limite d'incertitude Sup (%) | Incertitude élargie (%) |
|-------------|--------------------------------|-----------------------|-------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| Ceftriaxone | $\gamma=0,90$<br>$\beta=0,95$  | 160                   | 2.33        | -5.50                        | 3.80                         | 4.65                    |
|             |                                | 240                   | 1.47        | -3.04                        | 2.84                         | 2.94                    |
|             |                                | 320                   | 2.30        | -5.32                        | 3.90                         | 4.61                    |
|             |                                | 400                   | 2.04        | -6.45                        | 1.69                         | 4.07                    |
|             |                                | 480                   | 1.49        | -3.83                        | 2.15                         | 2.99                    |
|             | $\gamma=0,90$<br>$\beta=0,90$  | 160                   | 1.96        | -4.78                        | 3.08                         | 3.93                    |
|             |                                | 240                   | 1.46        | -3.02                        | 2.82                         | 2.92                    |
|             |                                | 320                   | 1.94        | -4.60                        | 3.18                         | 3.89                    |
|             |                                | 400                   | 1.72        | -5.82                        | 1.06                         | 3.44                    |
|             |                                | 480                   | 1.26        | -3.36                        | 1.68                         | 2.52                    |
|             | $\gamma=0,90$<br>$\beta=0,667$ | 160                   | 1.17        | -3.19                        | 1.49                         | 2.34                    |
|             |                                | 240                   | 0.87        | -1.84                        | 1.64                         | 1.74                    |
|             |                                | 320                   | 1.16        | -3.02                        | 1.60                         | 2.31                    |
|             |                                | 400                   | 1.03        | -4.43                        | -0.33                        | 2.05                    |
|             |                                | 480                   | 0.75        | -2.34                        | 0.66                         | 1.50                    |

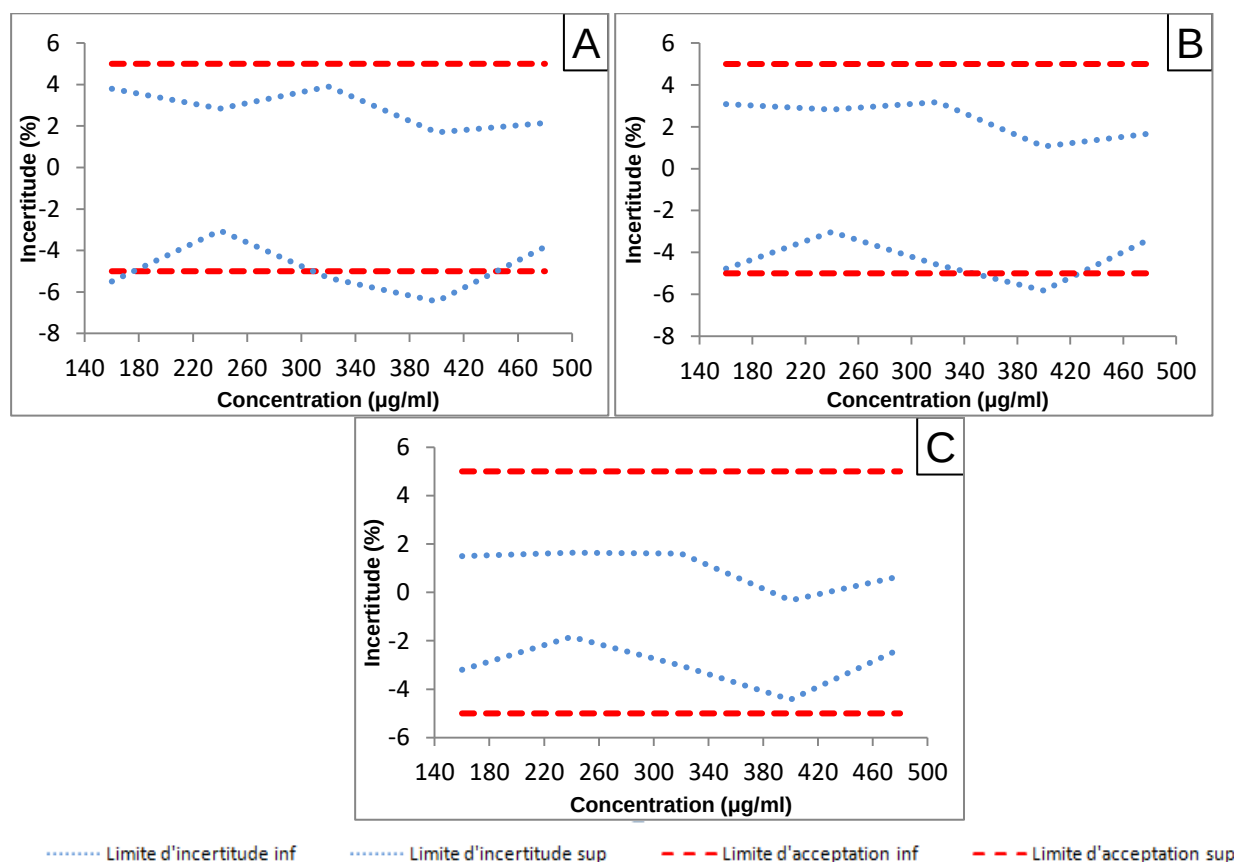


Figure IV-6 ; Profils d'incertitude de la méthode de dosage de céftriaxone. (A :  $\beta=95\%$ - $\gamma=90\%$ , B :  $\beta=90\%$ - $\gamma=90\%$ , C :  $\beta=66.7\%$ - $\gamma=90\%$ ). (Limite d'acceptabilité  $\lambda=\pm 5\%$ )

## Chapitre IV. Capacité du profil d'incertitude à statuer sur la validité des méthodes destinées à l'analyse des médicaments contrefaits

Tableau IV-13 : Résultats de la validation analytique de la Méthode de dosage sulbactam par le profil d'incertitude

| Solvant   | Alpha-bêta                     | Concentration (µg/ml) | Incrtitude | Limite d'incertitude Inf (%) | Limite d'incertitude Sup (%) | Incrtitude élargie (%) |
|-----------|--------------------------------|-----------------------|------------|------------------------------|------------------------------|------------------------|
| Sulbactam | $\gamma=0,90$<br>$\beta=0,95$  | 80                    | 0.77       | -0.77                        | 2.29                         | 1.53                   |
|           |                                | 120                   | 1.27       | -0.93                        | 4.15                         | 2.54                   |
|           |                                | 160                   | 1.97       | -2.81                        | 5.09                         | 3.95                   |
|           |                                | 200                   | 0.34       | 0.18                         | 1.56                         | 0.69                   |
|           |                                | 240                   | 0.91       | -1.39                        | 2.25                         | 1.82                   |
|           | $\gamma=0,90$<br>$\beta=0,90$  | 80                    | 0.65       | -0.54                        | 2.06                         | 1.30                   |
|           |                                | 120                   | 1.07       | -0.54                        | 3.76                         | 2.15                   |
|           |                                | 160                   | 1.67       | -2.19                        | 4.47                         | 3.33                   |
|           |                                | 200                   | 0.29       | 0.29                         | 1.45                         | 0.58                   |
|           |                                | 240                   | 0.77       | -1.11                        | 1.97                         | 1.54                   |
|           | $\gamma=0,90$<br>$\beta=0,667$ | 80                    | 0.39       | -0.01                        | 1.53                         | 0.77                   |
|           |                                | 120                   | 0.64       | 0.34                         | 2.88                         | 1.27                   |
|           |                                | 160                   | 0.99       | -0.84                        | 3.12                         | 1.98                   |
|           |                                | 200                   | 0.17       | 0.53                         | 1.21                         | 0.34                   |
|           |                                | 240                   | 0.46       | -0.48                        | 1.34                         | 0.91                   |

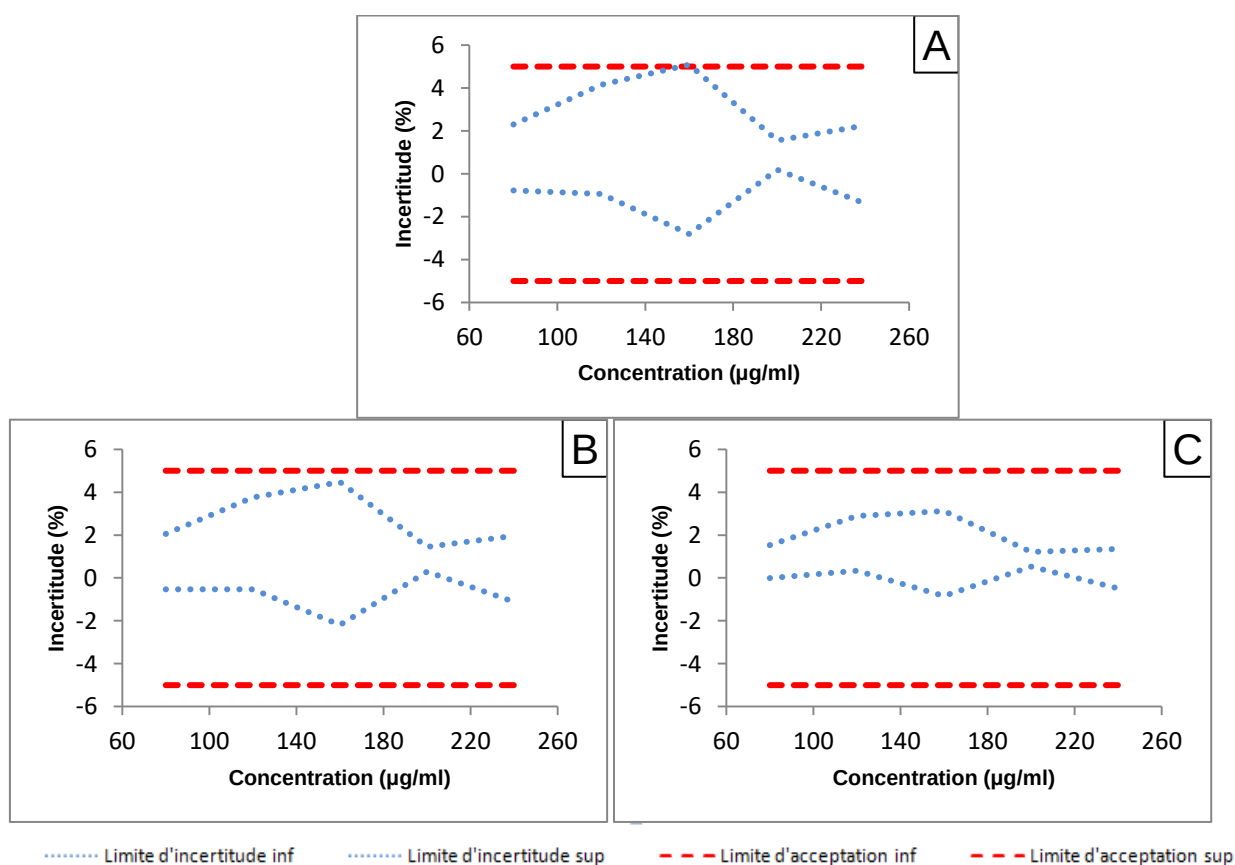


Figure IV-7 : profils d'incertitude de la méthode de dosage de sulbactam. (A :  $\beta=95\%$ - $\gamma=90\%$ , B :  $\beta=90\%$ - $\gamma=90\%$ , C :  $\beta=66.7\%$ - $\gamma=90\%$ ). (Limite d'acceptabilité  $\lambda=\pm 5\%$ )

## **VI. Bilan d'évaluation des différentes approches de la validation**

Auparavant, la validation analytique fut un moyen incontournable pour la conception et l'amélioration de nouvelles procédures analytique, de même, elle fut employée pour justifier la qualité des futurs résultats. Aujourd'hui, c'est une étape insuffisante pour répondre aux exigences réglementaires : pour caractériser les performances des méthodes, ainsi que pour faciliter l'interprétation des résultats, par conséquent, il faut que l'incertitude de mesure soit connue.

Bien qu'il s'avère que l'utilisation des approches métrologiques d'incertitude (approches GUM et EURACHEM) est essentielle, mais parfois, la pratique quotidienne des laboratoires ne résistent pas devant la complexité et le coût élevé de ses approches.

Du coup, la mise en œuvre des deux procédures recourt actuellement à de nouvelles méthodes, certains d'entre eux n'aboutissent pas généralement à des résultats satisfaisants.

Pour contourner ses défis, l'utilisation du profil d'incertitude devient un atout. Appuyer l'usage de ladite stratégie conduite à poser quelques questions :

Comment choisir le modèle de régression le plus adéquat ?

Pouvons-nous estimer les deux composantes d'erreur : aléatoire et systématique par le profil d'incertitude ?

Comment évaluer les critères de la validation analytique avec notre approche ?

Avons-nous assez d'arguments pour expliquer toutes les sources d'incertitude ?

En effet, avec l'approche conventionnelle, l'évaluation de la linéarité se fait principalement avec l'utilisation du test du manque d'ajustement. Effectivement, dans certains cas où la variabilité de l'erreur pure sera nettement inférieure au manque d'ajustement, le rapport de Fisher sera élevé. Par conséquent, le manque d'ajustement et l'erreur pure seront d'un ordre de grandeur différent. Par la suite la linéarité de la méthode ne sera plus vérifiée.

De plus, l'évaluation séparée de la justesse et la fidélité ne servait pas à définir la qualité des futurs résultats, mais il servait pour déterminer les performances d'une méthode analytique. Ses critères représentent simultanément l'erreur systématique et aléatoire. Elles peuvent être caractérisées facilement dans une validation de méthode, lorsque plusieurs répétitions sont à planifier. Cependant, en analyse de routine, une seule mesure est effectuée, donc il est impossible de différencier ses deux types d'erreurs. Par conséquent, la validité de la méthode est liée à la fois à la validité de la fidélité et la justesse.

Il est également important de préciser qu'avec l'approche du profil d'exactitude, l'emploi de plusieurs fonctions réponses est valable, il adopte diverses fonctions, dont la linéarité non requise. La fonction réponse adéquate est celle qui fournit des limites d'exactitudes à l'intérieur des limites d'acceptations. Il va de même avec le profil d'incertitude.

Il convient de souligner que les deux stratégies conduisent à la validité d'une méthode analytique, ils peuvent évaluer la différence entre une mesure ( $x$ ) et sa vraie valeur ( $\mu$ ). En effet, quantifier cet écart c'est tenir compte de l'erreur totale de mesure (erreur systématique + erreur aléatoire). En revanche, l'approche du profil d'exactitude présente des faiblesses pour l'estimation de l'incertitude avec l'intervalle de tolérance d'espérance  $\beta$ .

Pour éviter cela, la procédure du profil d'incertitude a été choisie, comme une alternative pour l'estimation de l'incertitude. Certes une différence dans l'estimation d'incertitude de mesure a été observée, comme on le remarque dans le cas d'étude des exemples précédant, en réalité, cette différence peut être expliquée par deux faits : d'une part, l'approche de l'erreur totale utilise l'intervalle de tolérance d'espérance  $\beta$ , d'autre part, l'approche de l'erreur totale néglige le terme correspondant à la somme des effets due à la déviation dans l'équation d'incertitude Eq. VI.1. devant les deux principales composantes d'incertitude à savoir : l'écart type de reproductibilité et l'incertitude type liée au biais de la méthode.

Par conséquent, l'approche du profil d'incertitude prouve son intérêt d'application, les résultats obtenus ont montré une flexibilité de ladite approche. Ces résultats peuvent être généralisés dans d'autres domaines d'application. Le profil d'incertitude permet donc de suggérer une bonne relation entre la validation analytique et l'estimation d'incertitude. Selon Saffaj et al. [109] le profil d'incertitude surmonte plusieurs défis et examine certaines fonctions supplémentaires sans avoir recours à des expériences complémentaires comparant à d'autres approches pour l'estimation d'incertitude.

## Conclusion Générale

A l'achèvement de ce travail doctoral, nous voulons assurer que derrière ce projet se dissimule un enthousiasme incontestable, celui de fournir aux laboratoires de contrôle qualité une procédure analytique adéquate, associée aux outils chimiométriques, afin de servir comme stratégie infaillible pour lutter contre la contrefaçon des médicaments de trouble de l'érection. A cet égard, nous avons apporté une attention toute particulière aux techniques chromatographiques, car elles sont de par leurs natures, les plus puissantes et les plus robustes pour le contrôle qualité des formes pharmaceutiques.

En collaboration avec le laboratoire national de contrôle des médicaments, nous avons mis au point une nouvelle méthode UPLC, unique en sa catégorie, édifiée de part en part, en déployant la méthodologie des plans d'expérience ainsi que la démarche du Design Space. Notre technique séparative a servi comme instrument capable de détecter les comprimés originaux des comprimés illégaux des différentes molécules d'inhibiteurs de la Phosphodiesterase type cinq (PDE-5i), en particulier, sildénafil, tadalafil, vardénafil et udénafil.

Au premier abord, nous avons conduit le développement de notre méthode UPLC en s'appuyant sur un plan de Plackett-Burman pour délimiter les paramètres les plus influents. Ensuite, un plan de surface de type Box-Behnken est utilisé pour établir les conditions optimales du mode opératoire. Par ailleurs, dans le souci d'aligner les lignes directrices de l'ICH Q8, nous avons instauré le concept « design space (DS) » dans le but de définir la zone de robustesse du domaine expérimental à l'intérieur duquel, aucun changement sévère des niveaux des attribues de Contrôle de Qualité de la méthode ne doit être observé. Il ressort de ce concept DS que les changements délibérés des paramètres critiques de notre méthode à l'intérieur de cet espace de conception, en l'occurrence le pH du tampon, la proportion d'Acétonitrile et le débit, n'ont aucune influence sur la fiabilité de nos mesures. Une haute résolution entre les chromatogrammes des quatre principes actifs et un temps d'analyse inférieur à 1.6 min ont été parvenus au terme de cette phase de développement.

En outre, dans le but d'empêcher tout échec lors de l'instauration de notre procédure chromatographique en phase routine, nous avons entamé une démarche de validation via deux approches pionnières, baptisées profil d'incertitude et profil de risque. Les deux profils ont rendu avec des preuves indiscutables que l'incertitude des futures mesures générées par notre méthode ne dépasse nullement les limites d'acceptabilité pour un risque inférieur à 5%. Cela revient à dire que ladite procédure est apte pour le contrôle routinier des médicaments PDE-5i contrefaits.

Par voie de conséquence, nous avons certifié les résultats obtenus en cycle de validation, d'un bout à l'autre, par l'identification de 23 formulations médicamenteuses illicites de trouble de l'érection, en phase de routine.

D'un autre côté, nous avons poussé dans la seconde partie de ce travail, encore plus loin notre vision pour évaluer le caractère universel du profil d'incertitude et interrogé le statut d'un nouveau concept, plutôt flexible, permettant l'accès à l'incertitude routinière sans parcourir forcément les normes métrologiques coutumières. Cela nous a suggéré de mener une étude comparative avec la stratégie du profil d'exactitude, récemment introduite par la SFSTP. A la lumière des résultats obtenus, nous avons constaté que les décisions prises via le profil d'incertitude concordent à celles prises par le profil d'exactitude. Bien que les deux approches soient comparables il n'en reste pas moins que le profil d'incertitude offre un avantage manifeste et suggère une piste claire en ce qui concerne l'estimation de l'incertitude de mesure. Ainsi, sommes-nous arrivés à mettre à la portée des laboratoires de contrôle des médicaments une stratégie prometteuse qui servira de base pour apprécier la validité des méthodes analytiques qui sont au service de la lutte contre la falsification des produits pharmaceutiques.

En perspective, afin de lutter au mieux contre la falsification des produits pharmaceutiques, nous comptons d'utiliser des nouveaux outils chimiométriques joints à des stratégies analytiques pour mener des investigations rapides, fiables et plus performants. A cet effet, nous voulons exploiter les méthodes statistiques d'analyse des données, exploratoires et prédictives dans le but d'améliorer l'efficacité des laboratoires pharmaceutiques.

## Références Bibliographiques

1. LA LUTTE CONTRE LA CONTREFAÇON DE MÉDICAMENTS : DES ORIGINES À NOS JOURS. 2018; Available from: [https://www.iracm.com/historique/#\\_ftn2](https://www.iracm.com/historique/#_ftn2).
2. Eisend, M. and P. Schuchert-Güler, *Explaining counterfeit purchases: A review and preview*. Academy of Marketing Science Review, 2006. **2006**: p. 1.
3. KRISSI, C., *Contrefaçon des médicaments et stratégies technologiques pour sécuriser la chaîne d'approvisionnement pharmaceutique*, in Département de génie industriel. 2010, Montréal :École Polytechnique
4. HAOND, J., *La lutte contre la contrefaçon : Protection industrielle et securisation par le data matrix*. 2012, Universite henri poincare - nancy 1.
5. *Guidelines for the development of mesures to combat couterfeit drugs*,. Jaunary 1999, World Health Organization Geneva, Switzerland.
6. ROBERT, J., *La contrefaçon des produits de santé dans le monde : moyens de lutte et implication du pharmacien d'officine*, in Département Pharmacie. Avril 2013, université angers.
7. LEEM, *dossier de presse contrefaçon de medicaments*. MAI 2010.
8. Commission, T.E.C., *Amending Directive 2001/83/EC as regards the prevention of the entry into the legal supply chain of medicinal products which are falsified in relation to their identity, history or source*, I. Assessment, Editor. 2008, THE EUROPEAN PARLIAMENT Brussels.
9. Jackson, G., S. Patel, and S. Khan, *Assessing the problem of counterfeit medications in the United Kingdom*. International Journal of Clinical Practice, 2012. **66**(3): p. 241-250.
10. Institute, P.S., *Counterfeit Situation*. 2016.
11. Deisingh, A.K., *Pharmaceutical counterfeiting*. Analyst, 2005. **130**(3): p. 271-279.
12. Amin, A.A. and G.O. Kokwaro, *Antimalarial drug quality in Africa*. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 2007. **32**(5): p. 429-440.
13. Gazzane, H., *Médicaments : 1 Européen sur 5 achète de la contrefaçon*. 2010, LE FIGARO.
14. Julian Harris. Philip Stevens, *Mauvaise gouvernance et contrefaçon de médicaments*. 2008.
15. OECD/EUIPO, *Trade in Counterfeit and Pirated Goods: Mapping the Economic Impact*. 2016, Paris: OECD Publishing.
16. TAVERRITI, C.F., *Trafic de faux médicaments : un crime pharmaceutique?* 2014, Universite de lorraine.
17. OMS. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, La menace croissante des contrefaçons de médicaments*. 2010; Available from: <http://www.who.int/bulletin/volumes/88/4/10-020410/fr/>.
18. ABIJOU, A., *Contrefaçon : 30.000 emplois perdus par an*. 21/05/2014, Leconomiste.
19. CONPIAC, *Etude sur les incidences économiques de la contrefaçon au Maroc Note de synthèse*. Février 2013. p. 16.
20. Al-Qatamin, S., *The evaluation and analysis of counterfeit pharmaceuticals within Jordan*. 2012, Coventry University.
21. Kelesidis, T., et al., *Counterfeit or substandard antimicrobial drugs: a review of the scientific evidence*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007. **60**(2): p. 214-236.
22. *Lutte Contre La Contrefaçon Des Médicaments*. Novembre 2015, SANOFI.
23. Hakimi, H. *CONTREFAÇON : LA FACTURE*. 2006; Available from: [http://www.pharmaceutiques.com/archive/une/art\\_908.html](http://www.pharmaceutiques.com/archive/une/art_908.html).
24. Fortier-Taverriti, C., *Trafic de faux médicaments : un crime pharmaceutique?*, in *FACULTÉ DE PHARMACIE*. 2014, Universite de lorraine.

25. ten Ham, M., *Health Risks of Counterfeit Pharmaceuticals*. Drug Safety, 2003. **26**(14): p. 991-997.
26. OMS. *Médicaments de qualité inférieure et contrefaits*. Novembre 2003; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs275/fr/>.
27. CAIRE, F., *L'organisation de la reponse europeenne face a la contrefaçon de médicaments*. Septembre 2013, Université de lorraine.
28. OMS, *MÉDICAMENTS CONTREFAITS : Guide pour l'élaboration de mesures visant à éliminer les médicaments contrefaits*. 2000, Organisation mondiale de la Santé: Genève, Suisse.
29. LAMBERT, R., *L'importance de l'approche qualité dans la mise en place et la réalisation d'un projet pharmaceutique: exemple d'application des méthodes d'amélioration continue pour affiner la traçabilité des produits sur un site dépositaire pharmaceutique*. 2013. Thèse de doctorat en pharmacie. Faculté de pharmacie. Université de Lorraine.
30. ISIDORI, A., *Fournir un médicament fiable : outils, réglementation et management de la qualité dans la répartition pharmaceutique*, in *Faculte de pharmacie*. 2014, Université de lorraine.
31. BEGERT, L., *Le conditionnement des médicaments : Un élément essentiel de protection des patients.*, in *FACULTE DE PHARMACIE*. 2015, UNIVERSITE DE LORRAINE.
32. Fernandez, F.M., M.D. Green, and P.N. Newton, *Prevalence and Detection of Counterfeit Pharmaceuticals: A Mini Review*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2008. **47**(3): p. 585-590.
33. Venhuis, B.J., et al., *Dose-to-dose variations with single packages of counterfeit medicines and adulterated dietary supplements as a potential source of false negatives and inaccurate health risk assessments*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014. **89**: p. 158-165.
34. Group, E.N.o.F.S.I.D.W., et al., *Guidelines on representative drug sampling*. 2009: United Nations Publications.
35. Dégardin, K., Y. Roggo, and P. Margot, *Forensic intelligence for medicine anti-counterfeiting*. Forensic Science International, 2015. **248**: p. 15-32.
36. Westenberger, B.J., et al., *Quality assessment of internet pharmaceutical products using traditional and non-traditional analytical techniques*. International Journal of Pharmaceutics, 2005. **306**(1): p. 56-70.
37. WHPA, *All you need to know about spurious medicines*. 2015.
38. Newton, P.N., et al., *Poor quality vital anti-malarials in Africa - an urgent neglected public health priority*. Malaria Journal, 2011. **10**(1): p. 352.
39. Custers, D., et al., *Physical profiling and IR spectroscopy: simple and effective methods to discriminate between genuine and counterfeit samples of Viagra® and Cialis®*. Drug Testing and Analysis, 2016. **8**(3-4): p. 378-387.
40. Rodomonte, A.L., et al., *Counterfeit drugs detection by measurement of tablets and secondary packaging colour*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010. **53**(2): p. 215-220.
41. Wilczyński, S., *The use of dynamic thermal analysis to distinguish between genuine and counterfeit drugs*. International Journal of Pharmaceutics, 2015. **490**(1): p. 16-21.
42. Green, M.D., et al., *A colorimetric field method to assess the authenticity of drugs sold as the antimalarial artesunate*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2000. **24**(1): p. 65-70.

43. Mateescu, C., et al., *Spectroscopic and Spectrometric Methods Used for the Screening of Certain Herbal Food Supplements Suspected of Adulteration*. Advanced pharmaceutical bulletin, 2017. **7**(2): p. 251-259.
44. Neuberger, S. and C. Neusüß, *Determination of counterfeit medicines by Raman spectroscopy: Systematic study based on a large set of model tablets*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015. **112**: p. 70-78.
45. Pauline GUINOT, H.R., *Techniques analytiques au service de la lutte contre la falsification des médicaments*, T.D. L'INGENIEUR, Editor. 2017.
46. Ortiz, R.S., et al., *Fingerprinting of sildenafil citrate and tadalafil tablets in pharmaceutical formulations via X-ray fluorescence (XRF) spectrometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012. **58**: p. 7-11.
47. Xu, Q.A., *Ultra-high performance liquid chromatography and its applications*. 2013: John Wiley & Sons.
48. PLARD, J., *Apport de la chimométrie et des plans d'expériences pour l'évaluation de la qualité de l'huile d'olive au cours de différents processus de vieillissement*, in *Laboratoire d'Instrumentation et Sciences Analytiques (LISA )*. 2014, Université Aix Marseille
49. Sherma, J., *Analysis of counterfeit drugs by thin layer chromatography*. Acta Chromatographica, 2007. **19**: p. 5.
50. Deconinck, E., et al., *A validated GC-MS method for the determination and quantification of residual solvents in counterfeit tablets and capsules*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012. **70**: p. 64-70.
51. Shi, Y.-Q., et al., *Establishment of an HPLC identification system for detection of counterfeit steroidal drugs*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. **46**(4): p. 663-669.
52. Gaudio, M.C., et al., *An LC method for the simultaneous screening of some common counterfeit and sub-standard antibiotics: Validation and uncertainty estimation*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. **48**(2): p. 303-309.
53. Lebel, P., et al., *A rapid, quantitative liquid chromatography-mass spectrometry screening method for 71 active and 11 natural erectile dysfunction ingredients present in potentially adulterated or counterfeit products*. Journal of Chromatography A, 2014. **1343**: p. 143-151.
54. De Beer, J.O., et al., *Chromatography in the Detection and Characterization of Illegal Pharmaceutical Preparations*. Journal of Chromatographic Science, 2013. **51**(8): p. 791-806.
55. Sacré, P.-Y., et al., *Development and validation of a ultra-high-performance liquid chromatography-UV method for the detection and quantification of erectile dysfunction drugs and some of their analogues found in counterfeit medicines*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(37): p. 6439-6447.
56. (V.), G., *La Résonance magnétique nucléaire (RMN) DOSY appliquée à l'analyse de faux médicaments et compléments alimentaires*. Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique,, 2011: p. 29-33.
57. Sacré, P.-Y., *Analytical strategies for the detection of counterfeit erectile dysfunction drugs*. 2011, Université de Liege, Belgique.
58. Ma, B., et al., *Rapid analysis of tadalafil in human blood plasma and seminal plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013. **77**: p. 149-157.
59. Blok-Tip, L., et al., *Structure elucidation of sildenafil analogues in herbal products*. Food Additives & Contaminants, 2004. **21**(8): p. 737-748.

60. Venhuis, B.J., et al., *The identification of a nitrosated prodrug of the PDE-5 inhibitor aildenafil in a dietary supplement: A Viagra with a pop.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011. **54**(4): p. 735-741.
61. Venhuis, B.J., et al., *The identification of (–)-trans-tadalafil, tadalafil, and sildenafil in counterfeit Cialis® and the optical purity of tadalafil stereoisomers.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010. **51**(3): p. 723-727.
62. Vaysse, J., et al., *Identification of a novel sildenafil analogue in an adulterated herbal supplement.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012. **59**: p. 58-66.
63. Wollein, U., W. Eisenreich, and N. Schramek, *Identification of novel sildenafil-analogues in an adulterated herbal food supplement.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011. **56**(4): p. 705-712.
64. Gratz, S.R., et al., *Structural characterization of sulfoaildenafil, an analog of sildenafil.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009. **50**(2): p. 228-231.
65. Reepmeyer, J.C. and D.A. d'Avignon, *Structure elucidation of thioketone analogues of sildenafil detected as adulterants in herbal aphrodisiacs.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009. **49**(1): p. 145-150.
66. Reepmeyer, J.C. and J.T. Woodruff, *Use of liquid chromatography–mass spectrometry and a chemical cleavage reaction for the structure elucidation of a new sildenafil analogue detected as an adulterant in an herbal dietary supplement.* Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2007. **44**(4): p. 887-893.
67. Toomey, V.M., J.J. Litzau, and C.L. Flurer, *Isolation and structural characterization of two tadalafil analogs found in dietary supplements.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012. **59**: p. 50-57.
68. Häberli, A., et al., *Isolation and structure elucidation of an interaction product of aminotadalafil found in an illegal health food product.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010. **53**(1): p. 24-28.
69. Lam, Y.-H., et al., *Identification of a novel vardenafil analogue in herbal product.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. **46**(4): p. 804-807.
70. Lee, H.-M., et al., *Separation and structural elucidation of a novel analogue of vardenafil included as an adulterant in a dietary supplement by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy.* Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2011. **54**(3): p. 491-496.
71. Choi, D.M., et al., *Determination of analogs of sildenafil and vardenafil in foods by column liquid chromatography with a photodiode array detector, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectrometry.* Journal of AOAC International, 2008. **91**(3): p. 580-588.
72. Kowalski, B.R., *Chemometrics.* Analytical Chemistry, 1980. **52**(5): p. 112-122.
73. Houda, B., *Apport de la chimiométrie pour la qualimétrie des méthodes analytiques: Mise au point et validation par l'approche de l'erreur totale des méthodes chromatographiques pour le dosage des médicaments.* 2016.
74. WOJCIECHOWSKI, C., *APPORTS DE LA CHIMIOMETRIE A L'INTERPRETATION DES DONNEES DE LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE.* 1998, UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE.
75. Varmuza, K., *Chemometrics in practical applications.* 2012: InTech Rijeka.
76. Parr, M.K. and A.H. Schmidt, *Life cycle management of analytical methods.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018. **147**: p. 506-517.
77. Djang'Eing'A, R.M., *Evaluation des différentes approches pour l'estimation de l'incertitude des mesures analytiques.* 2007.

78. Skoog, D.A. and D.M. West, *Chimie analytique*. 2015: De Boeck Supérieur.
79. ISO, N., *CEI 17025, Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais*. Association Française de Normalisation, 2005. **1**.
80. Feinberg, M., *Labo-Stat: Guide de validation des méthodes d'analyse*. 2012: Éd. Tec & doc.
81. DJANG'EING'A, R.M., *EVALUATION DES DIFFERENTES APPROCHES POUR L'ESTIMATION DE L'INCERTITUDE DES MESURES ANALYTIQUES*. 2006, UNIVERSITÉ DE LIÈGE.
82. VAILLÉ, J. and J. GOUPY, *Construire et interpréter un Plan d'expériences factoriel complet*. Revue MODULAD, 2006. **1**(35).
83. Goupy, J. and L. Creighton, *Introduction aux plans d'expériences-3ème édition-Livre+ CD-Rom*. 2006: Dunod.
84. Tinsson, W., *Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques*. Vol. 67. 2010: Springer Science & Business Media.
85. IHSSANE, B., *Chimiométrie et Contrôle qualité de substances actives dans les formes pharmaceutiques Mise au point et Validation analytique des méthodes développée*. 2010, UNIVERSITE HASSAN II-MOHAMMEDIA.
86. Mason, R.L., R.F. Gunst, and J.L. Hess, *Statistical design and analysis of experiments: with applications to engineering and science*. Vol. 474. 2003: John Wiley & Sons.
87. Dejaegher, B. and Y. Vander Heyden, *Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011. **56**(2): p. 141-158.
88. Goupy, J., *Plans d'expériences*. Technique de l'Ingénieur, 1997. **PE 230**.
89. Deming, S.N., *Multiple-criteria optimization*. Journal of Chromatography A, 1991. **550**: p. 15-25.
90. Kuhn, M., *The desirability Package*. 2016.
91. Bouabidi, A., *Etude Critique des Différentes Approches de Validation des Méthodes Analytiques*. 2014.
92. Guideline, I.H.T., *Q8 (R2) Pharmaceutical Development*. Step 4 Version, 2009.
93. Rozet, E., et al., *Design spaces for analytical methods*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2013. **42**: p. 157-167.
94. HUBERT, C., *Gestion du risque associé au cycle de vie des méthodes analytiques*.
95. Nistor, I., et al., *Implementation of a design space approach for enantiomeric separations in polar organic solvent chromatography*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013. **74**: p. 273-283.
96. Milošević, N., et al., *Design of Experiments–Design Space Approach for Development of Chaotropic Chromatography Method for Determination of Trimetazidine Dihydrochloride and Two Impurities*. Chromatographia, 2017. **80**(4): p. 585-592.
97. Mbinze, J.K., et al., *Application of an innovative design space optimization strategy to the development of LC methods for the simultaneous screening of antibiotics to combat poor quality medicines*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013. **85**: p. 83-92.
98. Organization, W.H., *Assurance de la qualité des produits pharmaceutiques: recueil de directives et autres documents; vol. 1*. 1998.
99. Guideline, I.H.T. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*. in *International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland*. 2005.
100. Michel LAURENTIE, et al., *Guide de validation des méthodes d'analyses*. 28 octobre 2015, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

101. ISO, N., 5725-5: *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 1: Principes généraux et définitions*, 1994.
102. Hubert, P., et al., *Validation des procédures analytiques quantitatives, harmonisation des démarches*. STP Pharma Pratiques, 2003. **13**(3): p. 101-138.
103. Boulanger, B., et al., *An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progresses and limitations*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003. **32**(4): p. 753-765.
104. Hartmann, C., et al., *Validation of bioanalytical chromatographic methods*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1998. **17**(2): p. 193-218.
105. Hartmann, C., et al., *Reappraisal of Hypothesis Testing for Method Validation: Detection of Systematic Error by Comparing the Means of Two Methods or of Two Laboratories*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(24): p. 4491-4499.
106. Fabre, H. and K. Altria, *Validating CE methods for pharmaceutical analysis*. LC GC EUROPE, 2001. **14**(5): p. 302-310.
107. Marini, R., et al., *LC method for the determination of R-timolol in S-timolol maleate: validation of its ability to quantify and uncertainty assessment*. Talanta, 2006. **68**(4): p. 1166-1175.
108. Saffaj, T. and B. Ihssane, *Uncertainty profiles for the validation of analytical methods*. Talanta, 2011. **85**(3): p. 1535-1542.
109. Saffaj, T., et al., *An overall uncertainty approach for the validation of analytical separation methods*. Analyst, 2013. **138**(16): p. 4677-4691.
110. Alaoui, S., *Validation Globale des Méthodes Bioanalytiques et Microbiologiques Basée sur l'Intervalle de Tolérance et le Concept d'Incertitude*, in *Chimie organique appliquée 2018*, Faculté des sciences et techniques Fès Saiss.
111. Feinberg, M., *Mise en oeuvre du profil d'exactitude*. Cah. Tech. Inra, 2010. **18**.
112. FEINBERG, M., *Validation interne des méthodes d'analyse*. 2001: Ed. Techniques Ingénieur.
113. Hubert, P., et al., *Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal–part II*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2007. **45**(1): p. 70-81.
114. Mee, R.W.,  *$\beta$ -expectation and  $\beta$ -content tolerance limits for balanced one-way ANOVA random model*. Technometrics, 1984. **26**(3): p. 251-254.
115. Hoffman, D. and R. Kringler, *Two-sided tolerance intervals for balanced and unbalanced random effects models*. Journal of biopharmaceutical statistics, 2005. **15**(2): p. 283-293.
116. Liao, C.T., T.Y. Lin, and H.K. Iyer, *One- and Two-Sided Tolerance Intervals for General Balanced Mixed Models and Unbalanced One-Way Random Models*. Technometrics, 2005. **47**(3): p. 323-335.
117. Ellison, S.L., M. Rosslein, and A. Williams, *Quantifying uncertainty in analytical measurement*, in *Quantifying uncertainty in analytical measurement*. 2000, Eurachem.
118. JCGM, *Guide for the expression of uncertainty in measurement*, JCGM. 2008.
119. Barwick, V. and S. Ellison, *Evaluating uncertainties associated with recovery*. VAM Technical Report, LGC/VAM/1998/052, 1998.
120. AFNOR, *Lignes directrices relatives à l'utilisation d'estimations de la répétabilité, de la reproductibilité et de la justesse dans l'évaluation de l'incertitude de mesure*. 2010.
121. Saffaj, T. and B. Ihssane, *Comments on “innovative method for carbon dioxide determination in human postmortem cardiac gas samples using headspace-gas chromatography–mass spectrometry and stable labeled isotope as internal standard” by Varlet et al*. Analytica chimica acta, 2014. **810**: p. 39-42.

122. Dewé, W., et al., *Using total error as decision criterion in analytical method transfer*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2007. **85**(2): p. 262-268.
123. Satterthwaite, F.E., *Synthesis of variance*. Psychometrika, 1941. **6**(5): p. 309-316.
124. El Hajji, R., et al., *Comparison of fit for a future purpose concept based on tolerance interval and ISO 11352 approaches to predict the quantitative performances and routine uncertainty of an ICP-MS method for the determination of 21 elements in drinking water*. Microchemical Journal, 2018. **138**: p. 255-265.
125. Codevilla, C.F., T.d.S. Castilhos, and A.M. Bergold, *A review of analytical methods for the determination of four new phosphodiesterase type 5 inhibitors in biological samples and pharmaceutical preparations*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013. **49**(1): p. 1-11.
126. Lopes, M.B., et al., *Determination of the composition of counterfeit Heptodin™ tablets by near infrared chemical imaging and classical least squares estimation*. Analytica chimica acta, 2009. **641**(1-2): p. 46-51.
127. Singh, S., et al., *Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2009. **28**(1): p. 13-28.
128. Maurin, J.K., et al., *The usefulness of simple X-ray powder diffraction analysis for counterfeit control—The Viagra® example*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2007. **43**(4): p. 1514-1518.
129. Flores, J.R., et al., *Development of a micellar electrokinetic capillary chromatography method for the determination of three drugs employed in the erectile dysfunction therapy*. Journal of Chromatography B, 2004. **811**(2): p. 231-236.
130. Trefi, S., et al., *Analysis of illegally manufactured formulations of tadalafil (Cialis®) by 1H NMR, 2D DOSY 1H NMR and Raman spectroscopy*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2008. **47**(1): p. 103-113.
131. Malet-Martino, M. and R. Martino, *Analysis of Counterfeit Medicines and Adulterated Dietary Supplements by NMR*. NMR in Pharmaceutical Science, 2015: p. 397.
132. Fraser, S.J., et al., *Simultaneous qualitative and quantitative analysis of counterfeit and unregistered medicines using Raman spectroscopy*. Journal of Raman Spectroscopy, 2013. **44**(8): p. 1172-1180.
133. Vredendregt, M., et al., *Screening suspected counterfeit Viagra® and imitations of Viagra® with near-infrared spectroscopy*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2006. **40**(4): p. 840-849.
134. Johansson, M., et al., *A general analytical platform and strategy in search for illegal drugs*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2014. **100**: p. 215-229.
135. Patel, D.N., et al., *Screening of synthetic PDE-5 inhibitors and their analogues as adulterants: analytical techniques and challenges*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2014. **87**: p. 176-190.
136. Aboul-Enein, H.Y. and I. Ali, *Determination of tadalafil in pharmaceutical preparation by HPLC using monolithic silica column*. Talanta, 2005. **65**(1): p. 276-280.
137. Cheng, C.-L. and C.-H. Chou, *Determination of tadalafil in small volumes of plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection*. Journal of Chromatography B, 2005. **822**(1-2): p. 278-284.
138. Fejős, I., et al., *Qualitative and quantitative analysis of PDE-5 inhibitors in counterfeit medicines and dietary supplements by HPLC–UV using sildenafil as a sole reference*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2014. **98**: p. 327-333.
139. Rust, K.Y., et al., *Detection and Validated Quantification of the Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil, and 2 of Their Metabolites in*

- Human Blood Plasma by LC-MS/MS— Application to Forensic and Therapeutic Drug Monitoring Cases*. Therapeutic drug monitoring, 2012. **34**(6): p. 729-735.
140. Custers, D., et al., *Chromatographic impurity fingerprinting of genuine and counterfeit Cialis® as a means to compare the discriminating ability of PDA and MS detection*. Talanta, 2016. **146**: p. 540-548.
  141. Hashem, H., A.E. Ibrahim, and M. Elhenawee, *Chromatographic analysis of some drugs employed in erectile dysfunction therapy: Qualitative and quantitative studies using calixarene stationary phase*. Journal of separation science, 2014. **37**(20): p. 2814-2824.
  142. Ortiz, R.S., et al., *Profiling counterfeit Cialis, Viagra and analogs by UPLC–MS*. Forensic science international, 2013. **229**(1-3): p. 13-20.
  143. Park, M. and S. Ahn, *Quantitative analysis of sildenafil and tadalafil in various fake drugs recently distributed in Korea*. Journal of forensic sciences, 2012. **57**(6): p. 1637-1640.
  144. Lee, E.-S., et al., *Simultaneous determination of 38 phosphodiesterase-5 inhibitors in illicit erectile dysfunction products by liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2013. **83**: p. 171-178.
  145. Yang, Y., et al., *Rapid resolution RP-HPLC-DAD method for simultaneous determination of sildenafil, vardenafil, and tadalafil in pharmaceutical preparations and counterfeit drugs*. Analytical Letters, 2010. **43**(3): p. 373-380.
  146. Cai, Y., et al., *Simultaneous determination of eight PDE5-IS potentially adulterated in herbal dietary supplements with TLC and HPLC-PDA-MS methods*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2010. **33**(13): p. 1287-1306.
  147. Lee, H.-m. and B.J. Lee, *A novel approach to simultaneous screening and confirmation of regulated pharmaceutical compounds in dietary supplements by LC/MS/MS with an information-dependent acquisition method*. Food Additives and Contaminants, 2011. **28**(4): p. 396-407.
  148. Proença, P., et al., *Validated UPLC-MS/MS assay for the determination of synthetic phosphodiesterase type-5 inhibitors in postmortem blood samples*. Journal of forensic and legal medicine, 2013. **20**(6): p. 655-658.
  149. Guideline, I.H.T., *Pharmaceutical Development Q8,(R2); US Department of Health and Human Services*. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER): Rockville, MD, 2009.
  150. Jhilal, F., *Apport du profil d'incertitude à la validation des méthodes d'analyse et leurs transfert basé sur le critère de l'incertitude*. 2017, Faculté des sciences Dhar El Mahraz Fes.
  151. Massart, D.L., *Data handling in science and technology*. Chemometrics: a textbook, 1988. **2**.
  152. Vander Heyden, Y., et al., *Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2001. **24**(5-6): p. 723-753.
  153. Drouen, A.C.J.H., et al., *An improved optimization procedure for the selection of mixed mobile phases in reversed phase liquid chromatography*. Chromatographia, 1982. **16**(1): p. 48-52.
  154. Chapter, U.G. 621> *Chromatography*. in *USP35-NF30, The United States Pharmacopeia Convention, official December*. 2012.
  155. TROUBLESHOOTING, L., *System suitability*. LC• GC Europe, 2004. **17**(6): p. 328-332.

156. Ng, L.L., *Validation of Chromatographic Methods* 1994, Center for Drug Evaluation and Research (CDER)
157. Loyd. Allen, *Compounding with Commercial Drug Products Can Cause Errors!* International Journal of Pharmaceutical Compounding, Science & Technology, 2012. **VOL 2**(ISSUE 4).
158. Veronin, M.A., M.T. Nutan, and U.K.R. Dodla, *Quantification of active pharmaceutical ingredient and impurities in sildenafil citrate obtained from the Internet*. Therapeutic Advances in Drug Safety, 2014. **5**(5): p. 180-189.
159. Horwitz, W. and R. Albert, *The Horwitz ratio (HorRat): a useful index of method performance with respect to precision*. Journal of AOAC International, 2006. **89**(4): p. 1095-1109.
160. Guideline, I.H.T., *Validation of analytical procedures: text and methodology*. Q2 (R1), 2005. **1**.
161. *Sildénafil*, in *Pharmacopée Européenne 8.0*. 2013, Pharmacopée Européenne p. 3459-3461.
162. Mbinze, J.K., et al., *Application of Total Error Strategy in Validation of Affordable and Accessible UV-Visible Spectrophotometric Methods for Quality Control of Poor Medicines*. American Journal of Analytical Chemistry, 2015. **6**(02): p. 106.
163. Mbinze, J., et al., *Development, validation and comparison of NIR and Raman methods for the identification and assay of poor-quality oral quinine drops*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2015. **111**: p. 21-27.
164. EUROPEENNE, P., *5.4 Solvants résiduels*, 8.0, Editor. 2008
165. pharmacopoeia, U.s., <467> *RESIDUAL SOLVENTS*, in *Chemical Tests*, U. 40, Editor.

**Annexe : Chromatogrammes des échantillons contrefaits**

