

UNIVERSITE MOHAMMED V - RABAT  
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT-

ANNEE: 2018

THESE N°:97

APPLICATION DE LA METHODOLOGIE  
DES PLANS D'EXPERIENCES A LA ROBUSTESSE  
DES METHODES ANALYTIQUES :  
ETUDE DE CAS HYDROCHLOROTHIAZIDE / VALSARTAN ET RIDOGREL

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le : .....

PAR

Mr. Yacine AIT BAHCINE

Né le 11 Avril 1993

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES : Robustesse – Approche multivariée – Placket et Burman –  
Validation analytique.

JURY

Mr. Y. CHERRAH

Professeur de Pharmacologie

PRESIDENT

Mr. A. BOUKLOUZE

Professeur des Applications Pharmaceutiques

RAPPORTEUR

Mr. M. ANSAR

Professeur de Chimie Thérapeutique

Mr. My. A. FAOUZI

Professeur de Pharmacologie

JUGES

Mr. M. BOUATIA

Professeur de Chimie Analytique



**UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT**  
**FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT**

**DOYENS HONORAIRES :**

1962 – 1969 : Professeur Abdelmalek FARAJ  
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH  
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK  
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI  
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI  
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI  
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI



**ADMINISTRATION :**

**Doyen** : Professeur Mohamed ADNAOUI  
**Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes**  
Professeur Mohammed AHALLAT  
**Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération**  
Professeur Taoufiq DAKKA  
**Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie**  
Professeur Jamal TAOUFIK  
**Secrétaire Général** : Mr. Mohamed KARRA

**1- ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS**

**ET  
PHARMACIENS**

**PROFESSEURS :**

**Décembre 1984**

Pr. MAAOUNI Abdelaziz	Médecine Interne – <b><u>Clinique Royale</u></b>
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi	Anesthésie -Réanimation
Pr. SETTAF Abdellatif	pathologie Chirurgicale

**Novembre et Décembre 1985**

Pr. BENSAYD Younes	Pathologie Chirurgicale
--------------------	-------------------------

**Janvier, Février et Décembre 1987**

Pr. CHAHED OUAZZANI Houria	Gastro-Entérologie
Pr. LACHKAR Hassan	Médecine Interne
Pr. YAHYA OUI Mohamed	Neurologie

**Décembre 1988**

Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib	Chirurgie Pédiatrique
Pr. DAFIRI Rachida	Radiologie

**Décembre 1989**

Pr. ADNAOUI Mohamed	Médecine Interne – <b><u>Doyen de la FMPR</u></b>
---------------------	---

Pr. CHAD Bouziane  
Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda

### **Janvier et Novembre 1990**

Pr. CHKOFF Rachid  
Pr. HACHIM Mohammed\*  
Pr. KHARBACHAïcha  
Pr. MANSOURI Fatima  
Pr. TAZI Saoud Anas

### **Février Avril Juillet et Décembre 1991**

Pr. AL HAMANYZaïtounia  
Pr. AZZOUZI Abderrahim  
Pr. BAYAHIA Rabéa  
Pr. BELKOUCHIAbdelkader  
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif  
Pr. BENSOUDAYahia  
Pr. BERRAHO Amina  
Pr. BEZZAD Rachid  
Pr. CHABRAOUI Layachi  
Pr. CHERRAHYahia  
Pr. CHOKAIRI Omar  
Pr. KHATTAB Mohamed  
Pr. SOULAYMANI Rachida  
Pr. TAOUFIK Jamal

### **Décembre1992**

Pr. AHALLAT Mohamed  
Pr. BENSOUADA Adil  
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib  
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza  
Pr. CHRAIBIChafiq  
Pr. DEHAYNI Mohamed\*  
Pr. EL OUAHABI Abdessamad  
Pr. FELLAT Rokaya  
Pr. GHAFIR Driss\*  
Pr. JIDDANE Mohamed  
Pr. TAGHY Ahmed  
Pr. ZOUHDI Mimoun

### **Mars 1994**

Pr. BENJAAFAR Nouredine  
Pr. BEN RAIS Nozha  
Pr. CAOUI Malika  
Pr. CHRAIBIAbdelmjid

Pr. EL AMRANI Sabah  
Pr. EL BARDOUNI Ahmed  
Pr. EL HASSANI My Rachid  
Pr. ERROUGANI Abdelkader

Pathologie Chirurgicale  
Neurologie

Pathologie Chirurgicale  
Médecine-Interne  
Gynécologie -Obstétrique  
Anatomie-Pathologique  
Anesthésie Réanimation

Anatomie-Pathologique  
AnesthésieRéanimation –Doyen de la FMPO  
Néphrologie  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Pharmacie galénique  
Ophtalmologie  
Gynécologie Obstétrique  
Biochimie et Chimie  
Pharmacologie  
Histologie Embryologie  
Pédiatrie  
Pharmacologie – Dir. du Centre National PV  
Chimie thérapeutique V.D à la pharmacie+Dir du  
CEDOC

Chirurgie Générale V.D Aff. Acad. et Estud  
Anesthésie Réanimation  
Radiologie  
Gastro-Entérologie  
Gynécologie Obstétrique  
Gynécologie Obstétrique  
Neurochirurgie  
Cardiologie  
Médecine Interne  
Anatomie  
Chirurgie Générale  
Microbiologie



Radiothérapie  
Biophysique  
Biophysique  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques Doyen de la  
FMPA  
Gynécologie Obstétrique  
Traumato-Orthopédie  
Radiologie  
Chirurgie Générale- DirecteurCHIS

Pr. ESSAKALI Malika  
Pr. ETTAYEBI Fouad  
Pr. HADRI Larbi\*  
Pr. HASSAM Badredine  
Pr. IFRINE Lahssan  
Pr. JELTHI Ahmed  
Pr. MAHFOUD Mustapha  
Pr. RHRAB Brahim  
Pr. SENOUCI Karima

### **Mars 1994**

Pr. ABBAR Mohamed\*  
Pr. ABDELHAK M'barek  
Pr. BELAIDI Halima  
Pr. BENTAHILA Abdelali  
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali  
Pr. BERRADA Mohamed Saleh  
Pr. CHAMI Ilham  
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae  
Pr. JALIL Abdelouahed  
Pr. LAKHDAR Amina  
Pr. MOUANE Nezha

### **Mars 1995**

Pr. ABOUQUAL Redouane  
Pr. AMRAOUI Mohamed  
Pr. BAIDADA Abdelaziz  
Pr. BARGACH Samir  
Pr. CHAARI Jilali\*  
Pr. DIMOU M'barek\*  
Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine\*  
Pr. EL MESNAOUI Abbas  
Pr. ESSAKALIHOUSSYNI Leila  
Pr. HDA Abdelhamid\*  
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed  
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia  
Pr. SEFIANI Abdelaziz  
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

### **Décembre 1996**

Pr. AMIL Touriya\*  
Pr. BELKACEM Rachid  
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim  
Pr. ELALAMI EL FARICHA EL Hassan  
Pr. GAOUZI Ahmed  
Pr. MAHFOUDI M'barek\*  
Pr. OUADGHIRI Mohamed  
Pr. OUZEDDOUN Naima  
Pr. ZBIR EL Mehdi\*

### **Novembre 1997**

Pr. ALAMI Mohamed Hassan  
Pr. BEN SLIMANE Lounis  
Pr. BIROUK Nazha

Immunologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Médecine Interne  
Dermatologie  
Chirurgie Générale  
Anatomie Pathologique  
Traumatologie – Orthopédie  
Gynécologie – Obstétrique  
Dermatologie

Urologie  
Chirurgie – Pédiatrique  
Neurologie  
Pédiatrie  
Gynécologie – Obstétrique  
Traumatologie – Orthopédie  
Radiologie  
Ophtalmologie  
Chirurgie Générale  
Gynécologie Obstétrique  
Pédiatrie

Réanimation Médicale  
Chirurgie Générale  
Gynécologie Obstétrique  
Gynécologie Obstétrique  
Médecine Interne  
Anesthésie Réanimation  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Générale  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Cardiologie - **Directeur HMI Med V**  
Urologie  
Ophtalmologie  
Génétique  
Réanimation Médicale

Radiologie  
Chirurgie Pédiatrie  
Ophtalmologie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Radiologie  
Traumatologie-Orthopédie  
Néphrologie  
Cardiologie



Gynécologie-Obstétrique  
Urologie  
Neurologie

Pr. ERREIMI Naima  
Pr. FELLAT Nadia  
Pr. HAIMEUR Charki\*  
Pr. KADDOURI Nouredine  
Pr. KOUTANI Abdellatif  
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid  
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ  
Pr. TAOUFIQ Jallal  
Pr. YOUSFI MALKIMounia

### Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA  
Pr. BENOMARALI  
Pr. BOUGTAB Abdesslam  
Pr. ER RIHANI Hassan  
Pr. BENKIRANEMajid\*  
Pr. KHATOURI ALI\*

### Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed\*  
Pr. AIT OUMAR Hassan  
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd  
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine  
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer  
Pr. ECHARRAB El Mahjoub  
Pr. EL FTOUH Mustapha  
Pr. EL MOSTARCHID Brahim\*  
Pr. ISMAILI Hassane\*  
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim\*  
Pr. TACHINANTE Rajae  
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

### Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia  
Pr. AJANAFatima Zohra  
Pr. BENAMR Said  
Pr. CHERTI Mohammed  
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma  
Pr. EL HASSANI Amine  
Pr. EL KHADER Khalid  
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah\*  
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan  
Pr. MAHASSINI Najat  
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae  
Pr. ROUIMI Abdelhadi\*

### Décembre 2000

Pr. ZOHAI ABDELAH\*

Pédiatrie  
Cardiologie  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Pédiatrique  
Urologie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Psychiatrie  
Gynécologie Obstétrique

Gastro-Entérologie  
Neurologie – *Doyen de la FMP Abulcassis*  
Chirurgie Générale  
Oncologie Médicale  
Hématologie  
Cardiologie

Pneumophtisiologie  
Pédiatrie  
Pédiatrie  
Pneumo-phtisiologie  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Pneumo-phtisiologie  
Neurochirurgie  
Traumatologie Orthopédie- *Dir. Hop. Av. Marr.*  
Anesthésie-Réanimation *Inspecteur du SSM*  
Anesthésie-Réanimation  
Médecine Interne



Neurologie  
Gastro-Entérologie  
Chirurgie Générale  
Cardiologie  
Anesthésie-Réanimation  
Pédiatrie *Directeur Hop. Chekikh Zaied*  
Urologie  
Rhumatologie  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques  
Anatomie Pathologique  
Pédiatrie  
Neurologie

ORL

### Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham\*  
Pr. BENABDELJILIL Maria  
Pr. BENAMAR Loubna  
Pr. BENAMOR Jouda  
Pr. BENELBARHDADI Imane  
Pr. BENNANI Rajae  
Pr. BENOACHANE Thami  
Pr. BEZZA Ahmed\*  
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi  
Pr. BOUMDIN El Hassane\*  
Pr. CHAT Latifa  
Pr. DAALI Mustapha\*  
Pr. DRISSE Sidi Mourad\*  
Pr. EL HIJRI Ahmed  
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid  
Pr. EL MADHI Tarik  
Pr. EL OUNANI Mohamed  
Pr. ETTAIR Said  
Pr. GAZZAZ Miloudi\*  
Pr. HRORA Abdelmalek  
Pr. KABBAJ Saad  
Pr. KABIRI EL Hassane\*  
Pr. LAMRANI Moulay Omar  
Pr. LEKEHAL Brahim  
Pr. MAHASSIN Fattouma\*  
Pr. MEDARHRI Jalil  
Pr. MIKDAME Mohammed\*  
Pr. MOHSINE Raouf  
Pr. NOUINI Yassine  
Pr. SABBAB Farid  
Pr. SEFIANI Yasser  
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

### Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane\*  
Pr. AMEUR Ahmed \*  
Pr. AMRI Rachida  
Pr. AOURARH Aziz\*  
Pr. BAMOUYoussef \*  
Pr. BELMEJDOUBGhizlene\*  
Pr. BENZEKRI Laila  
Pr. BENZZOUBEIR Nadia  
Pr. BERNOUSSIZakiya  
Pr. BICHRA Mohamed Zakariya\*  
Pr. CHOHO Abdelkrim\*  
Pr. CHKIRATE Bouchra  
Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair  
Pr. EL HAOURI Mohamed \*  
Pr. FILALI ADIB Abdelhai

Anesthésie-Réanimation  
Neurologie  
Néphrologie  
Pneumo-phtisiologie  
Gastro-Entérologie  
Cardiologie  
Pédiatrie  
Rhumatologie  
Anatomie  
Radiologie  
Radiologie  
Chirurgie Générale  
Radiologie  
Anesthésie-Réanimation  
Neuro-Chirurgie  
Chirurgie-Pédiatrique  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie **Directeur. Hop.d'Enfants**  
Neuro-Chirurgie  
Chirurgie Générale  
Anesthésie-Réanimation  
Chirurgie Thoracique  
Traumatologie Orthopédie  
Chirurgie Vasculaire Périphérique  
Médecine Interne  
Chirurgie Générale  
Hématologie Clinique  
Chirurgie Générale  
Urologie **Directeur Hôpital Ibn Sina**  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Vasculaire Périphérique  
Pédiatrie



Anatomie Pathologique  
Urologie  
Cardiologie  
Gastro-Entérologie  
Biochimie-Chimie  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques  
Dermatologie  
Gastro-Entérologie  
Anatomie Pathologique  
Psychiatrie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Chirurgie Pédiatrique  
Dermatologie  
Gynécologie Obstétrique

Pr. HAJJIZakia  
Pr. IKEN Ali  
Pr. JAAFAR Abdeloihab\*  
Pr. KRIOUILE Yamina  
Pr. LAGHMARIMina  
Pr. MABROUK Hfid\*  
Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss\*  
Pr. OUJILAL Abdelilah  
Pr. RACHID Khalid \*  
Pr. RAISSMohamed  
Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha\*  
Pr. RHOU Hakima  
Pr. SIAHSamir \*  
Pr. THIMOU Amal  
Pr. ZENTAR Aziz\*

### **Janvier 2004**

Pr. ABDELLAH El Hassan  
Pr. AMRANI Mariam  
Pr. BENBOUZID Mohammed Anas  
Pr. BENKIRANE Ahmed\*  
Pr. BOUGHALEM Mohamed\*  
Pr. BOULAADASMalik  
Pr. BOURAZZA Ahmed\*  
Pr. CHAGAR Belkacem\*  
Pr. CHERRADI Nadia  
Pr. EL FENNI Jamal\*  
Pr. EL HANCHIZAKI  
Pr. EL KHORASSANI Mohamed  
Pr. EL YOUNASSIBadreddine\*  
Pr. HACHI Hafid  
Pr. JABOUIRIK Fatima  
Pr. KHARMAZ Mohamed  
Pr. MOUGHILSaid  
Pr. OUBAAZ Abdelbarre\*  
Pr. TARIB Abdelilah\*  
Pr. TIJAMIFouad  
Pr. ZARZURJamila

### **Janvier 2005**

Pr. ABBASSI Abdellah  
Pr. AL KANDRY Sif Eddine\*  
Pr. ALLALI Fadoua  
Pr. AMAZOUZI Abdellah  
Pr. AZIZ Nouredine\*  
Pr. BAHIRI Rachid  
Pr. BARKAT Amina  
Pr. BENYASS Aatif  
Pr. BERNOUSSI Abdelghani  
Pr. DOUDOUH Abderrahim\*  
Pr. EL HAMZAOUI Sakina\*  
Pr. HAJJI Leila

Ophtalmologie  
Urologie  
Traumatologie Orthopédie  
Pédiatrie  
Ophtalmologie  
Traumatologie Orthopédie  
Gynécologie Obstétrique  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Traumatologie Orthopédie  
Chirurgie Générale  
Pneumophtisiologie  
Néphrologie  
Anesthésie Réanimation  
Pédiatrie  
Chirurgie Générale

Ophtalmologie  
Anatomie Pathologique  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Gastro-Entérologie  
Anesthésie Réanimation  
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale  
Neurologie  
Traumatologie Orthopédie  
Anatomie Pathologique  
Radiologie  
Gynécologie Obstétrique  
Pédiatrie  
Cardiologie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Traumatologie Orthopédie  
Chirurgie Cardio-Vasculaire  
Ophtalmologie  
Pharmacie Clinique  
Chirurgie Générale  
Cardiologie



(mise en disponibilité)

Pr. HESSISSEN Leila  
Pr. JIDAL Mohamed\*  
Pr. LAAROUSSI Mohamed  
Pr. LYAGOUBI Mohammed  
Pr. NIAMANE Radouane\*  
Pr. RAGALA Abdelhak  
Pr. SBIHI Souad  
Pr. ZERAIDI Najja

### Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed

### Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen\*  
Pr. AKJOUJ Said\*  
Pr. BELMEKKI Abdelkader\*  
Pr. BENCHEIKH Razika  
Pr. BIYI Abdelhamid\*  
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine  
Pr. BOULAHYA Abdellatif\*  
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas  
Pr. DOGHMI Nawal  
Pr. FELLAT Ibtissam  
Pr. FAROUDY Mamoun  
Pr. HARMOUCHE Hicham  
Pr. HANAFI Sidi Mohamed\*  
Pr. IDRIS LAHLOU Amine\*  
Pr. JROUNDI Laila  
Pr. KARMOUNI Tariq  
Pr. KILI Amina  
Pr. KISRA Hassan  
Pr. KISRA Mounir  
Pr. LAATIRIS Abdelkader\*  
Pr. LMIMOUNI Badreddine\*  
Pr. MANSOURI Hamid\*  
Pr. OUANASS Abderrazzak  
Pr. SAFI Soumaya\*  
Pr. SEKKAT Fatima Zahra  
Pr. SOUALHI Mouna  
Pr. TELLAL Saida\*  
Pr. ZAHRAOUI Rachida

### Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid  
Pr. ACHACHI Leila  
Pr. ACHOUR Abdessamad\*  
Pr. AIT HOUSSA Mahdi\*  
Pr. AMHAJJI Larbi\*  
Pr. AOUI Sarra  
Pr. BAITE Abdelouahed\*  
Pr. BALOUCH Lhousaine\*

Pédiatrie  
Radiologie  
Chirurgie Cardio-vasculaire  
Parasitologie  
Rhumatologie  
Gynécologie Obstétrique  
Histo-Embryologie Cytogénétique  
Gynécologie Obstétrique

Anesthésie Réanimation

Rhumatologie  
Radiologie  
Hématologie  
O.R.L  
Biophysique  
Chirurgie - Pédiatrique  
Chirurgie Cardio – Vasculaire  
Gynécologie Obstétrique  
Cardiologie  
Cardiologie  
Anesthésie Réanimation  
Médecine Interne  
Anesthésie Réanimation  
Microbiologie  
Radiologie  
Urologie  
Pédiatrie  
Psychiatrie  
Chirurgie – Pédiatrique  
Pharmacie Galénique  
Parasitologie  
Radiothérapie  
Psychiatrie  
Endocrinologie  
Psychiatrie  
Pneumo – Phtisiologie  
Biochimie  
Pneumo – Phtisiologie



Chief de Service des Ressources  
Humaines  
Abdellah KHALIL

Réanimation médicale  
Pneumo phtisiologie  
Chirurgie générale  
Chirurgie cardio vasculaire  
Traumatologie orthopédie  
Parasitologie  
Anesthésie réanimation Directeur ERSM  
Biochimie-chimie

Pr. BENZIANE Hamid\*  
 Pr. BOUTIMZINE Nourdine  
 Pr. CHARKAOUI Naoual\*  
 Pr. EHIRCHIOU Abdelkader\*  
 Pr. ELABSI Mohamed  
 Pr. EL MOUSSAOUI Rachid  
 Pr. EL OMARI Fatima  
 Pr. GHARIB Nouredine  
 Pr. HADADI Khalid\*  
 Pr. ICHOU Mohamed\*  
 Pr. ISMAILI Nadia  
 Pr. KEBDANI Tayeb  
 Pr. LALAOUI SALIM Jaafar\*  
 Pr. LOUZI Lhoussain\*  
 Pr. MADANI Naoufel  
 Pr. MAHI Mohamed\*  
 Pr. MARC Karima  
 Pr. MASRAR Azlarab  
 Pr. MRABET Mustapha\*  
 Pr. MRANI Saad\*  
 Pr. OUZZIF Ez zohra\*  
 Pr. RABHI Monsef\*  
 Pr. RADOUANE Bouchaib\*  
 Pr. SEFFAR Myriame  
 Pr. SEKHSOKH Yessine\*  
 Pr. SIFAT Hassan\*  
 Pr. TABERKANET Mustafa\*  
 Pr. TACHFOUTI Samira  
 Pr. TAJDINE Mohammed Tariq\*  
 Pr. TANANE Mansour\*  
 Pr. TLIQUI Houssain  
 Pr. TOUATI Zakia

### Décembre 2007

Pr. DOUHAL ABDERRAHMAN

### Décembre 2008

Pr. ZOUBIR Mohamed\*  
 Pr. TAHIRI My El Hassan\*

### Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali\*  
 Pr. AGDR Aomar\*  
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim\*  
 Pr. AIT BENHADDOU El hachmia  
 Pr. AKHADDAR Ali\*  
 Pr. ALLALI Nazik

Pharmacie clinique  
 Ophtalmologie  
 Pharmacie galénique  
 Chirurgie générale  
 Chirurgie générale  
 Anesthésie réanimation  
 Psychiatrie  
 Chirurgie plastique et réparatrice  
 Radiothérapie  
 Oncologie médicale  
 Dermatologie  
 Radiothérapie  
 Anesthésie réanimation  
 Microbiologie  
 Réanimation médicale  
 Radiologie  
 Pneumologie  
 Hématologie biologique  
 Médecine préventive santé publique et hygiène  
 Virologie  
 Biochimie-chimie  
 Médecine interne  
 Radiologie  
 Microbiologie  
 Microbiologie  
 Radiothérapie  
 Chirurgie vasculaire périphérique  
 Ophtalmologie  
 Chirurgie générale  
 Traumatologie orthopédie  
 Parasitologie  
 Cardiologie



Ophtalmologie

Anesthésie Réanimation  
 Chirurgie Générale

Médecine interne  
 Pédiatre  
 Chirurgie Générale  
 Neurologie  
 Neuro-chirurgie  
 Radiologie

Pr. AMINE Bouchra  
 Pr. ARKHA Yassir  
 Pr. BELYAMANI Lahcen\*  
 Pr. BJIJOU Younes  
 Pr. BOUHSAIN Sanae\*  
 Pr. BOUI Mohammed\*  
 Pr. BOUNAIM Ahmed\*  
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha\*  
 Pr. CHAKOUR Mohammed \*  
 Pr. CHTATA Hassan Toufik\*  
 Pr. DOGHMI Kamal\*  
 Pr. EL MALKI Hadj Omar  
 Pr. EL OUENNASS Mostapha\*  
 Pr. ENNIBI Khalid\*  
 Pr. FATHI Khalid  
 Pr. HASSIKOU Hasna \*  
 Pr. KABBAJ Nawal  
 Pr. KABIRI Meryem  
 Pr. KARBOUBI Lamya  
 Pr. L'KASSIMI Hachemi\*  
 Pr. LAMSAOURI Jamal\*  
 Pr. MARMADE Lahcen  
 Pr. MESKINI Toufik  
 Pr. MESSAOUDI Nezha \*  
 Pr. MSSROURI Rahal  
 Pr. NASSAR Ittimade  
 Pr. OUKERRAJ Latifa  
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani \*

**PROFESSEURS AGREGES :**  
**Octobre 2010**

Pr. ALILOU Mustapha  
 Pr. AMEZIANE Taoufiq\*  
 Pr. BELAGUIDA Abdelaziz  
 Pr. BOUAITY Brahim\*  
 Pr. CHADLI Mariama\*  
 Pr. CHEMSI Mohamed\*  
 Pr. DAMI Abdellah\*  
 Pr. DARBI Abdellatif\*  
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar  
 Pr. EL HAFIDI Naima  
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser\*  
 Pr. EL MAZOUZ Samir  
 Pr. EL SAYEGH Hachem  
 Pr. ERRABIH Ikram  
 Pr. LAMALMI Najat  
 Pr. MOSADIK Ahlam  
 Pr. MOUJAHID Mountassir\*  
 Pr. NAZIH Mouna\*  
 Pr. ZOUAIDIA Fouad

Rhumatologie  
 Neuro-chirurgie  
 Anesthésie Réanimation  
 Anatomie  
 Biochimie-chimie  
 Dermatologie  
 Chirurgie Générale  
 Traumatologie orthopédique  
 Hématologie biologique  
 Chirurgie vasculaire périphérique  
 Hématologie clinique  
 Chirurgie Générale  
 Microbiologie  
 Médecine interne  
 Gynécologie obstétrique  
 Rhumatologie  
 Gastro-entérologie  
 Pédiatrie  
 Pédiatrie  
 Microbiologie ***Directeur Hôpital My Ismail***  
 Chimie Thérapeutique  
 Chirurgie Cardio-vasculaire  
 Pédiatrie  
 Hématologie biologique  
 Chirurgie Générale  
 Radiologie  
 Cardiologie  
 Pneumo-phtisiologie



Anesthésie réanimation  
 Médecine interne  
 Physiologie  
 ORL  
 Microbiologie  
 Médecine aéronautique  
 Biochimie chimie  
 Radiologie  
 Chirurgie pédiatrique  
 Pédiatrie  
 Radiologie  
 Chirurgie plastique et réparatrice  
 Urologie  
 Gastro entérologie  
 Anatomie pathologique  
 Anesthésie Réanimation  
 Chirurgie générale  
 Hématologie biologique  
 Anatomie pathologique

## Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed  
Pr. ABOUELALAA Khalil\*  
Pr. BELAIZI Mohamed\*  
Pr. BENCHEBBA Driss\*  
Pr. DRISSI Mohamed\*  
Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna  
Pr. EL KHATTABI Abdessadek\*  
Pr. EL OUAZZANI Hanane\*  
Pr. ER-RAJI Mounir  
Pr. JAHID Ahmed  
Pr. MEHSSANI Jamal\*  
Pr. RAISSOUNI Maha\*

Chirurgie Pédiatrique  
Anesthésie Réanimation  
Psychiatrie  
Traumatologie Orthopédique  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Générale  
Médecine Interne  
Pneumophtisiologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Anatomie pathologique  
Psychiatrie  
Cardiologie



## Février 2013

Pr. AHID Samir  
Pr. AIT EL CADI Mina  
Pr. AMRANI HANCHI Laila  
Pr. AMOUR Mourad  
Pr. AWAB Almahdi  
Pr. BELAYACHI Jihane  
Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain  
Pr. BENCHEKROUN Laila  
Pr. BENKIRANE Souad  
Pr. BENNANA Ahmed\*  
0.  
Pr. BENSGHIR Mustapha\*  
Pr. BENYAHIA Mohammed\*  
Pr. BOUATIA Mustapha  
Pr. BOUABID Ahmed Salim\*  
Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba  
Pr. CHAIB Ali\*  
Pr. DENDANE Tarek  
Pr. DINI Nouzha\*  
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali  
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa  
Pr. ELFATEMI Nizare  
Pr. EL GUERROUJ Hasnae  
Pr. EL HARTI Jaouad  
Pr. EL JOUDI Rachid\*  
Pr. EL KABABRI Maria  
Pr. EL KHANNOUSSI Basma  
Pr. EL KHLOUFI Samir  
Pr. EL KORAICHI Alae  
Pr. EN-NOUALI Hassane\*  
Pr. ERRGUIG Laila  
Pr. FIKRI Meryim  
Pr. GHFIR Imade

Pharmacologie – Chimie  
Toxicologie  
Gastro-Entérologie  
Anesthésie Réanimation  
Anesthésie Réanimation  
Réanimation Médicale  
Anesthésie Réanimation  
Biochimie-Chimie  
Hématologie biologique  
Informatique Pharmaceutique

Anesthésie Réanimation  
Néphrologie  
Chimie Analytique  
Traumatologie Orthopédie  
Anatomie  
Cardiologie  
Réanimation Médicale  
Pédiatrie  
Anesthésie Réanimation  
Radiologie  
Neuro-Chirurgie  
Médecine Nucléaire  
Chimie Thérapeutique  
Toxicologie  
Pédiatrie  
Anatomie Pathologie  
Anatomie  
Anesthésie Réanimation  
Radiologie  
Physiologie  
Radiologie  
Médecine Nucléaire

Pr. IMANE Zineb  
Pr. IRAQI Hind  
Pr. KABBAJ Hakima  
Pr. KADIRI Mohamed\*  
Pr. LATIB Rachida  
Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra  
Pr. MEDDAH Bouchra  
Pr. MELHAOUI Adyl  
Pr. MRABTI Hind  
Pr. NEJJARI Rachid  
Pr. OUBEJJA Houda  
Pr. OUKABLI Mohamed\*  
Pr. RAHALI Younes  
Pr. RATBI Ilham  
Pr. RAHMANI Mounia  
Pr. REDA Karim\*  
Pr. REGRAGUI Wafa  
Pr. RKAIN Hanan  
Pr. ROSTOM Samira  
Pr. ROUAS Lamiaa  
Pr. ROUIBAA Fedoua\*  
Pr. SALIHOUN Mouna  
Pr. SAYAH Rochde  
Pr. SEDDIK Hassan\*  
Pr. ZERHOUNI Hicham  
Pr. ZINE Ali\*

Pédiatrie  
Endocrinologie et maladies métaboliques  
Microbiologie  
Psychiatrie  
Radiologie  
Médecine Interne  
Pharmacologie  
Neuro-chirurgie  
Oncologie Médicale  
Pharmacognosie  
Chirurgie Pédiatrique  
Anatomie Pathologique  
Pharmacie Galénique  
Génétique  
Neurologie  
Ophtalmologie  
Neurologie  
Physiologie  
Rhumatologie  
Anatomie Pathologique  
Gastro-Entérologie  
Gastro-Entérologie  
Chirurgie Cardio-Vasculaire  
Gastro-Entérologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Traumatologie Orthopédie

**Avril 2013**

Pr. EL KHATIB Mohamed Karim\*  
Pr. GHOUNDALE Omar\*  
Pr. ZYANI Mohammad\*

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale  
Urologie  
Médecine Interne

\**Enseignants Militaires*



## MARS 2014

ACHIR ABDELLAH  
BENCHAKROUN MOHAMMED  
BOUCHIKH MOHAMMED  
EL KABBAJ DRISS  
EL MACHTANI IDRISSE SAMIRA  
HARDIZI HOUYAM  
HASSANI AMALE  
HERRAK LAILA  
JANANE ABDELLA TIF  
JEAIDI ANASS  
KOUACH JAOUAD  
LEMNOUER ABDELHAY  
MAKRAM SANAA  
OULAHYANE RACHID  
RHISSASSI MOHAMED JMFAR  
SABRY MOHAMED  
SEKKACH YOUSSEF  
TAZL MOUKBA. :LA.KLA.

**\*Enseignants Militaires**

## DECEMBRE 2014

ABILKACEM RACHID'  
AIT BOUGHIMA FADILA  
BEKKALI HICHAM  
BENAZZOU SALMA  
BOUABDELLAH MOUNYA  
BOUCHRIK MOURAD  
DERRAJI SOUFIANE  
DOBLALI TAOUFIK  
EL AYOUBI EL IDRISSE ALI  
EL GHADBANE ABDEDAIM HATIM  
EL MARJANY MOHAMMED  
FEJJAL NAWFAL  
JAHIDI MOHAMED  
LAKHAL ZOUHAIR  
OUDGHIRI NEZHA  
Rami Mohamed  
SABIR MARIA  
SBAI IDRISSE KARIM

**\*Enseignants Militaires**

Chirurgie Thoracique  
Traumatologie- Orthopédie  
Chirurgie Thoracique  
Néphrologie  
Biochimie-Chimie  
Histologie- Embryologie-Cytogénétique  
Pédiatrie  
Pneumologie  
Urologie  
Hématologie Biologique  
Génécoologie-Obstétrique  
Microbiologie  
Pharmacologie  
Chirurgie Pédiatrique  
CCV  
Cardiologie  
Médecine Interne  
Génécoologie-Obstétrique

Pédiatrie  
Médecine Légale  
Anesthésie-Réanimation  
Chirurgie Maxillo-Faciale  
Biochimie-Chimie  
Parasitologie  
Pharmacie Clinique  
Microbiologie  
Anatomie  
Anesthésie-Réanimation  
Radiothérapie  
Chirurgie Réparatrice et Plastique  
O.R.L  
Cardiologie  
Anesthésie-Réanimation  
Chirurgie Pédiatrique  
Psychiatrie  
Médecine préventive, santé publique et Hyg.



## AOUT 2015

Meziane meryem  
Tahri latifa

Dermatologie  
Rhumatologie

## JANVIER 2016

BENKABBOU AMINE  
EL ASRI FOUAD  
ERRAMI NOUREDDINE  
NITASSI SOPHIA

Chirurgie Générale  
Ophtalmologie  
O.R.L  
O.R.L

## **2- ENSEIGNANTS – CHERCHEURS SCIENTIFIQUES**

### PROFESSEURS / PRs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia  
Pr. ALAMI OUHABI Naïma  
Pr. ALAOUI KATIM  
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma  
Pr. ANSAR M'hammed  
Pr. BOUHOUCHE Ahmed  
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz  
Pr. BOURJOUANE Mohamed  
Pr. CHAHED OUAZZANI Lalla Chadia  
Pr. DAKKA Taoufiq  
Pr. DRAOUI Mustapha  
Pr. EL GUESSABI Lahcen  
Pr. ETTAIB Abdelkader  
Pr. FAOUZIMoulay El Abbas  
Pr. HAMZAOUI Laila  
Pr. HMAMOUCHE Mohamed  
Pr. IBRAHIMI Azeddine  
Pr. KHANFRI Jamal Eddine  
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med  
Pr. REDHA Ahlam  
Pr. TOUATI Driss  
Pr. ZAHIDI Ahmed  
Pr. ZELLOU Amina

Physiologie  
Biochimie – chimie  
Pharmacologie  
Histologie-Embryologie  
Chimie Organique et Pharmacie Chimique  
Génétique Humaine  
Applications Pharmaceutiques  
Microbiologie  
Biochimie – chimie  
Physiologie  
Chimie Analytique  
Pharmacognosie  
Zootechnie  
Pharmacologie  
Biophysique  
Chimie Organique  
Biologie moléculaire  
Biologie  
Chimie Organique  
Chimie  
Pharmacognosie  
Pharmacologie  
Chimie Organique

*Mise à jour le 14/12/2016 par le  
Service des Ressources Humaines*





*Dédicaces*

*Cela ne sera pas mon œuvre ultime, que j'aurais forcément le privilège de réaliser avec certainement, l'aide de dieu, que ce soit sur le plan académique, professionnel, ou tout simplement et essentiellement, personnel. Mes ambitions sont en effet, bien plus vastes, que ce qu'annoncent mes mots, souvent timides. Je sais en outre, que je pourrai encore et toujours, compter sur ceux qui ont, directement ou indirectement, contribué jusqu'ici, voire, amplement et inlassablement concouru, pour faire de ma modeste personne, un projet de bon citoyen, en croyant en moi et, en mes moyens.*

*Le présent travail est le fruit d'un long parcours, réalisé parfois, dans la douleur. Mais, je persiste à croire, que mon destin, a bien voulu mettre sur mon chemin, certaines bonnes personnes, qui ont su, dans mes moments de désespoir, me propulser vers l'avant et, me charger d'énergie, dans mes moments de fatigue, sans jamais demander la moindre contrepartie, sauf, peut-être, la promesse silencieuse de tâcher d'être heureux dans tout ce que je fais et,... toujours fier de ce que je suis.*

*J'ai eu tellement envie, que ces pages consacrées aux dédicaces et aux remerciements, ne connaissent point de fin, au risque de transformer le présent contenu, en sacré hommage plutôt que l'aboutissement d'une longue année de recherche scientifique j'essayerai d'être le plus bref possible. Je leur dois en grande partie, le mérite d'en être là.*

*Je voudrais, donc, à l'occasion de mon premier véritable tournant positif de ma vie, qui me propulsera, si dieu le veut, vers de nouveaux challenges plus élaborés, dédier ce modeste travail, en guise d'hommage rendu à juste titre, à ces êtres chers, bien logés dans mon coeur.*

## *A mes parents*

*Aux deux êtres chers qui m'ont prodigué tant d'amour, d'affection et de bonheur ; qui ont fait tant de sacrifices pour mon éducation et mes études ; qui m'ont comblé par leur soutien et leur générosité et qui continuent à m'entourer de leur ample affection.*

*Je vous dédie ce modeste travail en témoignage de ma vive reconnaissance, de mon profond amour et attachement et du grand respect que je vous dois.*

*Que dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie*

*A mon regretté meilleur ami*

*Le défunt Bendriss Mohamed Reida*

*Que Dieu ait son âme*

*J'avais tellement de chose à dire à*

*Mon cher ami qui nous a quitté au bout de son parcours*

*Après une longue et agréable amitié. A vrai dire je n'étais prêt à vivre ce deuil.*

*Tu étais mon meilleur ami toujours souriant, fidèle, bien aimable et respectueux,*

*C'est dommage que tu ne sois pas là.*

*J'aurais aimé partagé ces moments avec toi.*

*En attendant notre rencontre dans l'au-delà je veillerais à réaliser tous nos rêves*

*et projets qu'on s'était fixé ensemble.*

*A mes chers frères Ilias et Younes*

*Acceptez ce modeste travail en témoignage de ma profonde affection et de mon amour.*

*A ma très chère sœur*

*Tu es ma sœur, mais également mon amie, ma confidente.*

*Je te remercie pour ton affection et ton amour et te souhaite beaucoup de bonheur, de réussite dans ta vie.*

*A toute ma famille.*

*A tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.*

*A tous mes maîtres.*

# *Remerciements*



*A Notre Maître et Juge de Thèse*  
*Monsieur le professeur Yahia Cherrah*  
*Professeur de Pharmacologie*

*Permettez-nous de vous remercier Monsieur le président, pour ce grand honneur  
que vous nous faites, en acceptant de présider le jury.*

*Nous vous présentons tout notre respect devant vos compétences  
professionnelles, vos qualités humaines et votre dynamisme.*

*Veillez agréer, nos sentiments d'estime et de haute considération.*

*A mon maitre et rapporteur de thèse*

*Monsieur le professeur Abdelaziz Bouklouze*

*Professeur des applications pharmaceutiques*

*Etant l'une de ces bonnes personnes qui propulsent vers l'avant, nous tenons,  
professeur, à vous remercier :*

*D'avoir accepté d'encadrer ce travail Malgré vos multiples obligations,*

*Pour votre compétence qui n'a d'égale que votre gentillesse.*

*Pour votre profond humanisme.*

*Pour votre disponibilité.*

*Et simplement pour être le professeur BOUKLOUZE.*

*Ce fut très agréable de travailler avec vous pendant cette période et aucune  
dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur notre vif remerciement cher  
professeur.*

*Puisse ce travail être à la hauteur de la confiance que vous nous avez accordée.*

*A mon maitre et juge de thèse*

*Monsieur le professeur Mohammed ANSAR*

*Professeur de chimie thérapeutique*

*Nous sommes infiniment sensibles à l'honneur que vous nous faites de siéger  
parmi notre jury de thèse.*

*Nous portons une grande considération tant  
pour votre extrême gentillesse que pour vos qualités  
professionnelles.*

*Veillez trouver dans ce travail, l'expression de  
notre gratitude et de notre grande estime.*

*A mon maitre et juge de thèse*

*Monsieur le professeur Moulay El Abbes FAOUZI*

*Professeur de Pharmacologie*

*Merci d'avoir accepté de siéger parmi notre jury. Soyez assuré, Professeur, que  
c'est une fierté pour nous de vous compter parmi les membres de notre jury.*

*Veuillez accepter Monsieur le Professeur, ma profonde reconnaissance et mes  
remerciements les plus sincères.*

*A mon maitre et juge de thèse*

*Monsieur le professeur Mustapha BOUATIA*

*Professeur De chimie analytique*

*Nous sommes profondément touchés par votre gentillesse et la spontanéité de  
votre accueil.*

*Nous vous remercions pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger  
cette thèse.*

*Veillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.*



*Liste des illustrations*

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Problème analytique.....	7
<b>Figure 2</b> : Cycle de vie d'une méthode analytique .....	8
<b>Figure 3</b> : Exemples de procédures ayant la même limite d'acceptation $\lambda = 15\%$ . Le biais est exprimé en % d'écart à la valeur vraie et la fidélité comme un coefficient de variation.....	16
<b>Figure 4</b> : Limites d'acceptation des performances d'une procédure en fonction de son « vrai biais » (%) et de sa « vraie fidélité » (CV, %) .....	18
<b>Figure 5</b> : Les règles de décisions de validité des méthodes analytiques pour 5 situations différentes (1 à 5) selon le biais relatif de la méthode ; (a) l'approche de différence du biais relatif, (b) l'approche d'équivalence du biais relatif avec les limites de décision fixées à 5%.....	21
<b>Figure 6</b> : Interprétation géométrique des valeurs seuils pour la fidélité et la justesse.....	23
<b>Figure 7</b> : Les concepts de base de la validation : valeur vraie, incertitude et limite d'acceptabilité ...	26
<b>Figure 8</b> : Illustration du profil d'exactitude comme outil de décision. ....	27
<b>Figure 9</b> : Estimation de la justesse .....	29
<b>Figure 10</b> : Estimation de la fidélité.....	31
<b>Figure 11</b> : Différentes conditions de mesure des écarts-types de fidélité .....	32
<b>Figure 12</b> : Principales sources d'erreur influençant la fidélité d'une méthode .....	33
<b>Figure 13</b> : Représentation schématique de l'exactitude.....	36
<b>Figure 14</b> : Les process d'évaluation pour contrôler les méthodes d'analyse durant l'utilisation en routine .....	41
<b>Figure 15</b> : Les plans d'expériences optimisent les 3 parties grisées du processus d'acquisition des connaissances .....	44
<b>Figure 16</b> : Les étapes d'un plan d'expériences.....	46
<b>Figure 17</b> : Exemple de plan composite centré pour 3 facteurs X1, X2 et X3 .....	51
<b>Figure 18</b> : Extension d'un plan de Doehlert à deux facteurs. Trois points suffisent pour retrouver un nouveau plan de Doehlert .....	52
<b>Figure 19</b> : Plan de Box-Behnken pour trois facteurs.....	53
<b>Figure 20</b> : Schéma représentatif du fonctionnement d'un système .....	54
<b>Figure 21</b> : Les étapes de la réalisation d'un test de robustesse .....	57
<b>Figure 22</b> : Normal Plot .....	75
<b>Figure 23</b> : Half normal plot.....	75

<b>Figure 24</b> : Représentation des effets positifs et négatifs sur le diagramme des effets .....	77
<b>Figure 25</b> : Diagramme des effets de tous les facteurs sur toutes les réponses .....	88
<b>Figure 26</b> : Effets des facteurs sur la teneur de l'hydrochlorothiazide .....	89
<b>Figure 27</b> : Effets des facteurs sur le Temps de rétention de l'hydrochlorothiazide.....	89
<b>Figure 28</b> : Effets des facteurs sur l'Asymétrie du pic Hydrochlorothiazide .....	90
<b>Figure 29</b> : Effets des facteurs sur la Teneur du Valsartan.....	90
<b>Figure 30</b> : Effet des facteurs sur le Temps de rétention Valsartan .....	91
<b>Figure 31</b> : Effets des facteurs sur La résolution .....	91
<b>Figure 32</b> : Chromatogramme de la solution de référence contenant 100% du PA et 0.5% des substances apparentées aux conditions nominales.....	99

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Liste des facteurs pouvant être pris en compte lors des tests de robustesse d'une méthode chromatographique.....	58
<b>Tableau 2</b> : Plan factoriel complet pour 3 facteurs .....	61
<b>Tableau 3</b> : Le nombre des effets qui peuvent être calculés pour les différents plans factoriels complets.....	62
<b>Tableau 4</b> : Sélection d'un plan factoriel en demi-fraction à partir d'un plan factoriel complet pour 4 facteurs.....	64
<b>Tableau 5</b> : Colonnes des coefficients de contraste pour les interactions triples de la matrice désignée dans le tableau 4.....	65
<b>Tableau 6</b> : Les aliases d'un plan $2^{4-1}$ avec I=ABCD.....	66
<b>Tableau 7</b> : Les plans factoriel fractionnaires proposés .....	67
<b>Tableau 8</b> : Plan réfléchi pour 7 facteurs dérivés du plan de Plackett-Burman.....	70
<b>Tableau 9</b> : Le nombre d'expériences recommandées en fonction du nombre de facteurs à examiner.....	71
<b>Tableau 10</b> : La première ligne pour un plan donné de Plackett et Burman .....	72
<b>Tableau 11</b> : Exemple d'un plan de Plackett et Burman à 7 facteurs et 8 essais.....	72
<b>Tableau 12</b> : Les Rankits correspondants aux plans P-B 8, 12 et 16 .....	76
<b>Tableau 13</b> : Le gradient de solvants utilisés.....	84
<b>Tableau 14</b> : Les facteurs retenus pour le test.....	85
<b>Tableau 15</b> : La matrice des expériences.....	85
<b>Tableau 16</b> : les résultats obtenus .....	86
<b>Tableau 17</b> : Les coefficients des effets des différents facteurs sur les réponses .....	87
<b>Tableau 18</b> : La ME et la MES calculées pour les différentes réponses .....	92
<b>Tableau 19</b> : Le critère de Student calculé des différents facteurs .....	94
<b>Tableau 20</b> : Le gradient des solvants utilisés .....	97
<b>Tableau 21</b> : Les facteurs retenus pour le test.....	97
<b>Tableau 22</b> : Plan de Plackett et Burman pour 11 facteurs et 12 essais .....	98



# *Sommaire*

<b>Introduction générale</b> .....	4
<b>Revue de la littérature</b> .....	6
A. Chapitre I : Cycle de vie d'une méthode d'analyse .....	7
I. Introduction : .....	7
II. La sélection de la méthode .....	9
III. Développement et optimisation .....	11
IV. La validation .....	13
1. Critères de validation .....	14
2. Objectifs de la procédure d'analyse .....	15
3. Objectifs de la validation des méthodes : .....	19
4. Les règles de décision .....	19
1.1. L'approche descriptive : .....	20
1.2. L'approche de différence .....	20
1.3. L'approche d'équivalence .....	21
1.4. L'approche de l'erreur totale ou Profil d'exactitude .....	22
V. L'utilisation en routine .....	40
B. Chapitre II : Rappels sur la méthodologie des plans d'expériences .....	43
I. Introduction .....	43
II. Plans d'expériences et le processus d'acquisition des connaissances .....	43
1. Choix de la méthode d'expérimentation .....	45
2. Analyse des résultats .....	45
3. Acquisition progressive de la connaissance .....	45
III. Les étapes d'acquisition de l'information selon la méthodologie des plans d'expériences .....	46
1. Identification de l'objectif à atteindre .....	46
2. Choix de la ou des réponses .....	46
3. Choix des facteurs .....	47
4. Construction de la série d'essais .....	47
5. Réalisation des essais .....	48
6. Analyse des résultats d'essais .....	48

7. Confirmation des conclusions.....	48
IV. Domaine d'application.....	49
1. Identification des facteurs influents parmi un grand nombre.....	49
2. Quantification de l'influence des facteurs.....	50
3. Détermination des configurations optimales.....	50
4. Minimisation de l'influence des facteurs bruits.....	53
C. Chapitre III : Revue de la littérature sur la robustesse.....	55
I. Introduction .....	55
II. Contexte, objectifs et étapes d'un test de robustesse.....	56
1. La sélection des facteurs.....	57
2. La sélection des niveaux des facteurs.....	60
3. Sélection du plan d'expérience .....	60
4. Exécution des expériences.....	73
5. Détermination des réponses .....	73
6. Calcul des effets.....	74
7. Interprétation des données.....	75
7.1. Approche graphique .....	75
7.2. Analyse statistique.....	77
8. Estimation des intervalles de non-signification pour les facteurs significatifs .....	81
<b>Partie pratique : Test de la robustesse d'une méthode indicatrice de la stabilité de l'hydrochlorothiazide etdu Valsartan et d'une méthode de dosage du Ridogrel.....</b>	<b>82</b>
I. Introduction : .....	83
II. Exemple 1: La méthode indicatrice de la stabilité de l'hydrochlorothiazide etdu Valsartan : .....	83
1. Matériels et méthodes :.....	83
1.1.Produits chimiques et réactifs.....	83
1.2.Conditions nominale .....	84
2. Résultats et discussion : .....	86
2.1.Calcul des effets .....	87
2.2.Interprétation graphique des effets calculé.....	88

2.3. Interprétation statistique des effets calculés .....	94
3. Conclusion : .....	95
III. Exemple 2 : La méthode du dosage du Ridogrel .....	96
1. Introduction : .....	96
2. Matériels et méthodes : .....	96
2.1. Produits chimiques et réactifs .....	96
2.2. Conditions nominales .....	96
2.3. Sélection des facteurs et de leurs niveaux .....	97
3. Résultats et discussion : .....	99
4. Conclusion : .....	105
<b>Conclusion générale</b> .....	106
<b>Résumés</b> .....	2
<b>Annexe</b> .....	6
<b>Références</b> .....	14



# *Introduction générale*

Les méthodes d'analyse sont souvent décrites comme des procédures immuables et figées.

C'est un peu l'impression que donnent les manuels et les recueils de normes techniques. Or, comme tout procédé de production, les méthodes d'analyse naissent, évoluent et meurent.

Dans ce travail nous avons décrit le cycle de vie depuis le moment où la méthode est choisie jusqu'au moment où on l'abandonne. Nous nous sommes intéressé aux facteurs de bruits susceptibles d'influencer les méthodes d'analyses et nous avons mis en œuvre un test de robustesse sur deux méthodes indicatrices de la stabilité l'une pour la détermination simultanée de l'Hydrochlorothiazide (HCT) et le Valsartan (VS) en présence de leurs impuretés respectives. Et l'autre pour le dosage du ridogrel, tout en en détaillant l'application du test sur les méthodes de dosage chromatographiques.



*Revue de la littérature*

## A. Chapitre I : Cycle de vie d'une méthode d'analyse

### I. Introduction :

Les domaines d'application des méthodes d'analyse sont très divers, allant du contrôle des médicaments, de la bio-analyse dans le cadre des études cliniques et des études de bioéquivalence jusqu'aux études environnementales et agro-alimentaires... Quelle que soit la méthode d'analyse utilisée et quel que soit le domaine d'application, chaque laboratoire doit être en mesure de produire des résultats fiables lors de l'exécution de l'analyse pour un client ou pour des fins réglementaires, afin de répondre au problème analytique et donc à celui d'ordre socio-économique comme le montre la Figure 1. [1-2]

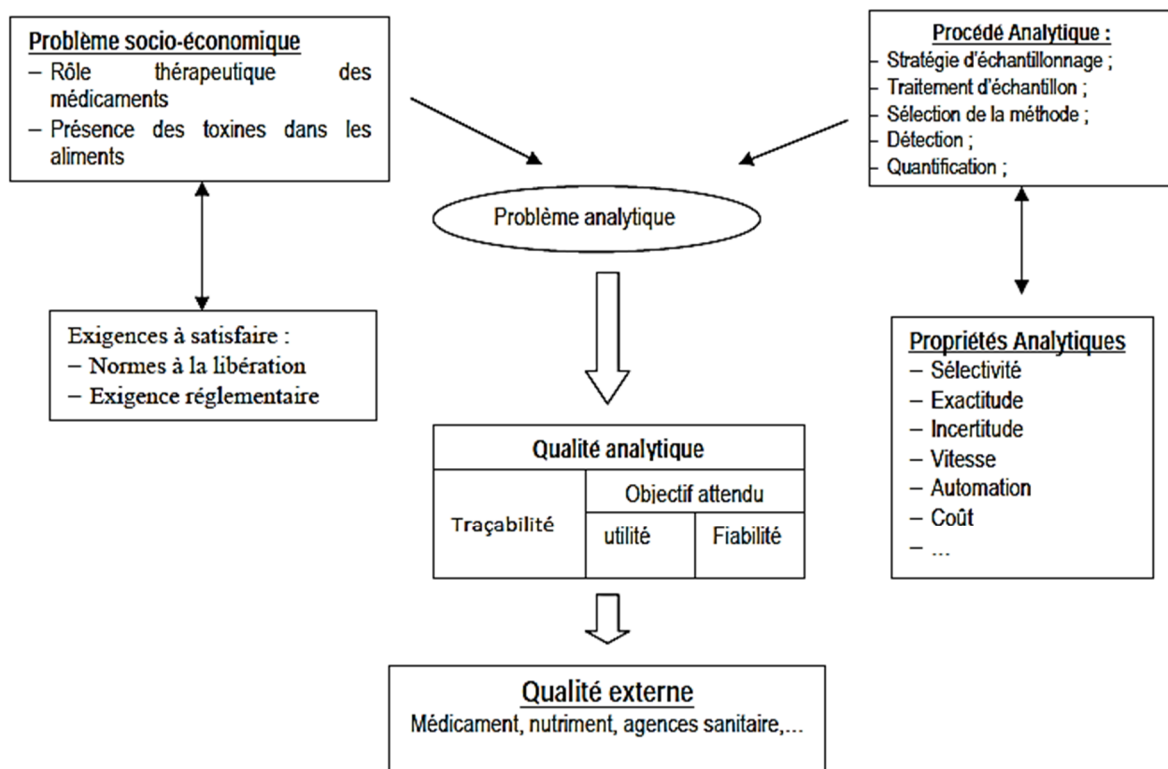


Figure 1 : Problème analytique [2]

Dans le domaine analytique, deux types de méthodes sont mentionnés : les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives. Dans cette dernière catégorie, la mise en œuvre de ces méthodes (le cycle de vie) peut s'articuler en quatre grandes phases généralement successives telles que l'illustre la Figure 2 [3]:

- La Sélection de la méthode de ses objectifs et des conditions opératoires initiales.
- Le Développement, avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences;
- La Validation précédée, selon les cas, d'une phase de pré validation;
- L'usage en routine, incluant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle ou une revalidation.

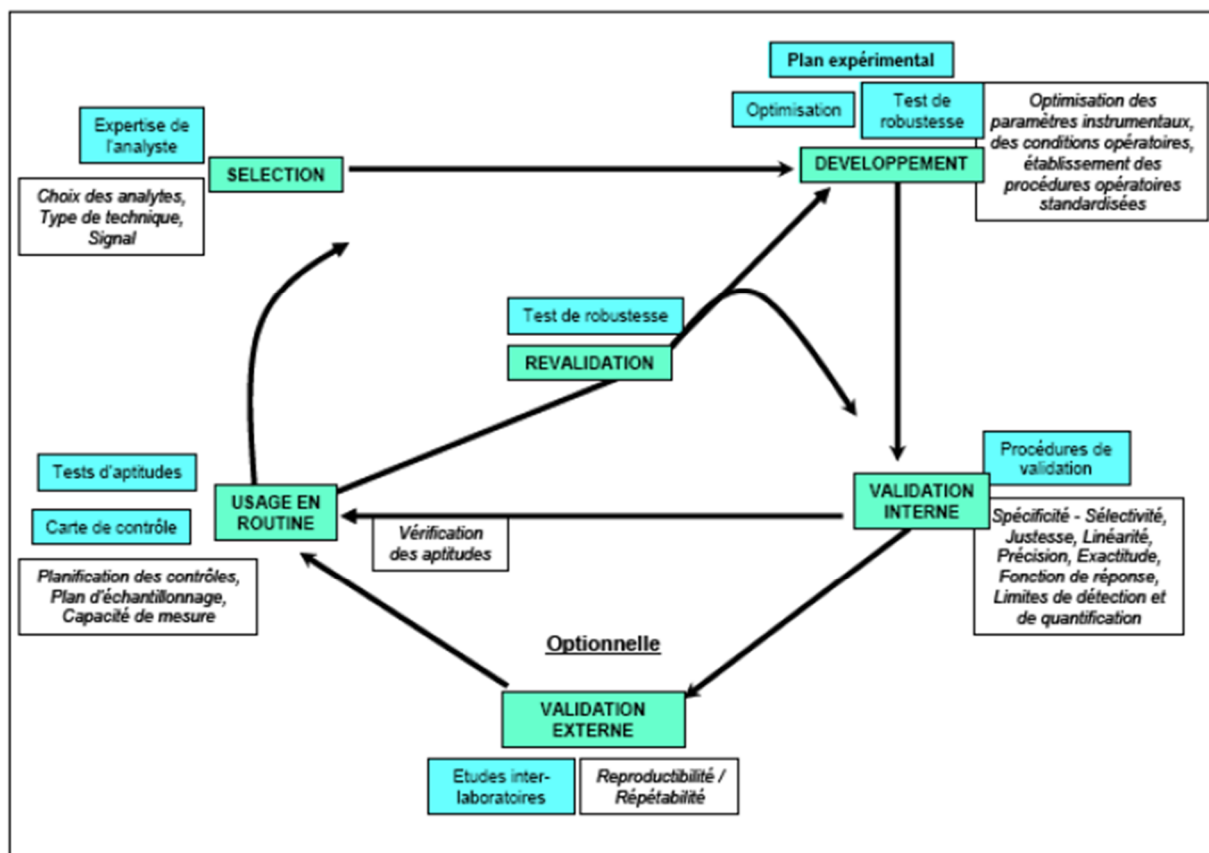


Figure 2 : Cycle de vie d'une méthode analytique [4]

## II. La sélection de la méthode

Cette étape consiste à choisir parmi les diverses méthodes physico-chimiques publiées dans la littérature ou maîtrisées par le laboratoire celle qui doit permettre de déterminer le ou les analytes représentatifs du problème analytique à traiter. Cette démarche repose entièrement sur le savoir-faire et l'expertise de l'analyste.

Le choix de la méthode est le point de départ véritable de la validation. Il résulte d'un compromis entre les possibilités instrumentales du laboratoire, le coût d'une mesure et les performances requises. Pour estimer le poids de chacun de ces éléments, on procède de façon assez subjective. Pour être rigoureux, il faudrait pouvoir calculer un rapport coût - bénéfice qui intégrerait les performances métrologiques et le coût de la méthode et, si plusieurs méthodes sont concurrentes, sélectionner celle qui a le rapport coût-bénéfice le plus favorable [1].

Toutefois et afin de sélectionner la méthode adéquate, des questions basiques, comme les suivantes, doivent être posées [2] :

- Quel est l'analyte (s) à chercher?
- Quelle est la nature de l'échantillon : les propriétés physiques et chimiques de l'échantillon?
- Quel est le niveau (s) de concentration de l'analyte (s) à chercher?
- Quel est le niveau d'exactitude nécessaire?
- Quelles sont les limites d'acceptation des performances de la méthode?
- Quels sont les autres constituants de l'échantillon qui sont généralement présents?
- Combien d'échantillons doit-on analyser?

En effet, il est primordial de connaître le plus d'informations possibles sur l'échantillon qui sera analysé. Les points simples et évidents à résoudre peuvent être les éléments attendus dans l'échantillon (les excipients, les contaminants, les produits secondaires, les produits de dégradation, les métabolites, ...), les composants d'intérêt, les caractéristiques telles que la volatilité de l'échantillon, les solvants possibles, la présence d'acides et / ou de bases, l'historique de l'échantillon, comme des détails sur la synthèse. Les réponses à ces questions

aident à sélectionner la méthode appropriée. Les propriétés chimiques du composé en cours d'analyse sont aussi extrêmement importantes pour la sélection de la méthode. Celles-ci peuvent inclure, mais ne sont pas limitées à, la présence de groupes fonctionnels (chromophores), ionisation, et la polarité. [2]

La méthode de détection la plus couramment utilisée dans le domaine pharmaceutique pour la détection des substances médicamenteuses contenant un ou plusieurs chromophores comme groupes fonctionnels est la spectrophotométrie UV/Visible. Les techniques de détection avec une plus grande sélectivité et sensibilité comme les techniques électrochimiques, de fluorescence et la détection par spectrométrie de masse peuvent également être considérées quand la détection directe est jugée inappropriée. Parfois, une modification chimique ou une dérivation peut être utilisée pour l'analyse d'un composé médicamenteux dépourvu de tout chromophore.

Si l'analyse quantitative est souhaitée, des critères importants tels que la spécificité/sélectivité de la méthode concernant les interférences possibles, la limite de détection, l'intervalle de dosage, le seuil de quantification, la fidélité, la justesse, l'exactitude, les méthodes d'échantillonnage (gaz, liquide, solide), la préparation des échantillons (extraction en phase solide, la digestion, etc.), la vitesse, l'automatisation, la facilité d'utilisation, l'efficacité, le coût, peuvent être utiles pour orienter la sélection de la méthode. [2]

### III. Développement et optimisation

Une fois la méthode est sélectionnée, il est souvent nécessaire d'effectuer plusieurs expériences pour l'optimiser. Cette optimisation de la méthode peut être très complexe. En effet, en raison du nombre important des paramètres impliqués dans le développement des méthodes d'analyse, il est difficile de trouver l'ensemble des niveaux optimaux des paramètres de la méthode analytique.

Généralement, pour optimiser les conditions opératoires d'une méthode analytique, les plans d'expériences, notamment la méthodologie des surfaces de réponse, sont utilisés [5]. Les plans d'expériences étant des outils de la chimiométrie [1], Ils ont pour objectif de fournir à l'analyste, moyennant un nombre d'expériences restreint, un maximum d'informations pertinentes pouvant expliquer certains effets et prédire les réponses étudiées.

Dans la méthodologie des plans d'expériences, tous les facteurs considérés sont étudiés simultanément. La stratégie consiste à réaliser les expériences de manière programmée et raisonnée, en faisant varier les niveaux de tous les facteurs à la fois [6-7]. Le meilleur moyen pour y parvenir, tout en expliquant les phénomènes observés et en exploitant les résultats obtenus, est l'utilisation des outils mathématiques combinés aux outils statistiques ; ce qui rend complexe leur mise en œuvre. Cela n'est possible que par l'utilisation des logiciels développés qui rendent le travail accessible et rapide [4].

Plusieurs types de plans sont définis pour réaliser les expériences et sont décrits dans la littérature [8-9]. Cependant, pour le choix d'un plan adéquat, il y a un certain nombre de 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 [4].

*(Cf Chapitre plans d'expérience ou il est décrit les principaux plans utilisés en optimisation).*

L'application des plans d'expérience pour l'optimisation des méthodes permettra non seulement de trouver les niveaux de facteurs qui répondront le plus adéquatement au problème analytique rencontré, mais Il fournira également un outil pour obtenir l'optimisation robuste de la méthode analytique. Cela correspond adéquatement à la demande de l'CH Q2R1

[10]: "L'évaluation de la robustesse se fait durant la phase de mise au point; elle dépend du type de méthode considérée. Cette évaluation doit démontrer que la méthode demeure fiable lorsqu'on introduit des variations planifiées de paramètres ". En effet, la surface de réponse permettra de trouver une région dans le domaine expérimental où de légères modifications délibérées des paramètres n'affectent pas les réponses étudiées.

Ce type d'optimisation de méthode permet d'éviter l'étude de vérification de la robustesse qui est parfois exigée par les agences sanitaires d'enregistrement des médicaments après le processus de validation dans le cadre d'une nouvelle demande d'enregistrement ou lors de dépôt des dossiers d'Autorisation de mise sur le marché (AMM) (*voir chapitre robustesse*). [2]

#### **IV. La validation**

L'objectif de la validation est de démontrer que la méthode employée permet d'atteindre des objectifs techniques définis à l'avance. La clause 5.4.5.1 de la norme ISO 17025 : 2005 [11] donne une définition de la validation : « La validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » [1]. Elle ne doit intervenir qu'après la mise au point complète de la méthode.

Une distinction entre validation interne et externe peut être faite. La première est universelle et requise pour toutes les méthodes développées, la seconde est surtout applicable aux méthodes qui seront utilisées par plusieurs laboratoires ou dont les résultats servent lors d'échanges commerciaux ou de contrôles officiels.

Le domaine de la validation des méthodes analytiques est défini par plusieurs textes Réglementaires ou des guidelines tels que l'ICH [10], la FDA [12], EURACHEM [13], IUPAC [14], AOAC [15]. Ces derniers définissent les critères de validation à tester, mais ne proposent pas des approches expérimentales et se limitent surtout à des notions générales [2]. Pour ces raisons, plusieurs méthodologies pratiques ont été proposées [16-17] afin d'aider les analystes à valider leurs procédures d'analyse. Ces guides ont grandement contribué à faire progresser la validation des méthodes d'analyses. Le premier guide de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) [16] confronte l'analyste à un grand nombre de tests statistiques qui compliquent parfois sa décision, au lieu de la rendre aisée. Cette confusion entre les règles de diagnostic et de décisions se trouve également dans le deuxième guide SFSTP [18] consacré aux procédures de bioanalyse. Pour cette raison, le récent guide SFSTP [17] visait à aligner les objectifs de la validation en fonction des objectifs de la procédure analytique. Il insiste également sur la validation de la procédure analytique telle qu'elle sera utilisée en routine. Enfin, il fournit une règle de décision simple en utilisant les intervalles de tolérance (*cf.* IV.4.d .L'approche de l'erreur totale ou Profil d'exactitude).

Ce guide a également pour but de proposer un consensus sur les normes généralement reconnues, tout en intégrant largement la terminologie de l'ISO [19]. Il a aussi présenté une stratégie expérimentale pour la validation des méthodes d'analyse, indépendante du secteur

industriel, utilisant au mieux les expériences réalisées afin d'extraire un maximum d'informations à partir des résultats et de minimiser les risques de ré-analyse des échantillons de routine [20]. Cette approche devrait donc réduire considérablement le risque d'accepter une méthode qui ne donnerait pas des résultats suffisamment exacts ou, au contraire, de rejeter une procédure qui peut être appropriée. La notion de profil d'exactitude proposée dans ce guide SFSTP peut être étendue aux autres secteurs d'activité, tels que l'environnement ou l'agroalimentaire.

## 1. Critères de validation

Les principaux critères de validation sont ceux qui sont décrits par les textes réglementaires ou les guidelines et s'articulent comme suit :

- Spécificité ou sélectivité,
- Fonction de réponse (courbe d'étalonnage),
- Linéarité,
- Fidélité (Répétabilité et Fidélité intermédiaire),
- Justesse,
- Exactitude,
- Limite de détection (LD),
- Limite de quantification (LQ),
- Intervalle de dosage,
- Robustesse.

Des définitions détaillées de ces critères peuvent être retrouvées dans la partie « *IV.4.d .L'approche de l'erreur totale ou Profil d'exactitude* », et vu l'importance de la robustesse dans le cycle de vie des méthodes analytiques un chapitre entier sera dédié à ce paramètre.

Il est également important de préciser qu'à l'heure actuelle, il n'y a toujours pas de convergence entre les différents documents réglementaires (ISO, ICH, Afnor, Sanco, FDA, Conférence de Washington, etc.) quant à la définition des critères de validation à tester.

C'est ainsi que la notion de linéarité apparaît ou non et que son interprétation peut varier d'un document à l'autre. Il en va de même avec la justesse qui, selon les documents, est

confondue avec l'exactitude. Pour éviter cela, la nomenclature issue des normes ISO a été choisie, dans le dernier guide SFSTP [17], comme référentiel principal pour la définition des critères de validation.

## 2. Objectifs de la procédure d'analyse

L'objectif d'une procédure analytique quantitative est de pouvoir quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à déterminer. En d'autres termes, ce que tout analyste attend d'une procédure analytique, c'est que la différence entre le résultat rendu ( $x$ ) et la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon ( $\mu_T$ ), qui par ailleurs restera toujours inconnue, soit petite ou du moins inférieure à une limite d'acceptation, c'est-à-dire [17] :

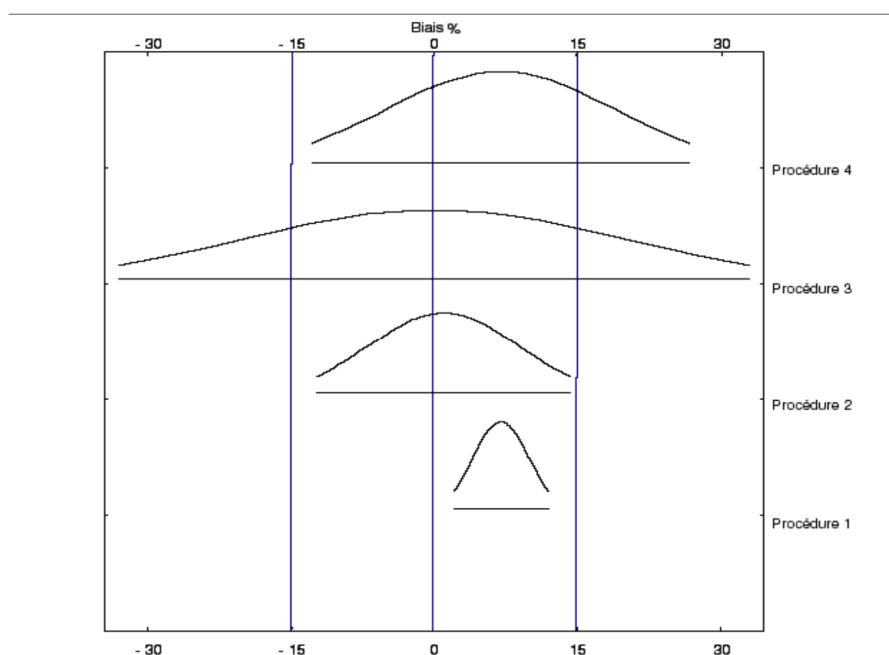
$$-\lambda < x - \mu_T < \lambda \Leftrightarrow |x - \mu_T| < \lambda$$

Avec  $\lambda$  la limite d'acceptation, qui peut être variable selon les exigences de l'analyste ou la finalité de la procédure analytique, laquelle est liée aux exigences communément admises par la pratique professionnelle (par exemple : 1 à 3% sur des matières premières, 5% sur des spécialités pharmaceutiques, 15% en bioanalyse, etc.). Deux principes fondamentaux apparaissent: d'une part, une notion de limite d'acceptation des performances d'une procédure analytique, d'autre part, et de manière implicite, celle de la responsabilité de l'analyste dans la décision d'accepter ou non une procédure en fonction de ses performances et de l'usage pour lequel elle est prévue.

Par ailleurs, toute procédure analytique (méthode de dosage) se caractérise par un "vrai biais"  $\mu_M$  (erreur systématique), et une "vraie fidélité"  $\sigma^2_M$  (erreur aléatoire mesurée par un écart-type ou une variance) (voir annexe 2). Ces deux paramètres sont propres à toute procédure analytique et sont tout aussi inconnus que la "vraie valeur" de l'échantillon à déterminer. En fait, les expériences réalisées en phase de validation permettent d'obtenir des estimateurs de ce biais et de cette variance (fidélité) qui seront d'autant plus fiables que les expériences effectuées sur des échantillons connus – les standards de validation (SV) - seront adéquates, c'est-à-dire que le plan d'expériences et le nombre d'essais seront appropriés. Ces

estimateurs de biais et de variance ne sont pas une fin en soi, ils constituent une étape intermédiaire obligatoire pour pouvoir évaluer si la procédure analytique va vraisemblablement pouvoir ou non quantifier avec une exactitude suffisante chacune des quantités inconnues, c'est-à-dire remplir son objectif.

La Figure 3 illustre graphiquement les concepts précédents ainsi que l'équation en dessus. Cette figure présente la répartition de 95% des mesures fournies par quatre méthodes analytiques différentes ayant chacune un vrai biais  $\mu_M$  et une vraie fidélité  $\sigma_M^2$  ainsi qu'une limite d'acceptation  $\lambda$  commune. Dans cette illustration, cette limite vaut 15%, ce qui est un choix classique pour les procédures bio-analytiques [12].



**Figure 3 : Exemples de procédures ayant la même limite d'acceptation  $\lambda = 15\%$ . Le biais est exprimé en % d'écart à la valeur vraie et la fidélité comme un coefficient de variation.**

Comme l'illustre la Figure 3, la procédure 3 (0% de biais, 20% CV de fidélité) ne remplit pas son objectif puisqu'elle fournit une trop grande proportion de mesures qui s'écarte de plus de 15% de la véritable valeur des échantillons, c'est-à-dire une trop grande proportion de mesures en dehors des limites d'acceptation de  $\lambda = \pm 15\%$ . Cette dernière procédure se caractérise par un biais  $\mu_M$  négligeable et par une fidélité  $\sigma_M^2$  insatisfaisante. La procédure 4

ne remplit pas non plus son objectif. Une proportion trop importante de mesures sort des limites d'acceptation fixées. Notons cependant que la procédure 4 se caractérise par un biais de +7% et une fidélité de 12% qui sont individuellement inférieurs à 15%, comme l'exige la FDA [12].

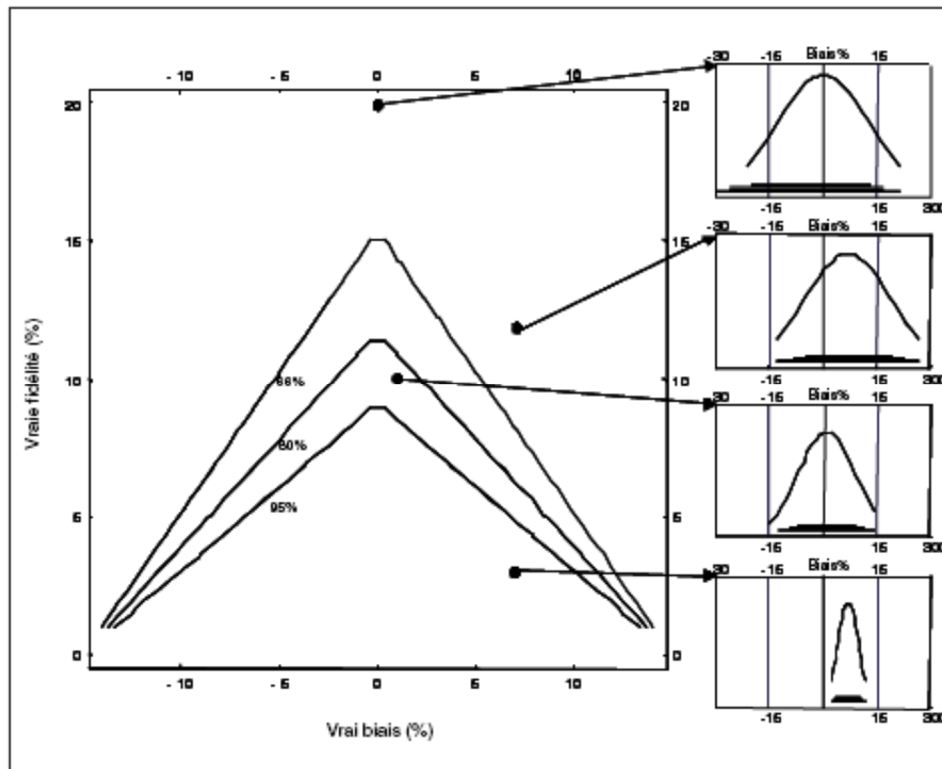
En revanche, les procédures 1 et 2 atteignent les objectifs fixés. Nous pouvons donc les retenir et conclure à leur validité en fonction de l'objectif fixé a priori. En effet, elles permettent de garantir la présence d'au moins 95% de résultats corrects à l'intérieur des limites d'acceptation. Pourtant, en examinant plus attentivement la Figure 3, on notera que la procédure 1 présente un biais de +7%, inférieur à la limite d'acceptation, mais très fidèle (3% CV). La procédure 2, au contraire, se caractérise par un biais négligeable (+1%) mais moins fidèle (8% CV).

Les différences entre ces deux procédures importent peu car nous avons bien dans les deux cas la garantie que les résultats fournis ne seront jamais trop éloignés des vraies valeurs à quantifier. La qualité des résultats est de loin plus importante que les caractéristiques intrinsèques de la procédure en termes de biais ou de fidélité.

Mais vouloir atteindre cet objectif très exigeant a un coût considérable, généralement trop élevé pour être une stratégie acceptable pour un analyste qui ne dispose généralement que de peu de temps. Dès lors, pour réduire ce coût, il va devoir prendre des risques qu'on voudra minimum (ou tout au moins compatibles avec les objectifs analytiques). Pour maîtriser ce risque, on peut inverser le raisonnement et fixer d'emblée une proportion maximale acceptable de mesures qui pourront sortir des limites  $\pm \lambda$ , comme par exemple 5 % des mesures ou 20 % des mesures au maximum en dehors des limites d'acceptation. Cette proportion représente donc le risque que l'analyste est prêt à prendre.

Ainsi, tel que l'illustre la Figure 4 sur la base du "vrai biais"  $\mu_M$  et de la "vraie fidélité"  $\sigma_M^2$ , paramètres qui, rappelons-le, caractérisent toute procédure analytique et qui sont tout aussi inconnus que la "vraie valeur"  $\mu_T$  de l'échantillon à déterminer, les limites d'acceptation des performances de la procédure en fonction de son utilisation permettent de définir un espace des procédures analytiques, pour un domaine d'activité donné, où se trouvent toutes les procédures analytiques acceptables : par exemple  $\pm 15\%$  en bio-analyse suite à la convention

de Washington. C'est dans cet espace donc qu'il faudra chercher la "bonne procédure analytique" et ce, en fonction de la proportion de mesures que l'analyste désire avoir dans les limites d'acceptation (par ex : 95%, 80% ou 66%). Dans le cas présenté dans la Figure 4, le triangle intérieur représente la zone de toutes les procédures analytiques pour lesquelles on souhaite que 95% des résultats  $x$  soient compris dans les limites d'acceptation que l'analyste s'est fixé en fonction des contraintes de son domaine d'activité.



**Figure 4 : Limites d'acceptation des performances d'une procédure en fonction de son « vrai biais » (%) et de sa « vraie fidélité » (CV, %) [17].**

### **3. Objectif de la validation des méthodes :**

L'objectif de la validation est de donner aux laboratoires ainsi qu'aux autorités compétentes les garanties que chaque mesure qui sera réalisée ultérieurement en routine, une fois la procédure validée, sera suffisamment proche de la "vraie valeur" inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable, en fonction de la finalité de la procédure. Le but est de minimiser le risque tant au niveau du producteur que du futur consommateur. Par conséquent, et contrairement à ce que la pratique courante peut laisser penser, l'objectif de la validation n'est pas simplement, d'obtenir des estimateurs du biais et de la fidélité. Il n'en demeure toutefois pas moins que ces paramètres, sont, comme nous l'avons déjà signalé, des éléments indispensables à l'établissement des garanties précitées.

### **4. Les règles de décision**

Puisque les documents réglementaires relatifs à la validation des méthodes sont à caractères global, ils laissent une place à l'interprétation des analystes qui pourront alors choisir la règle de décision qui permettra de déclarer valide une méthode d'analyse.

Selon le processus de décision adopté, nous pouvons distinguer entre 3 approches statistiques conventionnelles, se caractérisant toutes par le fait qu'ils comparent séparément la justesse et la fidélité, c'est-à-dire respectivement les erreurs systématique et les erreurs aléatoires de la méthode. Nous distinguons aussi une quatrième approche qui s'intéresse à la combinaison des erreurs systématique et aléatoire dans le concept d'erreur totale. Etant donné que les trois premières approches ont été largement appliquées et décrites dans la littérature, nous allons brièvement les présenter, et nous nous arrêterons plus sur l'approche par le profil d'exactitude vue son adaptation face aux enjeux de la validation.

1.1 L'approche descriptive [21,28],

1.2 L'approche de différence [22, 21, 23,28],

1.3 L'approche d'équivalence [22; 21-24].

1.4 L'approche par l'erreur totale ou profil d'exactitude [17,20,25,26-27,29]

### 1.1. L'approche descriptive :

L'approche descriptive utilise seulement des estimations des paramètres statistiques : Biais et fidélité intermédiaire [21].

Les valeurs estimées de chaque critère sont calculées à chaque niveau de concentration des standards de validation et sont comparées aux limites d'acceptation fixées à priori.

### 1.2. L'approche de différence

L'approche de différence est basée sur les tests d'hypothèses comme le test de Student [22, 21, 23].

Les tests des hypothèses statistiques sont composés de deux hypothèses mutuellement exclusives, à savoir l'hypothèse nulle  $H_0$  et l'hypothèse alternative  $H_1$ .

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 en dessous. Ceci peut être vérifié en comparant l'intervalle de confiance à 95 % du biais global estimé à la valeur 0% de biais relatif.

*Hypothèse nulle :*

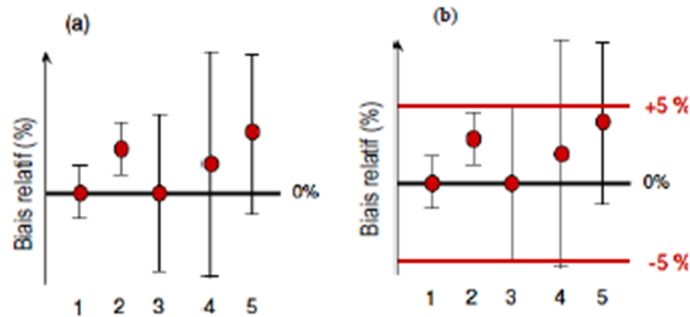
**$H_0 : \text{biais} = 0 \leq \text{biais relatif} = 0 \% \leq \text{recouvrement} = 100 \%$**

*Hypothèse alternative :*

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

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

Si cet intervalle contient 0 % de biais, la justesse de méthode est acceptée, sinon, elle devrait être rejetée comme illustré dans la Figure 5 (a).



**Figure 5 : Les règles de décisions de validité des méthodes analytiques pour 5 situations différentes (1 à 5) selon le biais relatif de la méthode ; (a) l’approche de différence du biais relatif, (b) l’approche d’équivalence du biais relatif avec les limites de décision fixées à 5%**

### 1.3. L’approche d’équivalence

L'approche d'équivalence diffère des précédentes par le fait qu’au lieu de vérifier si le biais relatif estimé ou le CVFI estimé est inclus dans les limites d'acceptation, elle vérifie si la vraie valeur de ces paramètres est incluse dans leurs limites d'acceptation respectives, cela pour chaque niveau de concentration des standards de validation étudiées comme le montre la Figure 5 (b).

Cela consiste à comparer des intervalles de confiance des paramètres étudiés aux limites d'acceptation [24].

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

L'hypothèse statistique de ce test est maintenant :

$$\mathbf{H01 : Biais\ relatif \leq -\Delta \text{ vs } H11 : biais\ relatif > -\Delta}$$

Et

$$\mathbf{H02 : Biais\ relatif \geq \Delta \text{ vs } H12 : biais\ relatif < \Delta}$$

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

Comme illustré par les deux lignes horizontales représentant les limites de décision de  $\pm 5\%$  au niveau de la Figure 9b, 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 2% et qui doit être plus petite que cette valeur maximale.

#### **1.4. L'approche de l'erreur totale ou Profil d'exactitude**

A côté de ces approches classiques, il est possible de proposer cette méthodologie alternative basée sur le profil d'exactitude en utilisant les intervalles de tolérance statistique et l'erreur totale de mesure comme outil de décision unique [17, 20,26,27]. Cette méthode serait mieux adaptée aux enjeux de la validation, à savoir la satisfaction des besoins des clients, tout en contrôlant le risque du laboratoire. On peut la résumer en trois points :

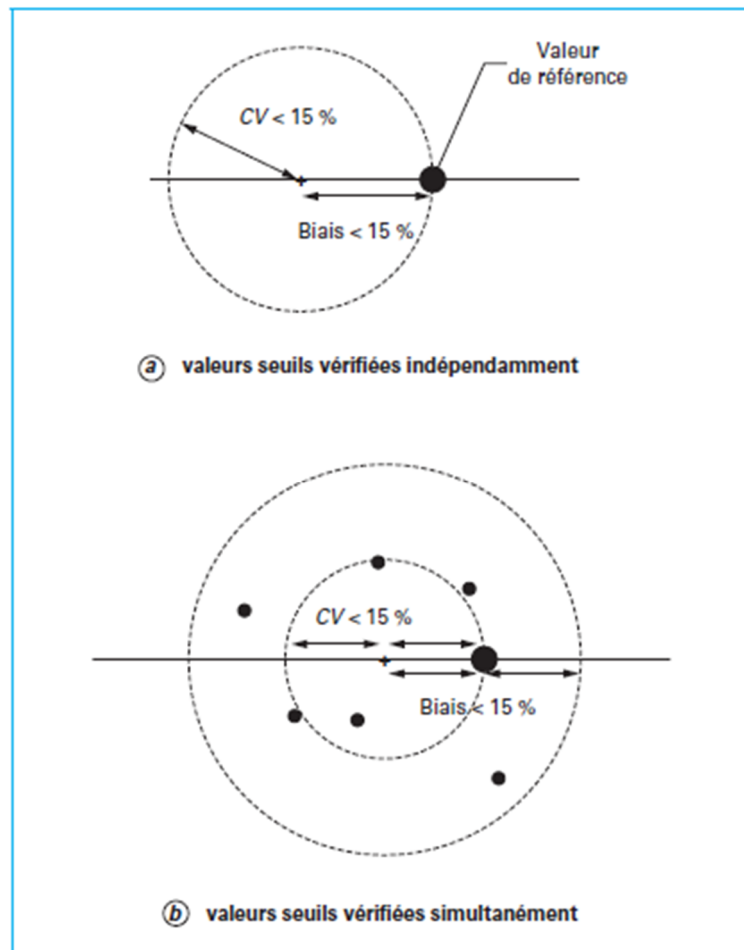
- fixer un objectif global de performance relatif à l'exactitude de la méthode, appelé intervalle d'acceptabilité ;
- produire des preuves expérimentales qui servent pour calculer des paramètres que l'on va combiner pour évaluer l'exactitude ;
- vérifier si ces preuves sont en adéquation avec l'objectif global.

Pourquoi fixer un objectif de validation unique et global et non pas des objectifs, critère par critère, comme cela se fait couramment ? Nous allons répondre par l'exemple suivant.

Exemple : prenons une méthode pour laquelle la fidélité, exprimée sous la forme d'un CV de reproductibilité, doit être inférieure à 15 % et la justesse, mesurée par un biais relatif absolu, doit elle aussi être inférieure à 15 %. La figure 6 illustre les contraintes ainsi imposées.

Selon la stratégie classique, la méthode est validée si chacune de ces contraintes est vérifiée indépendamment l'une de l'autre (le cas de la procédure 4 dans la figure 3). On voit ainsi qu'on peut accepter comme conformes des résultats qui diffèrent jusqu'à 30 % de la

valeur de référence quel que soit le test, ce qui semble cohérent : ce qu'illustre le cercle pointillé de la figure 2a. Mais, en réalité, ces contraintes s'ajoutent et le biais de justesse peut être positif ou négatif. La figure 2b montre qu'en fait on peut être amené à accepter des résultats qui diffèrent jusqu'à 45 % de la valeur de référence ! On débouche alors sur des tests qui se contredisent et on pourra conclure à la conformité de la fidélité, mais plus à celle de la justesse.



**Figure 6 : Interprétation géométrique des valeurs seuils pour la fidélité et la justesse**

L'éclatement des objectifs « critère par critère » nuit à la clarté de l'enjeu. Il semble donc préférable de proposer un critère unique qui caractérisera un résultat et pas seulement la méthode. En effet, ce qu'on attend d'une procédure de dosage c'est qu'elle soit capable de quantifier correctement un échantillon, et non pas tellement qu'elle soit fidèle ou juste, même si une bonne fidélité et une bonne justesse constituent souvent (mais pas obligatoirement) des gages de réussite. Ainsi, qu'importe que la méthode ne soit pas très juste, si elle est apte à produire un résultat qui soit globalement acceptable pour les objectifs du client ? Nous proposons d'appeler ce critère global l'intervalle d'acceptabilité [17, 20,26,27].

L'objectif de la validation n'est donc pas simplement, contrairement à ce que la lecture de certains guides de validation peut porter à croire, d'obtenir des estimations correctes de la justesse et de la fidélité. Il paraît raisonnable de prétendre que l'objectif est de répondre aux besoins du client – demandeurs d'analyse ou autorités de contrôle – c'est-à-dire :

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

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

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

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

On peut proposer une formalisation mathématique de ces deux notions. Si l'on appelle Z le résultat fourni en routine et X la valeur vraie de l'échantillon, la notion de « suffisamment proche » peut s'écrire sous la forme suivante :

$$-\lambda < Z - X < +\lambda$$

Les quantités  $-\lambda$  et  $+\lambda$  représentent ces « distances raisonnables » maximales qu'un client est prêt à accepter. Elles forment ce que nous appelons l'intervalle d'acceptabilité. Si ces distances sont les mêmes de chaque côté de la valeur vraie, l'intervalle est symétrique et l'équation précédente devient :

$$|Z - X| < \lambda$$

Elle peut aussi s'écrire sous la forme d'un écart relatif :

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

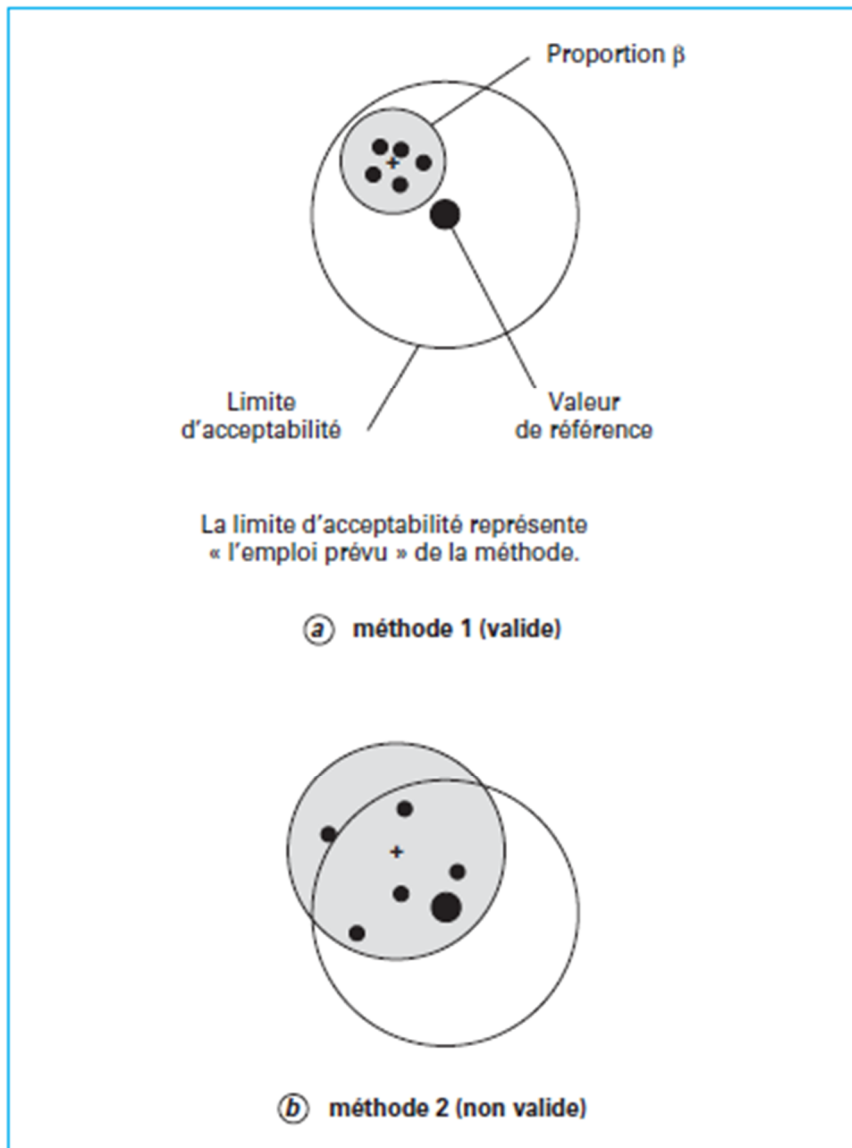
Quant à l'idée de « fournir une garantie », elle peut s'écrire sous la forme d'une probabilité supérieure ou égale à une proportion  $\beta$  :

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

L'objectif de performance globale, noté  $\lambda$ , est appelé la (ou les) limite(s) d'acceptabilité de la méthode. Il est défini par le client et non pas par l'analyste et correspond à la performance attendue de la méthode en termes d'exactitude. Rappelons que l'exactitude combine justesse et fidélité (voir paragraphe ci-après « *critère d'exactitude* »).

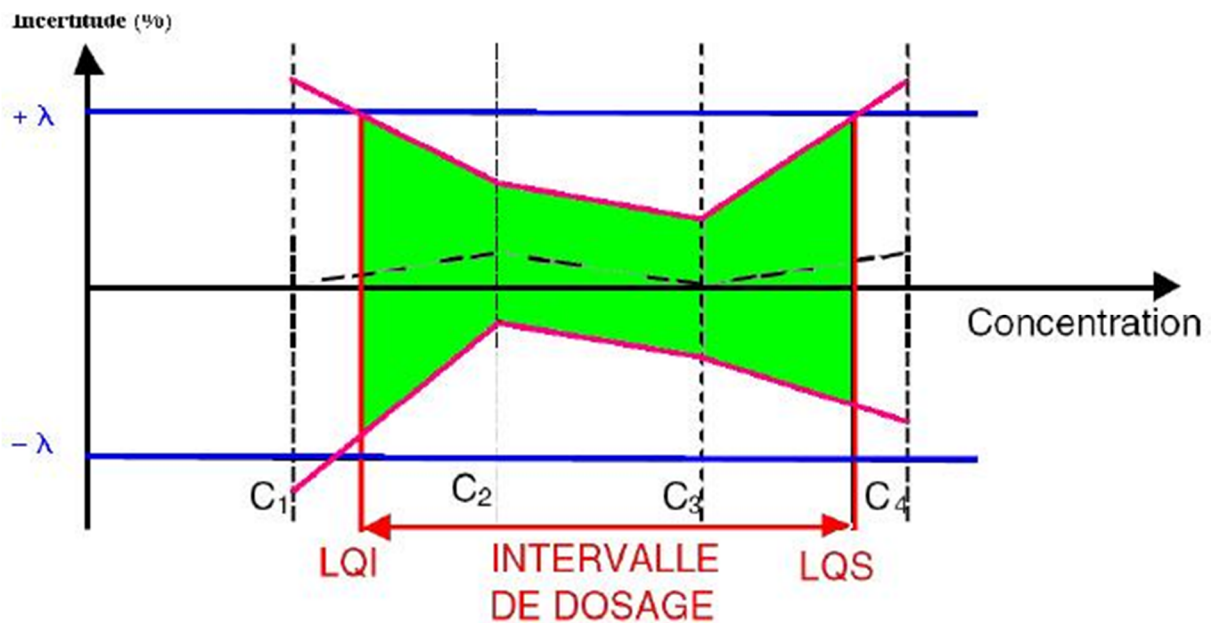
Finalement, ce dont on a besoin, c'est d'un outil statistique permettant de prédire entre quelles limites se situera une proportion  $\beta$  de futurs résultats pour vérifier si ce nouvel intervalle se situe bien entre les limites d'acceptabilité [17,20]. Cet outil existe, il s'agit de l'intervalle de tolérance moyen de probabilité ou intervalle de prédiction. Il a été introduit dès les années 1940 pour construire les cartes de contrôle très largement utilisées aujourd'hui pour le contrôle statistique des procédés industriels (et qui présentent un moyen de suivre les méthodes analytiques en routine) [30].

La figure 3 propose une interprétation graphique de la démarche. Le cercle grisé délimite la zone dans laquelle se situe la proportion  $\beta$  % moyenne attendue de futures mesures (intervalle de tolérance moyen de probabilité  $\beta$ ). Quant à la limite d'acceptabilité, elle est représentée par le grand cercle centré autour de la valeur de référence. La méthode 1 est valide parce qu'elle est capable de produire une proportion suffisante de futures mesures qui se situeront à l'intérieur de la zone d'acceptabilité. Par contre, la méthode 2 n'en n'est pas capable.



**Figure 7 : les concepts de base de la validation : valeur vraie, incertitude et limite d'acceptabilité**

La méthode du profil d'exactitude, décrite en détail dans les parties qui suivent, consiste d'abord à collecter des mesures, sous condition de fidélité intermédiaire (voir définition dans la partie « critère de fidélité ») pour tenir compte de toutes les sources d'incertitude, puis, à calculer les limites de tolérance moyenne de probabilité et à les comparer aux limites d'acceptabilité. Puisqu'il convient de valider une méthode pour l'ensemble de son domaine d'application, la démarche est généralisée à divers niveaux de concentration, afin de tenir compte de la relation connue entre la fidélité et la concentration. Finalement, une seule illustration graphique permettra de décider de la validité de la méthode sans qu'aucun test d'hypothèse ne soit effectué (voir la figure suivante).



**Figure 8 : Illustration du profil d'exactitude comme outil de décision.**

**LQI : limite de quantification inférieure, LQS : Limite de quantification supérieure**

• **Critère de justesse**

- Critères en relation avec la justesse :

**Justesse** : étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence.

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

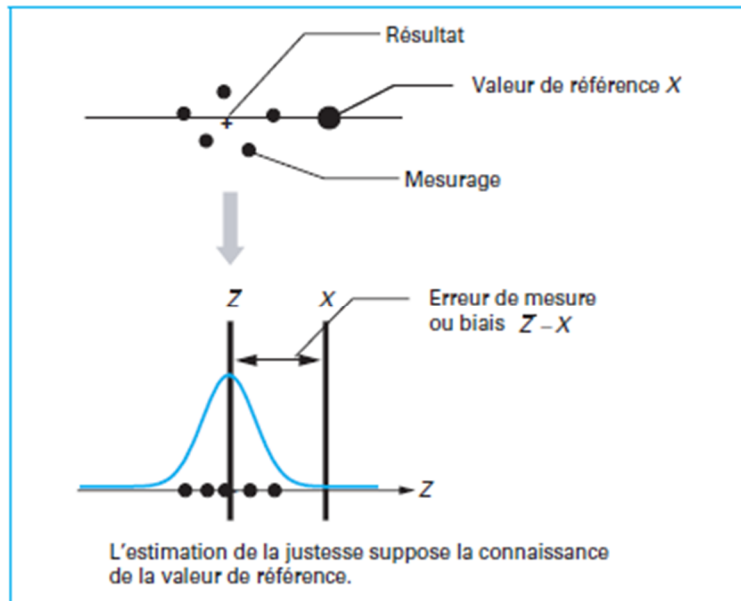
**Valeur de référence** : valeur d'une grandeur, dont l'incertitude de mesure associée est considérée communément comme suffisamment petite pour que la valeur puisse servir de base de comparaison pour les valeurs de grandeurs de même nature (valeur vraie ou valeur cible).

**Spécificité** : capacité d'une méthode à mesurer un analyte particulier dans un échantillon sans que cette mesure soit faussée par d'autres composants de l'échantillon.[31]

L'estimation de la justesse implique qu'on soit capable de définir une valeur de référence. À la place, on parle aussi de valeur vraie, par analogie avec les modèles proposés par les statisticiens ou les métrologues ; nous utiliserons aussi le terme de valeur cible que l'on désignera par X.

La figure 9 est une représentation graphique de la définition de la justesse. Chaque mesurage, ou répétition, est représenté par un petit point. Le résultat, tel qu'il est défini et tel qu'il sera rendu au demandeur d'analyse, est illustré par une croix située au milieu du nuage de points formé par les mesurages.

Une idée classique, consiste à dire que le meilleur résultat est représenté par le centre de gravité du nuage de points, c'est-à-dire, lorsqu'on passe au modèle statistique, la moyenne arithmétique. Mais cela voudrait dire qu'il faut faire des répétitions pour fournir un résultat, ce qui n'est pas tenable économiquement dans bien des cas.



**Figure 9 : Estimation de la justesse**

En fait, on ne mesure pas la justesse mais on estime un biais de justesse défini par  $Z - X$ , la justesse est alors estimée comme une erreur de mesure moyenne. On pourra aussi calculer le biais de façon relative, sous la forme  $100 \cdot (Z - X)/X$ . Une autre forme possible est  $R = 100 \cdot (Z/X)$  qui s'interprète comme un taux de recouvrement, à savoir « le pourcentage de la quantité d'analyte exprimée par la méthode (ou expérimentalement retrouvée) par rapport à la quantité d'analyte réellement présente ».

Les autres critères introduits ici, comme la spécificité ou la sélectivité, sont plutôt qualitatifs. En fait, il est assez évident qu'ils sont à l'origine d'un manque de justesse et participeront quantitativement à ce qu'on appelle globalement l'erreur de mesure ou erreur totale.

- **Critère de fidélité**

- Principaux termes en relation avec la fidélité

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

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

**Répétabilité** : fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de répétabilité.

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

**Fidélité intermédiaire** : fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de fidélité intermédiaire.

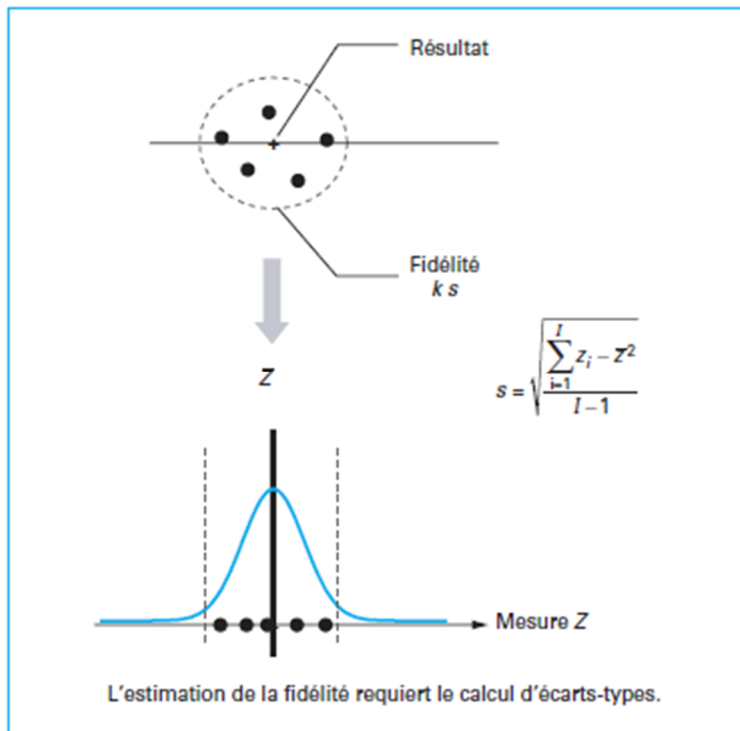
**Condition de reproductibilité** : condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent des lieux, des opérateurs et des systèmes de mesure différents, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires.

**Reproductibilité** : fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de reproductibilité. [31]

Malgré la similitude entre les premiers mots des définitions de la justesse et de la fidélité, la fidélité est un critère qui quantifie la dispersion des mesurages sans faire intervenir la valeur de référence, alors que la justesse caractérise un décalage par rapport à la valeur de référence. La fidélité est toujours évaluée au moyen d'écart-types.

La figure 10 illustre le concept de fidélité selon les mêmes conventions que la figure 9. Sur ce graphique, la valeur de référence  $X$  n'apparaît plus puisqu'elle n'est plus utile pour expliquer la définition ; l'estimation d'une fidélité ne demande pas de connaître la valeur de référence du mesurande.

Le cercle pointillé est une représentation graphique obtenue en combinant un écart-type de fidélité  $s$  et un coefficient  $k$  appelé facteur d'élargissement ; le rayon de ce cercle est égal à  $k \times s$ . Un facteur d'élargissement est un coefficient supérieur à 1 par lequel on multiplie un écart-type pour prendre en compte une probabilité.



**Figure 10 : Estimation de la fidélité**

Si on peut choisir entre différentes valeurs du facteur d'élargissement pour traduire une dispersion, on peut aussi avoir différents écarts-types : c'est ce qui est défini comme conditions de répétabilité, de fidélité intermédiaire ou de reproductibilité. Le paramètre statistique utilisé pour estimer la fidélité est l'écart-type et, pratiquement, on peut calculer :

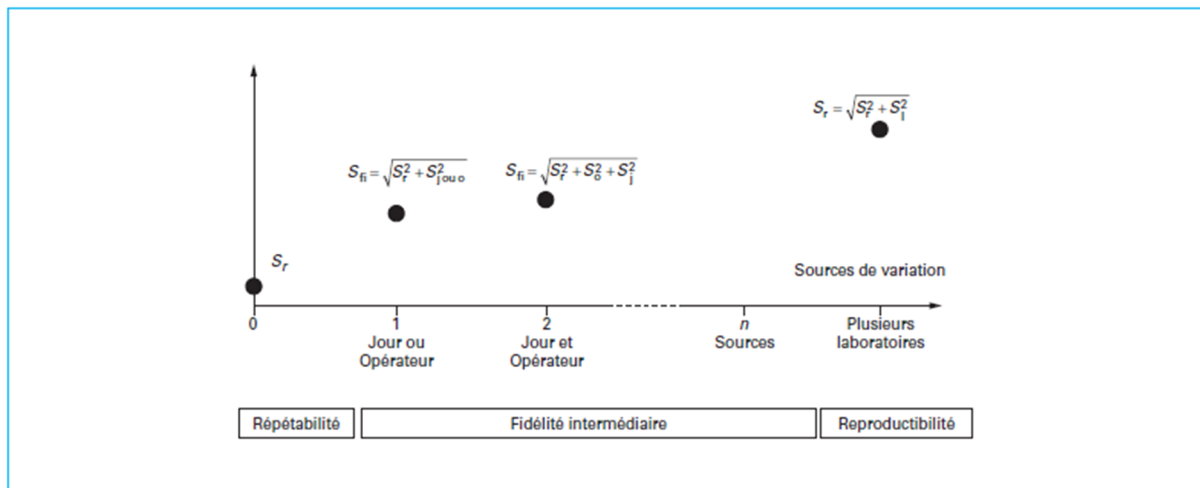
- un écart-type de répétabilité, noté  $S_R$  ;
- un écart-type de fidélité intermédiaire, noté  $S_F$  ;
- un écart-type de reproductibilité, noté  $S_R$  .

Cependant, on ne peut calculer un écart-type de reproductibilité que lorsque les mesures sont effectuées dans plusieurs laboratoires.

Le concept de fidélité intermédiaire, quoique moins connu, est très utile pour la validation interne des méthodes. Au sein d'un même laboratoire, dès qu'on va faire des mesurages en faisant varier les jours et/ou les opérateurs et/ou les réglages instrumentaux... on est en condition de fidélité intermédiaire.

La figure 11 résume sous forme graphique les différentes conditions d'estimation d'un écart-type de fidélité. L'échelle horizontale représente le nombre de sources de variation qui sont prises en compte. Par exemple, si on étudie la seule influence des opérateurs au sein d'un seul laboratoire, on est en condition intermédiaire de fidélité. Mais la situation peut rapidement devenir complexe, car il est possible de combiner plusieurs sources de variation, comme les opérateurs et les appareils : on débouche sur une fidélité intermédiaire opérateurs/appareils.

Les notations et les formules de calcul indiquées sur la figure 6 sont expliquées plus loin. Mais on peut remarquer que les écarts-types de fidélité intermédiaire et de reproductibilité incorporent tous la variance de répétabilité, notée  $S_r^2$ . Par définition, la répétabilité est toujours plus petite (ou égale) que la fidélité intermédiaire ou la reproductibilité.



**Figure 11 : Différentes conditions de mesure des écarts-types de fidélité**

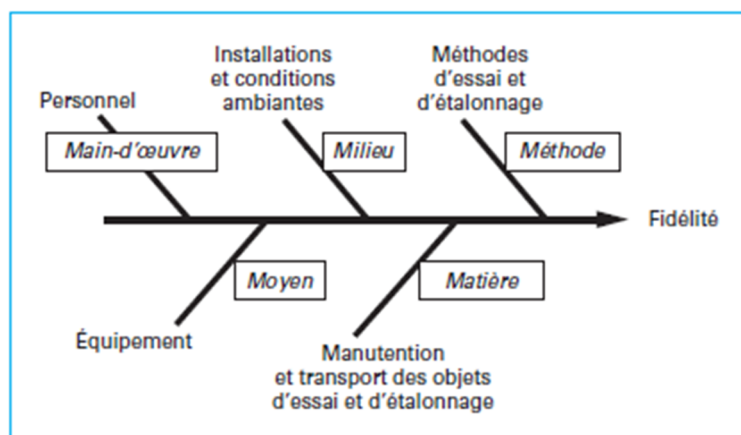
La fidélité est une mesure de l'amplitude avec laquelle une méthode disperse les répétitions ; or les causes de dispersion sont nombreuses. Ainsi, deux opérateurs qui appliquent la même méthode sur un même échantillon obtiendront des mesures différentes et on pourrait calculer au moins trois valeurs fidélité : une estimation globale, une estimation pour l'opérateur 1 et une autre pour l'opérateur 2.

La figure 12 présente un diagramme général de toutes les sources de variation qui peuvent jouer sur la dispersion des mesures dans un laboratoire. Il s'appuie sur les 5M « Matière, Main d'œuvre, Matériel (ou Moyen), Milieu, Méthode » et s'inspire de la méthodologie décrite dans le guide Eurachem pour lister les sources d'incertitude de mesure [32].

Cette classification permet de distinguer entre les trois « conditions » expérimentales d'estimation de la fidélité, déjà définies dans le début de ce paragraphe:

- condition de répétabilité : on fait en sorte qu'aucune source de variation autre que l'erreur aléatoire n'intervienne ;
- condition de reproductibilité : toutes les conditions changent, car on fait appel à plusieurs laboratoires ;
- conditions intermédiaires de fidélité : au sein d'un même laboratoire, on fait varier plusieurs sources, comme l'équipement, la date de mesure, l'opérateur.
- Pratiquement, la fidélité est mesurée par des écarts-types et on peut ainsi calculer :
  - l'écart-type de répétabilité, noté  $S_r$  ;
  - l'écart-type de reproductibilité, noté  $S_R$  ;
  - l'écart-type de fidélité intermédiaire, noté  $S_F$ .

Rappelons que le calcul d'un écart-type passe toujours par une étape préliminaire de calcul d'une variance et qu'on trouve sa formule de calcul dans la figure 10.



**Figure 12 : Principales sources d'erreur influençant la fidélité d'une méthode**

La procédure la plus simple, qui est généralement retenue pour établir un profil d'exactitude, consiste à effectuer des répétitions sur plusieurs jours sur le même échantillon.

Il se peut que d'autres opérateurs interviennent et que les réactifs et/ou l'échantillon à analyser évoluent, etc., on va ainsi pouvoir mesurer les effets de différentes sources de variation et simuler, en quelque sorte, les conditions effectives d'analyse. En effet, lorsqu'un échantillon arrive à la porte d'un laboratoire, sa date d'analyse n'est pas exactement prévisible, il en va de même pour l'opérateur qui s'en chargera, etc.

Pour certains types d'analytes difficiles à conserver, comme les comptages bactériens, cette solution peut être problématique. Par exemple, si le laboratoire analyse des échantillons très instables, comme des échantillons de sang non congelables, on ne peut plus utiliser le jour comme série. On va alors demander à plusieurs opérateurs de faire des répétitions sur un seul jour et si le laboratoire possède plusieurs appareils, de même modèle ou non, on va combiner l'opérateur et l'appareil. Dans le cas de 2 opérateurs et 2 appareils, on peut ainsi obtenir 4 séries, comme suit :

Série 1	Appareil 1	Opérateur 1
Série 2	Appareil 1	Opérateur 2
Série 3	Appareil 2	Opérateur 1
Série 4	Appareil 2	Opérateur 2

Une question classique qui se pose, quand il s'agit de préparer un plan d'expérience, est de savoir quel nombre de séries et quel nombre de répétitions il faut faire. Les justifications mathématiques de ces choix sont assez complexes.

D'une façon générale, on peut retenir que plus on augmente le nombre de séries, plus l'estimation de l'écart-type de fidélité intermédiaire sera bonne. Un nombre idéal se situerait à 8 mais, comme chaque essai a un coût et qu'il ne s'agit pas de déployer des efforts disproportionnés pour valider une méthode, un choix raisonnable se situe entre 5 et 3 séries. Mais le minimum est de 3. Par contre, le nombre de répétitions a peu d'influence et on peut choisir 2.

Le coefficient de variation (CV) de la fidélité intermédiaire (ou de la répétabilité) est défini comme le rapport de l'écart-type à la moyenne.

Les analystes aiment bien l'utiliser pour exprimer la performance d'une méthode. On peut y trouver plusieurs avantages :

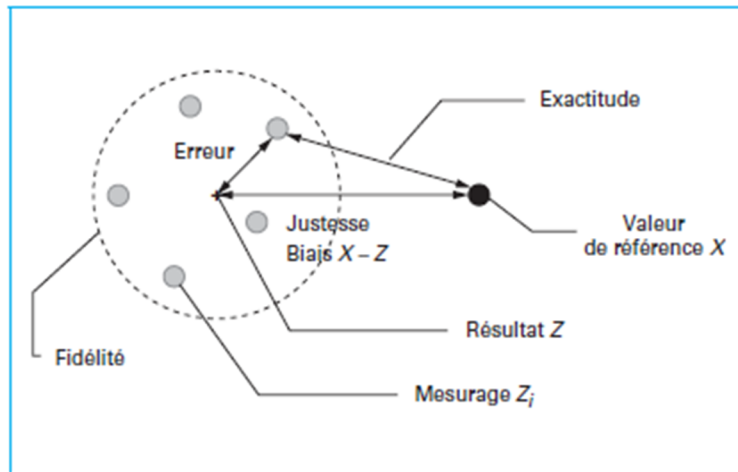
- il permet d'ajouter des sources de variation ;
- il est facile à calculer ;
- il permet de comparer facilement deux méthodes appliquées sur un même échantillon.

Malheureusement, ces avantages qu'on attribue au coefficient de variation sont souvent fallacieux :

- d'abord, pour une méthode donnée, le  $CV_F$  dépend de la concentration,[37]. Donc, si on l'utilise pour comparer des méthodes, il faut s'assurer qu'elles ont été appliquées sur des échantillons ayant des niveaux de concentrations proches
- ensuite, c'est une mesure relative qui dépend de deux paramètres : la moyenne et l'écart type. On peut facilement voir que, si l'écart-type est constant lorsque la moyenne varie, le coefficient de variation n'est pas constant
- enfin, il convient donc d'être très prudent vis-à-vis d'un CV car il peut masquer des situations très différentes et, tout compte fait, n'apporter que peu d'information.

#### • Critère d'exactitude

L'exactitude est définie comme une « combinaison » de la justesse et de la fidélité. La justesse est l'écart entre le résultat (moyenne) et la valeur de référence, la fidélité est la dispersion moyenne des mesurages autour du résultat et on peut la représenter comme un cercle qui contient une proportion connue des mesurages (sans entrer dans le détail de son calcul). L'exactitude caractérise l'écart entre un mesurage individuel et la valeur de référence. Selon les conventions déjà utilisées, la figure 13 propose une illustration schématique de l'exactitude et des divers critères de justesse et de fidélité déjà présentés.



**Figure 13 : Représentation schématique de l'exactitude**

Si l'on s'intéresse à un futur mesurage unique qui servira à fournir un futur résultat, on peut facilement voir que son exactitude combine la justesse et la fidélité. C'est pourquoi, on utilisera ce critère pour conduire une validation, sous la forme d'un profil d'exactitude.

• **Autres critères**

En ce qui concerne l'étalonnage, on fait souvent la distinction entre les méthodes directes qui ne demandent pas d'étalonnage et les méthodes indirectes qui doivent être étalonnées. Dans ce cas, l'analyte n'est pas exactement défini en termes de molécules clairement identifiées et n'est donc pas disponible sous la forme d'un étalon qu'on peut acheter dans le commerce.

Si la méthode requiert un étalonnage, on distinguera entre :

– l'opération d'étalonnage direct qui consiste à établir la fonction mathématique qui relie la réponse instrumentale Y et l'analyte X disponible sous la forme d'un produit pur ;

– l'étalonnage inverse qui consiste à prendre l'inverse de la fonction d'étalonnage pour prédire la concentration d'un échantillon. Si la fonction d'étalonnage est une droite  $Y = a_0 + a_1 X$ , son inverse est  $\bar{X} = (Y - a_0) / a_1$ . Pour simplifier les notations, nous appellerons Z la quantité prédite inverse  $\bar{X}$ .

Limite de détection (LD) : valeur mesurée, obtenue par une procédure opératoire donnée, pour laquelle la probabilité de déclarer faussement l'absence d'un constituant dans un matériau est  $\beta$ , étant donnée la probabilité  $\alpha$  de déclarer faussement sa présence.

On peut associer la limite de détection à l'instrument de mesure et plusieurs méthodes de calcul de ce critère proposent d'utiliser les coefficients du modèle d'étalonnage et leurs écarts-types pour obtenir une estimation de la LD.

Limite de quantification (LQ) : la plus petite concentration de l'analyte pouvant être quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. Sensibilité : mesure de l'amplitude de la variation de réponse instrumentale relativement à une variation de la quantité d'analyte.

Pour terminer, on peut évoquer la robustesse d'une méthode. Généralement, on l'évalue à l'aide d'un plan d'expérience. Voir Chapitre 3.

Note : Lors du calcul de la fidélité intermédiaire, si on constate un effet inter-séries élevé en comparaison de la répétabilité, on pourra conclure au manque de robustesse.

- Génération du profil :

Les bases théoriques du profil d'exactitude et les raisons de son introduction ont été décrites au-dessus. D'un point de vue pratique, c'est la combinaison, sous la forme d'un graphique, de plusieurs intervalles de tolérance calculés à partir de mesures réalisées sur des échantillons à différents niveaux de concentration et d'un intervalle d'acceptabilité. Cette méthode a fait l'objet de nombreuses publications dont certaines sont indiquées dans les références. Une normalisation complète de cette méthodologie a été réalisée, d'une part, par la Société des sciences et techniques pharmaceutiques (SFSTP) [17,26,27], d'autre part par l'Afnor [33]. Divers projets de normes ISO en cours de rédaction la reprennent.

Cette méthodologie s'appuie sur deux concepts complémentaires :

- la limite d'acceptabilité qui sert à chiffrer les objectifs de la méthode. C'est le seuil de performance globale fixé par l'utilisateur du résultat. La plupart du temps, elle s'exprime comme un pourcentage autour de la valeur de référence, par exemple  $\pm 10\%$  ;
- l'intervalle de tolérance qui délimite un intervalle dans lequel se trouvera une proportion moyenne  $\beta\%$  de futures mesures.

Et Elle peut se résumer par les 10 étapes suivantes :

1. Disposer du mode opératoire et définir le mesurande ;
2. Définir le domaine de validation (gamme de concentrations) et l'objectif attendu de la méthode sous la forme d'un intervalle d'acceptabilité ;
3. Sélectionner des échantillons de validation dont les valeurs de référence sont connues;
4. Choisir un plan d'expérience de validation ;
5. Pour les méthodes indirectes, choisir du plan d'expérience d'étalonnage ;
6. Collecter les données ;
7. Pour les méthodes indirectes, calculer les concentrations retrouvées par étalonnage inverse ;
8. Calculer les critères de validation à partir des concentrations retrouvées : principalement les écarts-types de fidélité et des biais de justesse ;
9. Calculer les intervalles de tolérance et construire le profil d'exactitude ;
10. Interpréter les résultats et décider si la méthode est valide ou non.

Note : - Les étapes 5 et 7 sont optionnelles dans le cas des méthodes qui fournissent directement la concentration retrouvée sans étalonnage.

- Pour choisir le plan d'expérience de validation nous vous préconisons de revenir vers le guide de la commission de la SFSTP [17]
- L'exploitation des données fait appel à des techniques statistiques qui demandent pas mal de calculs il est évident que l'application numérique devient un aspect fondamental de la validation. Or, le besoin d'un tableur qui permet parfaitement de réaliser ces calculs s'exprime.

La méthodologie du profil d'exactitude a déjà connu un grand nombre d'applications [27,34,35, 36,37]. On peut tirer de ces exemples un certain nombre de conclusions :

- La grande généralité de cette approche, nous confirme que la liste est déjà longue des types de méthodes qui ont été étudiées : chromatographie, spectroscopie, titrimétrie, gravimétrie, ELISA, PCR, microbiologie, physique, etc.
- D'une façon très globale, si on prend la définition de la validation, la démarche proposée suit très exactement cette définition : 1) partir des objectifs à atteindre en termes de limites d'acceptabilité ; 2) collecter les preuves effectives grâce à des plans d'expériences ; 3) puis les examiner statistiquement et graphiquement pour confirmer ou infirmer la validité.
- Le mode de calcul du profil niveau par niveau permet de couvrir une très large gamme dynamique de concentrations. L'approche est donc applicable à des méthodes dont le domaine d'application peut comprendre plusieurs décades. Ce point est important car, avec beaucoup d'autres procédures, on doit faire l'hypothèse – irréaliste – que la fidélité est constante dans tout le domaine étudié.
- On peut utiliser des modèles d'étalonnage variés et même non linéaires. En effet, l'hypothèse de linéarité de la fonction d'étalonnage peut être totalement abandonnée.
- Le critère global d'acceptabilité étant basé sur l'exactitude, on peut enfin régler les conflits entre la justesse et la fidélité. Les méthodologies classiques de validation traitent généralement séparément la justesse et la fidélité. Comme conséquence, on peut déboucher sur des conclusions ambiguës si seulement l'un de ces deux critères est satisfaisant. Par contre, le profil d'exactitude permet de représenter simultanément, sur un même graphique, ces deux critères (ou des combinaisons de ces critères). [37]

## V. L'utilisation en routine

Si la validation s'avère conforme, la vie de la méthode se poursuit par son utilisation en routine. L'obligation de maîtriser la qualité implique un contrôle permanent des performances dans le temps. La norme ISO 17025 (2000), par exemple, [38] exige que les méthodes d'analyse soient contrôlées lors de l'utilisation de routine afin de garantir la fiabilité des résultats analytiques qui sont produits pendant les séries de tous les jours et donc des décisions subséquentes. De même, la FDA [21] précise que, une fois la méthode d'analyse validée, son exactitude doit être contrôlée régulièrement afin de s'assurer que la méthode continue à fonctionner de façon satisfaisante. Pour effectuer ce contrôle, on s'appuie, bien sûr, sur les connaissances acquises lors du développement et de la validation de la méthode mais aussi sur des outils spécifiques qui sont les cartes de contrôle et les essais d'aptitude [1,2].

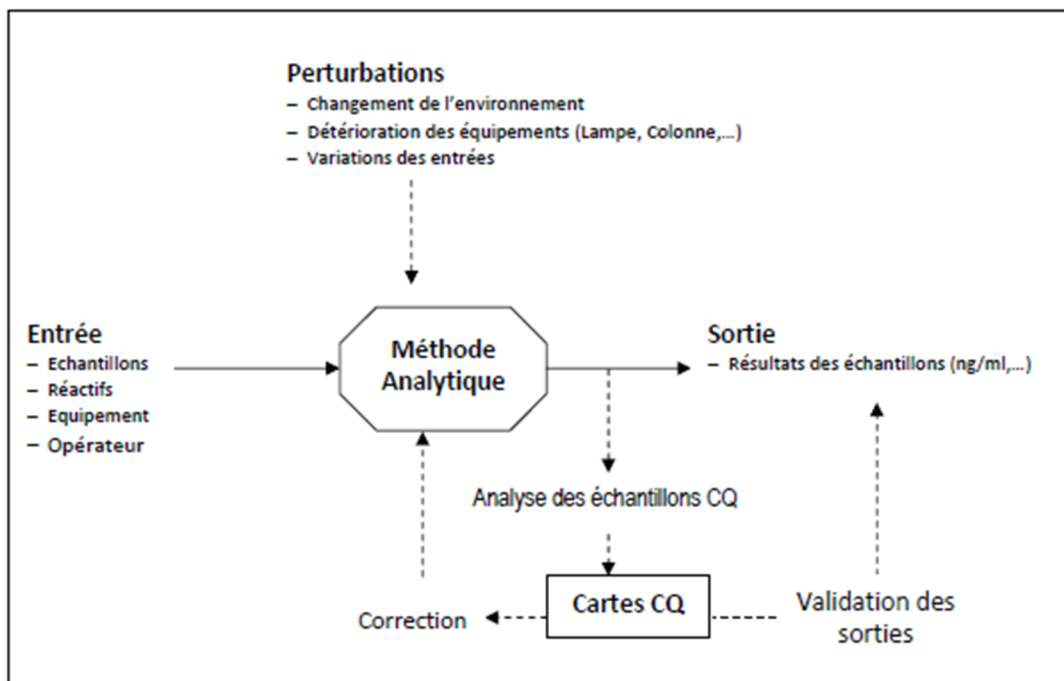
La méthode classique pour vérifier la fiabilité d'un système est de répéter l'analyse d'un échantillon de référence à intervalles réguliers et de le surveiller avec les techniques de maîtrise statistique des procédés (MSP) [2, 39-40].

EURACHEM (1998) [13] encourage l'utilisation des cartes de contrôle de la qualité (CQ) pour assurer la fiabilité quotidienne des méthodes et résultats obtenus. En outre, ils proposent d'utiliser au moins 5% d'échantillons de CQ de routine dans les essais de routine (un sur vingt échantillons analysés devrait être un échantillon CQ). Si un écart dans les résultats se trouve, le système doit être ajusté, dans la mesure du possible. En général, la variation dans les résultats de tout système d'analyse peut être interprétée comme la somme de deux composantes: une composante aléatoire qui est due à la variabilité inévitable de la méthode analytique, et une composante systématique ou non aléatoire qui pourrait être fonction du temps et qui peut être causée par l'utilisation des instruments, par des changements des conditions environnementales voir annexe2, etc.

La plupart des systèmes d'analyse réelle contiennent des pièces mécaniques, électriques et / ou optiques, dans lesquelles le facteur temps peut avoir une importance déterminante : le vieillissement de la lampe du détecteur photométrique, une diminution de la capacité de séparation de la colonne chromatographique, ... D'autres systèmes d'analyse peuvent être affectés par des changements dans les conditions environnementales, comme la température,

l'humidité, .... Ces changements peuvent provoquer des dérives dans les résultats, c'est-à-dire que des tendances systématiques des résultats sont fonction du temps, comme le montre la Figure 14. Le but de la MSP est de séparer les variabilités communes (causes aléatoires) des causes spéciales (systématique). Les cartes de contrôle sont les principaux outils utilisés pour atteindre cet objectif.

Le but de cartes de contrôle est de tester les deux hypothèses suivantes ; celle qui stipule que ces variations proviennent des causes communes contre l'hypothèse alternative qui suppose que ces variations sont d'origine spéciale. Dans le premier cas, le système est dit travailler sous contrôle statistique ou être dans un état contrôlé, et dans le second, le système est dit hors contrôle, devant donc être ajusté.



**Figure 14 : Le process d'évaluation pour contrôler les méthodes d'analyse durant l'utilisation en routine [39]**

Le Guide de la validation des méthodes de bioanalyse de la FDA (2001) [12] propose une règle spécifique pour surveiller les méthodes d'analyse lors de l'utilisation de routine. Pour atteindre cet objectif, un certain nombre d'échantillons de CQ doivent être analysés avec les échantillons inconnus.

Le guide précise que deux répétitions de QC à trois niveaux de concentration devraient être intégrées dans chaque série de dosage : l'un près de la limite inférieure de quantification (LQI; 3 x LQI), un autre en milieu de gamme, et un autre près de l'extrémité supérieure de la fourchette.

Les résultats des échantillons CQ fourniront la base d'acceptation ou de rejet de la série. Au moins quatre échantillons sur les six CQ devraient être dans les 15% de leur valeur nominale respective. Cette règle est appelée règle de 4-6-15. Deux des six échantillons QC peuvent être en dehors des 15% de leur valeur nominale respective, mais pas les deux à la même concentration.

Cette règle de 4-6-15 est l'une des nombreuses méthodologies qui permettent d'évaluer si un processus ou une méthode d'analyse est stable dans le temps. Concernant cette règle particulière, des critiques ont été faites: les risques producteur et consommateur sont très mal contrôlés. Pour renforcer le contrôle de ces risques, il est nécessaire d'analyser un plus grand nombre total d'échantillons (par exemple: 8-12-15, 12-18-15), et afin de contrôler adéquatement les risques pour le consommateur, le nombre total des échantillons CQ à analyser doit être supérieur à 80 (pour avoir au plus 10% de chances d'observer au moins 80% des résultats dans les limites d'acceptation, la règle doit être : 74-86-15) [2;40 ;41].

Toutefois, d'autres types de méthodes de contrôle statistique existent ; les plus courantes sont les cartes de Shewhart, les cartes des sommes cumulées (CUSUM), les cartes des moyennes pondérées exponentielles (EWMA)... [2,41].

Dans le chapitre III nous nous intéresserons à l'étude de l'influence des éléments de perturbation mentionnés dans la figure 14 ; et puisque la méthodologie adoptée est multivariée nous allons rappeler brièvement la méthodologie des plans d'expérience dans le chapitre II.

## **B. Chapitre II : Rappels sur la méthodologie des plans d'expériences**

### **I. Introduction**

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles [42]. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt,  $y$ , et des variables,  $X_i$ .

Il faut penser aux plans d'expériences si l'on s'intéresse à une fonction du type :

$$Y=f(X_i)$$

Avec les plans d'expériences on obtient le maximum de renseignement avec le minimum d'expériences. Pour cela, il faut suivre une démarche rigoureuse [43]. Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur. Les principes fondamentaux de cette science sont indiqués et ses principales applications sont passées en revue.

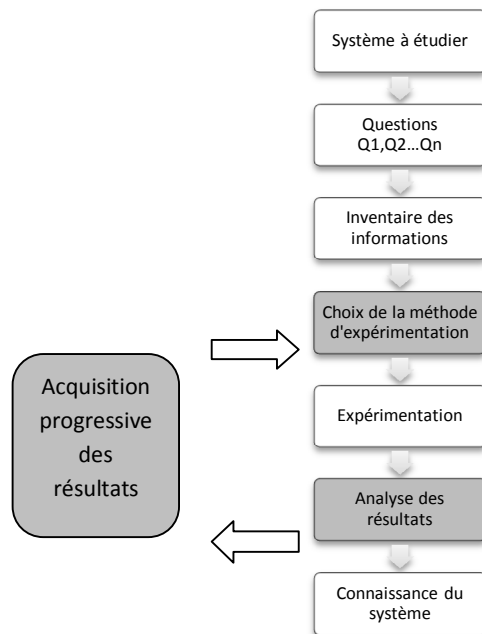
### **II. Plans d'expériences et le processus d'acquisition des connaissances**

Augmenter ses connaissances c'est trouver la réponse à une question posée. On commence donc par se poser une ou plusieurs questions (figure 15) qui correspondent réellement au problème. Bien sûr, avant d'entreprendre des expériences, il est prudent de vérifier que l'information cherchée n'existe pas déjà ailleurs. Dans ce but, on effectue un inventaire des connaissances, soit une bibliographie, soit une consultation d'experts, soit un calcul théorique, soit toute autre démarche ayant pour but de répondre, sans expérience, aux questions posées. Après cette phase d'enquête, les questions initiales peuvent être entièrement résolues et il n'y a plus de problème. Dans le cas contraire, certaines questions restent entières ou elles sont modifiées : il est alors nécessaire d'entreprendre des expériences pour obtenir les réponses complètes que l'on souhaite.

N'ayant plus que les questions sans réponse immédiate, il faut faire des expériences.

Comment peut-on choisir ces expériences pour :

- Arriver rapidement aux meilleurs résultats possibles,
- Eviter de réaliser des expériences inutiles,
- Obtenir la meilleure précision possible sur les résultats,
- Permettre d'avancer à coup sûr
- Etablir la modélisation du phénomène étudié,
- Découvrir la solution optimale.



**Figure 15 : les plans d'expériences optimisent les 3 parties grisées du processus d'acquisition des connaissances [42]**

Les trois aspects essentiels du processus d'acquisition des connaissances sont les suivants :

- Le choix de la méthode d'expérimentation,
- L'analyse des résultats,
- L'acquisition progressive de la connaissance.

Examinons plus en détail ces trois aspects :

### **1. Choix de la méthode d'expérimentation**

La méthode d'expérimentation choisie doit faciliter l'interprétation des résultats. Elle doit également minimiser le nombre des essais sans toutefois sacrifier la qualité.

La théorie des plans d'expériences assure les conditions pour lesquelles on obtient la meilleure précision possible avec le minimum d'essais. On a donc le maximum d'efficacité avec le minimum d'expériences et par conséquent le coût minimum.

### **2. Analyse des résultats**

L'analyse des résultats d'expériences est facilitée par le choix initial des expériences.

Les résultats seront faciles à interpréter et riches d'enseignement si l'on a bien préparé les expériences.

Grace aux logiciels la construction des plans d'expériences (voir annexe 3) et les calculs nécessaires à leur interprétation sont devenus très simples. Ces outils favorisent également les représentations graphiques qui illustrent de manière spectaculaire les résultats et améliorent la compréhension des phénomènes.

### **3. Acquisition progressive de la connaissance**

L'expérimentateur qui entreprend une étude ne connaît pas les résultats, il est donc sage d'avancer progressivement pour pouvoir réorienter les essais en fonction des premiers résultats. Une première ébauche permettra de mieux orienter les essais vers les seuls aspects intéressants de l'étude et d'abandonner les voies sans issues.

Une première série d'expériences conduit à des conclusions provisoires ; en fonction de ces conclusions provisoires, on lance une nouvelle série d'essais. L'ensemble des deux séries d'expériences est utilisé pour obtenir un contour précis des résultats d'études. L'expérimentateur accumule ainsi les seuls résultats dont il a besoin et s'arrête dès qu'il a obtenu ce qu'il cherche.

La méthodologie des plans d'expériences est destinée à optimiser la conduite et l'interprétation de l'expérimentation en faisant varier simultanément les différents facteurs et en fournissant des outils d'exploitation des résultats. C'est donc une approche rationnelle pour construire la série d'essais la plus légère possible en prenant en compte les contraintes telles que celle qui relèvent du coût ou temps par exemple.

### III. Les étapes d'acquisition de l'information selon la méthodologie des plans d'expériences

L'acquisition de l'information par la méthodologie des plans d'expérience se fait selon la démarche suivante :

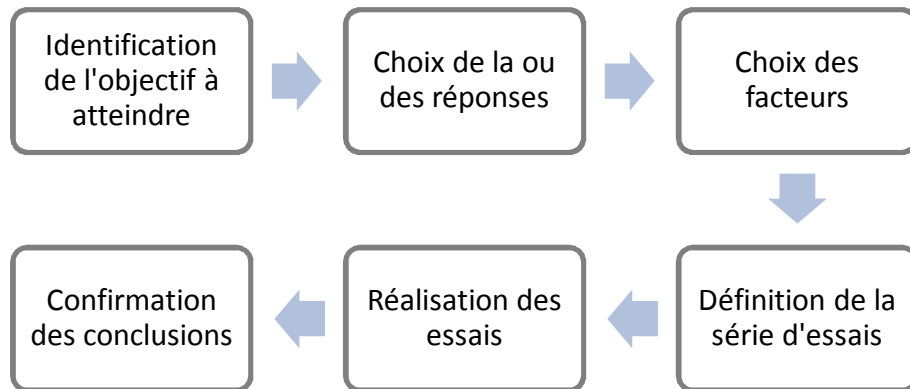


Figure 16 : Les étapes d'un plan d'expériences

#### 1. Identification de l'objectif à atteindre

Il est nécessaire de définir l'objectif de l'expérimentation ainsi que les contraintes liées à sa réalisation.

#### 2. Choix de la ou des réponses

Quel que soit l'objet du plan d'expériences envisagé, il est nécessaire de définir une ou plusieurs grandeurs permettant de caractériser le fonctionnement du système. Cette (ou ces) grandeur(s) sont désignée(s) sous le nom de réponse(s).

Il est très important d'apporter le plus grand soin aux choix de la ou des réponses, un choix inapproprié peut conduire à une analyse inutilement compliquée des résultats de l'expérimentation ou à une expérimentation inutilement longue.

Il est souhaitable qu'une réponse ait les qualités suivantes :

- Traduire le mieux possible le fonctionnement du système ;
- Avoir un écart type de répétabilité satisfaisant ;
- Être facilement et rapidement mesurable ou évaluable ;
- Être de nature continue

### **3. Choix des facteurs**

Cette étape consiste à identifier le paramètre appelés facteurs (voir annexe 1). Les facteurs peuvent être qualitatifs ou quantitatifs. La manière de procéder est la suivante :

- Recenser tous les facteurs susceptibles d'avoir une influence sur la réponse.
- Si des informations sont disponibles, sélectionner les facteurs a priori les plus importants pour l'étude. En cas d'absence d'information, les conserver tous ;
- Choisir le nombre de valeurs que prendra chaque facteur au cours de l'essai ; ces valeurs sont appelées modalités pour les facteurs qualitatifs et niveaux pour les facteurs quantitatifs
- Sélectionner les interactions entre facteurs a priori importantes pour la réponse, si la connaissance du système le permet.

Le nombre de facteurs, le nombre de modalités, ou niveaux de chaque facteur et les interactions éventuelles sont des critères déterminants pour la sélection du plan.

### **4. Construction de la série d'essais**

La série d'essais est construite, après le choix d'un modèle, en utilisant des matrices d'expériences issues de la théorie des plans d'expériences, plans factoriels complets ou fractionnaires, etc...

Certaines combinaisons de modalités peuvent être parfois impossibles à réaliser expérimentalement, il faut alors redéfinir certains facteurs ou s'engager vers des plans nécessitant l'utilisation de logiciels spécifiques pour la construction des matrices d'expériences (voir annexe 3)

Pour confirmer la dispersion expérimentale et évaluer une dérive éventuelle, il est utile de répéter un essai, choisi si possible au centre du domaine expérimental pour les variables quantitatives. Il est préférable de répartir ces répétitions sur l'ensemble de la durée de l'expérimentation.

## **5. Réalisation des essais**

Les expériences prévues sont réalisées en faisant varier les facteurs selon les interactions fournies par la matrice d'expériences choisie. Cette matrice se présente sous la forme d'un tableau dont chaque ligne est une expérience et chaque colonne est un facteur.

## **6. Analyse des résultats d'essais**

L'analyse de la variance et la régression sont des méthodes d'analyse couramment utilisées.

Les résultats obtenus à l'issue des essais permettent de calculer les coefficients d'un modèle quantifiant l'effet de chacun des facteurs et des interactions retenues, sur chacune des réponses étudiées.

## **7. Confirmation des conclusions**

Des essais supplémentaires sont le plus souvent nécessaires pour valider les conclusions du plan.

## **IV. Domaine d'application**

Les objectifs auxquels peuvent répondre les plans d'expériences ont été regroupés en cinq grands thèmes :

- Identification des facteurs influents parmi un grand nombre : Criblage
- Estimation de l'influence des facteurs : modélisation
- Détermination des configurations optimales : Optimisation
- Minimisation de l'influence des facteurs bruits : Robustesse
- Optimisation des propriétés d'un mélange : plan de mélange

Il est essentiel de choisir parmi les objectifs proposés ci-dessus, ceux qui correspondent le mieux au problème étudié juste après l'étape d'identification du problème.

### **1. Identification de facteurs influents parmi un grand nombre**

L'objectif est de déterminer, parmi un grand nombre de facteurs, les plus influents sur le système étudié et l'ordre de grandeur de l'effet de chacun. En effet, au début d'une étude expérimentale, la connaissance initiale du système est faible.

Cette technique, appelée criblage ou screening, peut être une fin en soi ou une étape préliminaire à une modélisation ou une optimisation.

Ne pas effectuer de criblage peut alourdir l'expérimentation en étudiant trop longtemps des facteurs non influents. Choisir de façon subjective les facteurs retenus pour une expérimentation plus approfondie peut conduire à éliminer des facteurs influents, ce qui risque de fausser les résultats.

Plans fréquemment utilisés : Plan de *Placket et Burman*

Plans factoriels

Plan de Taguchi ...

Note : ces plans sont décrits dans le chapitre III

## **2. Quantification de l'influence des facteurs**

Après avoir identifié les facteurs influents, l'expérimentateur peut vouloir décrire et prédire le comportement de son système en tout point du domaine expérimental. Faire tous les essais correspondants n'est pas toujours envisageable. La modélisation est souvent une étape préalable à l'optimisation.

Le comportement du système se traduit par une relation : Réponse = Fonction (Facteurs).

Pour chaque réponse, la modélisation se décompose en trois étapes :

- Choisir un type de fonction, souvent du 1er ou 2eme degré. Ce choix peut être guidé par la connaissance physique du phénomène, modèle théorique, ou par l'approche empirique souvent associée à un plan d'expérience ;
- Calculer, à partir des résultats du plan d'expériences, les coefficients du modèle afin de quantifier l'influence des facteurs ;
- Valider le modèle à l'intérieur du domaine expérimental, par la réalisation d'un ou de deux essais supplémentaires.

## **3. Détermination des configurations optimales**

L'optimisation consiste à rechercher les meilleures conditions de fonctionnement d'un système. Il s'agit donc de trouver les valeurs à donner aux facteurs pour que les réponses satisfassent à des conditions prédéfinies.

Les problèmes types d'optimisation peuvent être de maximiser, minimiser ou atteindre une valeur cible pour une grandeur, bien souvent la réponse.

Dans le cas de plusieurs réponses, il est possible d'étudier séparément chacune des réponses et de trouver une zone de compromis ou de créer une combinaison des réponses, en utilisant par exemple une fonction de désirabilité, et de la retenir comme grandeur à optimiser.

Le choix de la stratégie d'optimisation dépend de contraintes telles que la possibilité d'extrapoler en sortant du domaine expérimental, la nécessité de se confiner à une partie du domaine ou l'obligation d'évoluer à petit pas.

### Plans fréquemment utilisés :

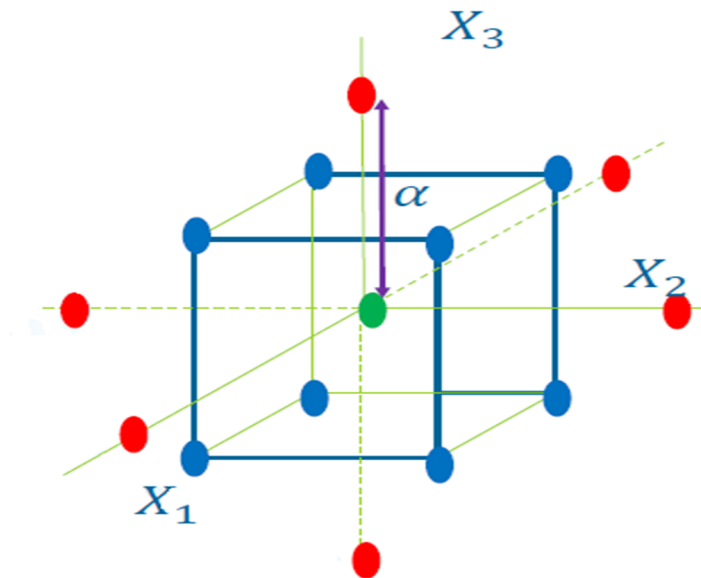
L'optimisation des méthodes analytiques est le plus souvent réalisée par la méthodologie des surfaces de réponses.

Nous nous contenterons ici d'expliquer brièvement les plus utilisées en développement des méthodes analytiques.

#### • Plans composites centrés

Un plan composite est constitué de trois parties :

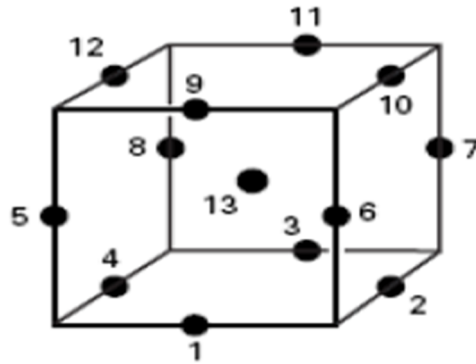
- Un plan factoriel dont les facteurs prennent deux niveaux.
- Au moins un point expérimental situé au centre du domaine d'étude.
- Des points axiaux en étoile. Ces points expérimentaux sont situés sur les axes de chacun des facteurs.



**Figure 17 : Exemple de plan composite centré pour 3 facteurs  $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$**

Ces plans sont souvent utilisés lorsque le plan demande une expérimentation séquentielle, car ils peuvent intégrer des informations provenant d'une expérience factorielle correctement planifiée.





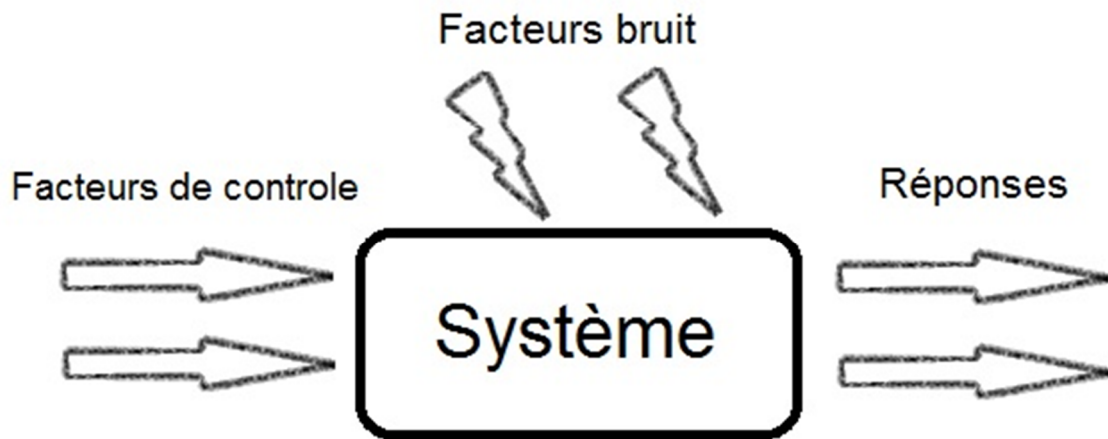
**Figure 19 : Plan de Box-Behnken pour trois facteurs**

Comme les plans de Box-Behnken comportent moins de points, leur coût est moindre que celui des plans composites centrés pour le même nombre de facteurs. Ils peuvent estimer efficacement les coefficients de premier et second ordre ; toutefois, ils ne peuvent pas inclure d'essais provenant d'un plan factoriel.

#### **4. Minimisation de l'influence des facteurs bruits**

Dans certains cas, l'objectif d'une étude peut être non seulement de trouver une configuration du système pour laquelle les performances sont d'un niveau satisfaisant ; mais aussi de minimiser l'influence de facteurs bruit sur ce niveau de performance. En effet, il est inacceptable de réaliser un produit fonctionnant parfaitement en laboratoire, mais dont les performances seraient dégradées dans certains environnements particuliers que le système risque de rencontrer ou de concevoir une méthode qui donnerait des résultats variables en fonction des facteurs d'environnement.

Un système est dit robuste lorsque ses performances sont peu altérées par la variation des conditions dans lesquelles il peut être amené à fonctionner. Ces conditions sont caractérisées par des facteurs bruit. L'étude de la robustesse consiste à évaluer l'influence de ces facteurs bruit durant l'expérimentation.



**Figure 20 : schéma représentatif du fonctionnement d'un système**

L'expérimentation de la robustesse a eu en général pour objectif de trouver les réglages qui donnent une performance satisfaisante du système tout en demeurant insensible aux facteurs bruit qui sont non ou mal maîtrisés. Lorsque le système est déjà défini, le plan d'expérience n'a pour but que de valider les réglages pour garantir que les bruits n'induisent pas une variabilité trop importante des réponses au point de rendre le système inacceptable pour l'utilisateur. [49]

## **C. Chapitre III : Revue de la littérature sur la robustesse**

### **I. Introduction**

La fiabilité des résultats, en particulier dans l'industrie pharmaceutique, est primordiale. Comme on l'a vu au chapitre 1 La validation de la méthode analytique joue un rôle essentiel dans l'évaluation de cette fiabilité. Un autre type important d'étude dans lequel les méthodes analytiques peuvent se heurter est le test de robustesse. Bien que les tests de robustesse ne soient pas encore obligatoires selon la ligne directrice de l'ICH [10], ils sont généralement demandés par les autorités pour l'enregistrement des médicaments, par ex. par l'US FDA [50]

la robustesse d'une méthode d'analyse est sa capacité à rendre des résultats exacts en présence de faibles changements de conditions expérimentales susceptibles de se produire dans l'utilisation de cette méthode.[51]

On entend par faible changement de conditions expérimentales tout écart d'un paramètre opératoire par rapport à sa valeur nominale telle que définie dans la méthode d'analyse. Les paramètres opératoires peuvent être très variés : pH du milieu, composition du ou des réactif(s), conditions d'extraction, températures, composition de la matrice etc.

Pour évaluer la robustesse d'une méthode d'analyse, on applique un test sur un échantillon homogène en faisant varier les paramètres retenus. Si on utilise la technique classique consistant à faire varier chacun des paramètres, tout en maintenant les autres constants, l'opération est rapidement irréalisable en raison du nombre des essais à effectuer. D'où l'utilité de la méthodologie des plans d'expériences, qui consiste à varier plusieurs paramètres en même temps. Cette démarche permet de diminuer de façon importante le nombre des essais.

## II. Contexte, objectifs et étapes d'un test de robustesse

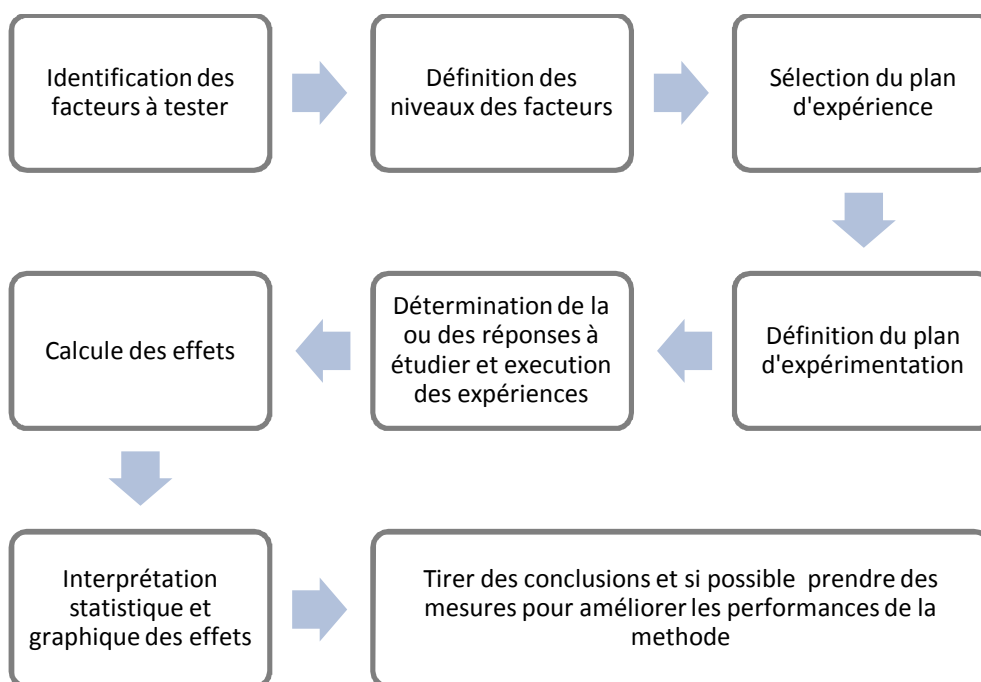
Les tests de robustesse ont été introduits pour éviter les problèmes aux études inter laboratoires et d'identifier les facteurs potentiellement responsables [52]. Comme les études inter laboratoires s'effectuent dans la phase finale de la validation cela signifie que le test de robustesse est effectué à un stade tardif ainsi ce test a été considéré comme une partie de la détermination de la reproductibilité de la méthode [53-54].

Toutefois, procéder à un test de robustesse à la fin de la procédure de validation comporte le risque que lorsqu'une méthode s'avère non robuste, il devrait être redéveloppée et optimisée. À ce stade beaucoup d'effort et argent ont déjà été dépensés dans l'optimisation et la validation, C'est pourquoi l'exécution d'un test de robustesse a été déplacé à des stades antérieurs dans la vie de la méthode. Les directives de l'ICH [10], ainsi que quelques auteurs qui travaillent en bio-analyse [55] considèrent la robustesse comme une rubrique de la validation des méthodes effectuée au cours de la phase de développement et de l'optimisation des méthodes. La position exacte a relativement peu d'influence sur la façon dont il est exécuté.

Le test de robustesse a pour objectif d'examiner les sources possibles de la variabilité sur une ou plusieurs réponses de la méthode. Dans un premier temps, les aspects quantitatifs (teneurs, recouvrements) sont évalués. Cependant en dehors de ces réponses également, ceux du système de suitabilité peuvent être évalués (résolution, facteurs de capacité, efficacité de la colonne dans une méthode chromatographique...).[56]

Afin d'examiner les sources possibles de la variabilité, un certain nombre de facteurs est tiré du mode opératoire et examiné dans un intervalle qui dépasse légèrement les variations à quoi on peut s'attendre lorsqu'une méthode est transférée d'un instrument à l'autre ou d'un laboratoire à l'autre. Ces facteurs sont ensuite examinés dans un plan d'expérience et l'effet des facteurs sur la ou les réponse(s) de la méthode est évalué. De cette façon les facteurs susceptibles de perturber l'exécution de la méthode sont caractérisés. L'analyste sait alors que ces facteurs doivent être strictement contrôlés lors de l'exécution de la méthode.

On adopte la démarche suivante pour la réalisation du test de la robustesse :



**Figure 21 : Les étapes de la réalisation d'un test de robustesse**

### **1. La sélection des facteurs**

Les facteurs à étudier dans un test de robustesse peuvent être liés à la méthode analytique (facteurs opérationnels) ou aux conditions environnementales (facteurs environnementaux).

Les facteurs opérationnels sont sélectionnés à partir du mode opératoire, tandis que les facteurs environnementaux ne sont pas nécessairement spécifiés explicitement dans la méthode analytique. Les facteurs sélectionnés peuvent être quantitatifs, qualitatifs ou mixtes.

Le tableau 1 indique une liste des facteurs pouvant être pris en compte lors des tests de robustesse d'une méthode chromatographique (chromatographie liquide, gazeuse ou en couche mince), la liste est non exhaustive mais donne au lecteur une idée sur les facteurs fréquemment examinés.

Si une étape de préparation d'échantillon (extraction liquide-liquide, extraction solide-liquide, ultrafiltration...) est nécessaire avant l'analyse chromatographique, on doit prendre en considération aussi les facteurs de cette étape dans le test de robustesse. Le nombre de facteurs à examiner augmente aussi lorsqu'on doit réaliser une étape de dérivatisation.

**Tableau 1 : liste des facteurs pouvant être pris en compte lors des tests de robustesse d'une méthode chromatographique.**

Méthode	Facteurs
HPLC	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ph de la phase mobile</li> <li>Quantité du modificateur organique</li> <li>Concentration de tampon, concentrations de sel ou force ionique</li> <li>Concentration d'additifs : réactifs d'appariement d'ions</li> <li>Débit</li> <li>Température de la colonne</li> <li>Gradient d'élution</li> <li>Composition initiale de la phase mobile</li> <li>Composition finale de la phase mobile</li> <li>Pente du gradient</li> <li>Colonne</li> <li>Phase stationnaire</li> <li>Fabricant de la colonne</li> <li>Age de la colonne</li> <li>Détecteur</li> <li>Longueur d'onde</li> <li>Sensibilité</li> </ul>
CPG	<ul style="list-style-type: none"> <li>Température d'injection de gaz</li> <li>Température de la colonne</li> <li>Température de détection</li> <li>Température initiale</li> <li>Température finale</li> </ul>

	Pente du gradient de la température Débit du gaz Flux initial Flux final Pente du gradient d'écoulement Colonne Phase stationnaire Fabricant de la colonne Age de la colonne
CCM	Composition d'éluant PH de la phase mobile Température Forme de spot Taille de spot Lot de plaques Conditions de séchage (température, temps) Conditions de visualisation des taches (pulvérisation de réactif, détection UV, plongeant dans un réactif)

Les facteurs sélectionnés devraient représenter ceux qui sont le plus susceptibles d'être modifiés lorsqu'une méthode est transférée et qui pourrait potentiellement influencer la ou les réponse(s) de la méthode.

## 2. La sélection des niveaux des facteurs

Les niveaux des facteurs sont généralement définis de manière symétrique autour de la valeur nominale indiquée dans le mode opératoire. L'intervalle choisi entre les niveaux extrêmes représente les limites entre lesquelles les facteurs peuvent varier quand une méthode est transférée. La sélection des niveaux peut également être basée sur la précision ou l'incertitude [57], par exemple l'incertitude sur le facteur « pH d'une solution » dépend de l'incertitude du résultat du pH-mètre. Supposons qu'on sait, par exemple, que le pH varie avec un niveau de confiance de 95% dans un intervalle  $\text{pH} \pm 0.02$ . En raison de cette incertitude on peut s'attendre à un pH (nominal) qui varie dans un intervalle  $\text{pH} \pm 0.02$ . Pour sélectionner les niveaux extrêmes dans le test de robustesse, on va élargir cet intervalle pour deux raisons, prendre en considération des éventuelles variations entre les instruments des différents laboratoires et de distinguer les effets dus aux facteurs de l'effet de l'erreur expérimentale. Ceci peut être fait par la multiplication de l'incertitude par un coefficient d'élargissement K, la valeur  $K=5$  est proposée par défaut. D'autres valeurs peuvent être utilisées lorsque l'analyste considère un intervalle plus grand ou plus petit pour que l'étude de certains facteurs soit réalisable.

Pour quantifier l'incertitude dans les mesures analytiques les lignes directrices détaillées d'Eurachem sont disponibles [57].

L'intervalle entre les valeurs extrêmes est généralement symétrique autour de la valeur nominale, mais il se peut que pour certains facteurs la sélection d'un intervalle asymétrique puisse refléter plus de réalités.

## 3. Sélection du plan d'expérience

Les facteurs sont examinés dans un plan d'expérience, qui est sélectionné en fonction du nombre de facteurs à étudier. Généralement on recourt à des plans de criblage qui permettent d'étudier un nombre relativement important de facteurs par un nombre raisonnable d'expériences. Ces plans-là peuvent d'être de type plan factoriel fractionnaire, de *Taguchi* ou de *Plackett-Burman* [58]. Dans la littérature, on trouve aussi des applications des plans factoriels complets et même certains plan de surface de réponse.

En pratique la plupart des modèles utilisés pour la détermination de la robustesse sont des plans factoriels fractionnaires ou du type *Plackett-Burman*. Pour cette raison, nous allons accorder plus d'attention à ces plans là et nous allons brièvement décrire les autres.

- Plan factoriel complet :

Dans un plan factoriel complet, toutes les combinaisons entre les différents facteurs et les différents niveaux sont faits. Supposons que l'on ait trois facteurs (A, B, C) qui seront testés à deux niveaux (- et +). Les combinaisons possibles de ces niveaux de facteurs sont présentées au tableau 2. Huit combinaisons peuvent être faites. En général, le nombre total d'expériences dans un plan factoriel complet à deux niveaux est égal à  $2^f$  avec  $f$  le nombre de facteurs. L'avantage de cette méthodologie par rapport à la démarche classique c'est que non seulement les effets principaux des facteurs qui peuvent être calculés, mais aussi les effets des interactions des facteurs.

Les effets des interactions qui peuvent être considérés ici sont trois interactions à deux facteurs (AB, AC et BC) et une interaction à trois facteurs (ABC). A partir de la matrice représentée dans le tableau 2 ces sept effets peuvent être calculés, une huitième statistique peut être obtenue de cette matrice c'est le résultat moyen.

A partir d'un plan complet  $2^f$ , on peut calculer  $2^f$  statistiques.

**Tableau 2 : Plan factoriel complet pour 3 facteurs**

Expériences	A	B	C	Réponse
1	-	-	-	$y_1$
2	+	-	-	$y_2$
3	-	+	-	$y_3$
4	+	+	-	$y_4$
5	-	-	+	$y_5$
6	+	-	+	$y_6$
7	-	+	+	$y_7$
8	+	+	+	$y_8$

Le nombre des effets qui peuvent être calculés pour les différents plans factoriels complets est décrit dans le tableau suivant :

**Tableau 3 : Le nombre des effets qui peuvent être calculés pour les différents plans factoriels complets**

Statistiques	Plan factoriel complet (2 <sup>f</sup> )						
	f=2	f=3	f=4	f=5	f=6	f=7	f=8
Effet moyen	1	1	1	1	1	1	1
Effets principaux	2	3	4	5	6	7	8
Intéractions							
Effets							
2-Facteurs	1	3	6	10	15	21	28
3-Facteurs		1	4	10	20	35	56
4-Facteurs			1	5	15	35	70
5-Facteurs				1	6	21	56
6-Facteurs					1	7	28
7-Facteurs						1	8
8-Facteurs							1
Σ:	4	8	16	32	64	128	256

Le nombre de p-facteurs interactions peut être calculé par la relation suivante [59] :

$$\frac{f!}{(f-p)! p!}$$

Pour expliquer le concept d'interaction, considérons l'interaction de deux facteurs. Cette interaction se produit lorsque l'effet du premier facteur obtenu au niveau bas (-) du deuxième facteur est différent de l'effet obtenu au niveau haut (+) du second. L'effet d'un facteur est influencé par celui de l'autre et ; donc il est dit qu'ils "interagissent". Nous allons essayer d'expliquer cela avec un exemple. Supposons que dans le tableau 2, le facteur B soit la "colonne HPLC" (niveau (+) = colonne K et niveau (-) = colonne L) et le facteur A est le "pH de la phase mobile"(niveau (+) = 5.2 et niveau (-) = 4.8) Une interaction de deux facteurs entre le fabricant de la colonne et le pH de la phase mobile se produit lorsque l'effet du pH sur la réponse (par exemple la résolution) sur la colonne K est différent de l'effet du pH sur la

colonne L. L'interaction est calculée comme la moitié de la différence entre l'effet du pH sur la colonne K et l'effet du pH sur la colonne L. L'interaction est appelée dans cet exemple l'interaction pH / colonne ; elle est symbolisée par AxB ou AB ou BA.

$$\text{L'effet de l'interaction (AB)} = \frac{1}{2} (\text{l'effet pH sur la colonne K} - \text{l'effet du pH sur la colonne L})$$

Ou

$$\text{Effet de l'interaction (AB)} = \frac{1}{2} (E_{A,B(+)} - E_{A,B(-)})$$

Considérons maintenant les interactions à trois facteurs (par exemple ABC dans le tableau 2) pour donner une idée générale de la manière dont ces effets d'interactions ; et celles d'ordre supérieur (interaction de 4 facteurs, de 5 facteurs...) ; sont fait :

Une interaction à trois facteurs signifie qu'un effet d'interaction à deux facteurs est différent aux deux niveaux du troisième facteur. L'effet de l'interaction AB est estimé avec C au niveau (+) (représenté par  $E_{AB,C(+)}$ ) et C au niveau (-) (représenté par  $E_{AB,C(-)}$ ), la moitié de la différence entre ces deux estimations donne l'effet d'interaction à trois facteurs (ABC)

$$\text{L'effet de l'interaction (ABC)} = \frac{1}{2} (E_{AB,C(+)} - E_{AB,C(-)})$$

Comme c'est le cas pour les interactions à deux facteurs, l'interaction à trois facteurs est également symétrique dans toutes ces variables. Les effets d'interaction ABC, ACB, BAC, CAB, BCA et CBA donnent tous le même résultat. Les effets d'ordre supérieur sont calculés par un raisonnement analogue.

**• Plan factoriel fractionnaire PFF :**

L'inconvénient des plans factoriels complets c'est que le nombre d'expériences augmente rapidement avec le nombre de facteurs étudiés. Pour 6 facteurs, 64 expériences sont nécessaires et pour 7 facteurs 128. En pratique, il n'est généralement pas possible d'effectuer un si grand nombre d'expériences dans un laps de temps raisonnable. Pour cette raison, souvent une fraction d'un plan factoriel complet, seulement, est effectuée. Ce type de plan est appelé Plan factoriel fractionnaire.

Considérons d'abord un plan factoriel en demi-fraction. Seule la moitié du nombre d'expérience nécessaires pour un factoriel complet est effectuée. Par exemple pour 4 facteurs,  $16/2 = 8$  expériences sont effectuées. Ceci peut être observé sur le tableau 4 dans lequel un plan factoriel complet pour 4 facteurs est démontré. En sélectionnant 8 expériences appropriées à partir de l'ensemble des 16 expériences, on obtient un plan factoriel en demi-fraction, qu'on symbolise par  $2^{4-1}$ .

**Tableau 4 : Sélection d'un plan factoriel en demi-fraction à partir d'un plan factoriel complet pour 4 facteurs**

Expériences	Facteurs			
	A	B	C	D
(1)	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
(4)	+	+	-	-
5	-	-	+	-
(6)	+	-	+	-
(7)	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
(10)	+	-	-	+
(11)	-	+	-	+
12	+	+	-	+
(13)	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
(16)	+	+	+	+

En réduisant le nombre d'expériences, on perd aussi l'information, en effet dans un PFF on ne peut pas estimer séparément et avec une grande précision les effets principaux des interactions comme dans un plan factoriel complet.

Considérons par exemple la matrice formée par les expériences entre parenthèses dans le tableau 4 et calculons les colonnes de contraste pour les interactions à trois facteurs (voir le tableau 5). On remarque que la colonne ABC est égale à la colonne D. C'est aussi le cas pour la colonne A et BCD; B et ACD; C et ABD. Dans la matrice qui est formée par les expériences qui sont entre parenthèses dans le tableau 4, on estime l'effet total du facteur D et de l'interaction ABC.

On dit que le facteur D et l'interaction ABC sont confondus les uns avec les autres, ce qui signifie qu'ils ne peuvent pas être estimés séparément. Tous les autres effets principaux sont également confondus avec une interaction à trois facteurs (A avec BCD, B avec ACD et C avec ABD). En calculant les colonnes des coefficients de contraste pour les interactions à deux facteurs, on remarque que chacune est confondue avec une autre interaction double (par exemple AB avec CD)

En terme de valeur absolue, les effets principaux ont tendance à être plus importants que les interactions à deux facteurs qui, à leur tour, sont souvent plus grandes que les interactions à trois facteurs, et ainsi de suite. Dans la matrice du tableau 5, les effets principaux devraient être significativement plus importants que les interactions à trois facteurs avec lesquels ils sont confondus. En conséquence, il est supposé que l'estimation de l'effet principal et de l'interaction ensemble est une estimation de l'effet principal seul.

**Tableau 5 : colonnes des coefficients de contraste pour les interactions triples de la matrice désignée dans le tableau 4**

<i>Exp.</i>	<b>Facteurs</b>				<b>Interactions</b>			
	A	B	C	D	ABC	ABD	ACD	BCD
1	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-	+	+
6	+	-	+	-	-	+	-	+
7	-	+	+	-	-	+	+	-
10	+	-	-	+	+	-	-	+
11	-	+	-	+	+	-	+	-
13	-	-	+	+	+	+	-	-
16	+	+	+	+	+	+	+	+

Voyons maintenant comment on doit choisir les expériences du plan factoriel complet pour obtenir le plan fractionnaire approprié. En pratique, pour construire un plan  $2^{4-1}$ , on construit d'abord un plan factoriel complet pour  $4-1=3$  facteurs voir tableau 4. Le quatrième facteur D sera attribué à l'une des colonnes des interactions (par Ex. à ABC dans ce cas), ce qui signifie que l'on confond le facteur D avec l'interaction ABC de cette façon nous obtenons le tableau 5.

La relation  $D = ABC$  est appelée le générateur d'alias. Le facteur D et l'interaction à trois facteurs ABC sont appelés pseudonymes, tous les autres aliases (voir tableau 6) peuvent être déterminés avec l'aide de cette relation :

$$I = D \times ABC = ABCD$$

**Tableau 6 : les aliases d'un plan  $2^{4-1}$  avec  $I=ABCD$**

<i>Aliases</i>
A = BCD
B = ACD
C = ABD
D = ABC
AB = CD
AC = BD
AD = BC
ABCD = I

La résolution de ce plan est de IV, on la définit par le nombre de terme dans l'équation de la matrice identité. Plus la résolution est élevée et plus le nombre des effets des interactions confondues avec les effets principaux est grand.

Pour des informations plus détaillées sur la génération des différents PFF nous vous préconisons de se reporter à [59-60].

Des plans factoriels fractionnaires minimaux pour un nombre donné de facteurs sont proposés dans le tableau 7, certains plans peuvent être étendus à des matrices similaires à celles décrites dans le tableau 7, Cette possibilité d'expansion permet d'exécuter une fraction plus petite, puis, après une première évaluation des effets, d'effectuer une autre fraction pour laquelle la combinaison avec les expériences précédemment réalisées conduit à une matrice analogue à celles données dans le tableau 7.

**Tableau 7 : Les plans factoriel fractionnaires proposés**

Nombre de facteurs	Le plan	Générateur d'aliases	Générateur d'expansion	Nombre d'expériences
3	Plan factoriel complet $2^3$	-	-	8
4	Fraction $1/2^{\text{eme}} : 2^{4-1}$	D=ABC	-	8
5	Fraction $1/4^{\text{eme}} : 2^{5-2}$	D=AB E=AC	D= -AB E= -AC	8
6	Fraction $1/8^{\text{eme}} : 2^{6-3}$	D=AB E=AC F=BC	E= -AB E=-AC F=-BC	8
7	Fraction $1/16^{\text{eme}} : 2^{7-4}$	D= AB E=AC F=BC G=ABC	D= -AB E= -AC F= -BC G=ABC	8
8	Fraction $1/16^{\text{eme}} : 2^{8-4}$	E=ABC F=BCD G=ABD H=AC	-	8
9	Fraction $1/32^{\text{eme}} : 2^{9-5}$	-	-	16
10	Fraction $1/64^{\text{eme}} : 2^{10-6}$	-	-	16
11	Fraction $1/128^{\text{eme}} : 2^{11-7}$	-	-	16
12	Fraction $1/256^{\text{eme}} : 2^{12-8}$	-	-	16
13	Fraction $1/512^{\text{eme}} : 2^{13-9}$	-	-	16
14	Fraction $1/1024^{\text{eme}} : 2^{14-10}$	-	-	16
15	Fraction $1/2048^{\text{eme}} : 2^{15-11}$	-	-	16

Note : aucune matrice d'expansion n'a été proposée pour les plans factoriels fractionnaires minimaux de 16 expériences étant donné qu'un total de 32 expériences est considéré comme irréalisable et les générateurs ne sont pas proposés lorsqu'aucune extension n'est prévue et lorsqu'il n'est pas possible de créer un plan de résolution IV [59-60].

Les plans proposés, dans le tableau au-dessus, sont ceux ayant le petit nombre d'expériences et qui satisfont aux caractéristiques suivantes :

- Les interactions à deux facteurs ne sont pas confondues avec les effets principaux c'est-à-dire que leurs résolution est d'au moins IV

- Au moins trois effets d'interaction à deux facteurs peuvent être estimés

Les effets d'interaction à deux facteurs qui peuvent être estimés à partir des plans factoriels fractionnaires du tableau 7 servent à estimer l'erreur expérimentale. (Voir partie 7.2)

#### • Plans de *Taguchi* :

Les plans de *Taguchi* permettent à la fois d'optimiser une méthode analytique et de tester sa robustesse.

Les facteurs à optimiser sont appelés facteurs de contrôle ou facteurs contrôlable [61]. Ceux qui doivent être testés pour la robustesse sont appelés facteurs de bruit [61-62], variables environnementales [62] ou sources de bruit [63], certains facteurs de contrôle et de bruit pourraient être identiques mais examinés à différents niveaux, généralement des intervalles beaucoup plus petits dans le test de robustesse[60].

Ce type de plans a également été utilisé souvent dans les études de robustesse [64,65]. Ces plans proposent généralement l'utilisation de plans factoriels fractionnaires à deux niveaux, qui forment des matrices orthogonales désignées par L4,L8,L12,L16 et L32, dans lesquelles l'indice numérique correspond au nombre d'expériences à effectuer. La matrice L4 est un plan factoriel fractionnaire  $2^{3-1}$  dont les niveaux de la troisième variable sont définis par la relation génératrice I=123.

La matrice L8 est un plan factoriel fractionnaire  $2^{7-4}$  avec les relations génératrices de : I=-123, I=-135, I=-236 et I=1237. La matrice Taguchi L12 est assez différente du plan Plackett et Burman proposée pour évaluer 11 facteurs avec 12 essais. Cependant, ces deux matrices

sont orthogonales et devraient montrer les mêmes résultats si tous les effets d'interaction sont négligeables [66].

• **Les plans pour les tests de robustesse à trois niveaux :**

Pour examiner les facteurs à trois niveaux dans un test de robustesse, plusieurs modèles se proposent :

Une première possibilité est l'utilisation de plans factoriels complets à trois niveaux [67]. L'inconvénient des plans factoriels à trois niveaux est que le nombre d'expériences augmente très rapidement pour un plus grand nombre de facteurs.

Une deuxième possibilité est l'utilisation des plans composites centrés. Leur inconvénient est le grand nombre d'expériences requises même pour un faible nombre de facteurs, par ex. 25 expériences pour 4 facteurs et 273 expériences pour 8 facteurs. Même 25 expériences différentes peuvent déjà prendre un temps déraisonnable pour être réalisables. Les plans composites centrés permettent d'estimer non seulement les effets principaux mais aussi les effets d'interaction et les effets quadratiques. Cependant, les effets quadratiques ne sont normalement jamais pris en compte dans un test de robustesse. Ces plans sont principalement utilisés à des fins d'optimisation et moins pour les tests de robustesse.

Les plans composites centrés sont interprétés à l'aide d'une méthode de régression et pour obtenir une régression raisonnable, les niveaux des facteurs devraient différer suffisamment, mais dans un test de robustesse, de larges intervalles entre les niveaux devraient être évités. Néanmoins, certains auteurs les ont utilisés pour des tests de robustesse [68,69,70].

Une autre possibilité qui semble à première vue attrayante est les plans à trois niveaux proposés par *Plackett et Burman* [71]. Cependant, ils ont montré un certain nombre de limites, en effet des confusions entre les effets peuvent être produites [72]. Et même les plans à trois niveaux équilibrés qui sont décrits dans la littérature et qui semble arranger la confusion entre les facteurs ne permettent d'examiner que la moitié du nombre de facteurs initialement proposés par *Plackett et Burman* [60].

Ces plans équilibrés pourraient être utilisés dans les tests de robustesse, cependant aucune étude de cas n'a été connue jusqu'aujourd'hui.

Pour tester les facteurs à trois niveaux dans un test de robustesse, on applique généralement les plans dits réfléchis [73,74,75]. Un plan réfléchi est, en fait, un plan factoriel complet, fractionné ou de type *Plackett-Burman* à deux niveaux exécuté en deux fois. Une fois le plan contient le premier extrême et le niveau nominal et une fois l'autre extrême et le niveau nominal. Les deux plans ont une expérience en commun, à savoir l'expérience dans laquelle tous les facteurs sont dans des conditions nominales. Un schéma de *Plackett-Burman* reflété pour 7 facteurs est montré dans le tableau 8

**Tableau 8 : Plan réfléchi pour 7 facteurs dérivés du plan de Plackett-Burman**

<i>Exp.</i>	Facteurs						
	A	B	C	D	E	F	G
1	+1	+1	+1	0	+1	0	0
2	0	+1	+1	+1	0	+1	0
3	0	0	+1	+1	+1	0	+1
4	+1	0	0	+1	+1	+1	0
5	0	+1	0	0	+1	+1	+1
6	+1	0	+1	0	0	+1	+1
7	+1	+1	0	+1	0	0	+1
8	0	0	0	0	0	0	0
9	-1	-1	-1	0	-1	0	0
10	0	-1	-1	-1	0	-1	0
11	0	0	-1	-1	-1	0	-1
12	-1	0	0	-1	-1	-1	0
13	0	-1	0	0	-1	-1	-1
14	-1	0	-1	0	0	-1	-1
15	-1	-1	0	-1	0	0	-1

• Plans de *Plackett et Burman*

Les plans de Plackett-Burman sont des plans de résolution III. Dans un plan de résolution III, les effets principaux sont aliasés avec les interactions à deux facteurs. [58]. Dans un test de robustesse on s'intéresse uniquement aux effets principaux des facteurs [76] et donc Les interactions d'ordre deux ou plus peuvent être négligeables [77]. Ce qui fait de ces plans les plus utilisés dans les tests de robustesse.

Le tableau suivant décrit le nombre d'expériences recommandées en fonction du **nombre de facteurs à examiner**

**Tableau 9 : le nombre d'expériences recommandées en fonction du nombre de facteurs à examiner.**

Nombre de facteurs à examiner	Le plan choisi	Nombre de facteurs fictifs	Nombre d'expériences
3-7	-Plan P-B pour 7 facteurs	4-0	8
8-11	-Plan P-B pour 11 facteurs	3-0	12
12-15	-Plan P-B pour 15 facteurs	3-0	16
16-19	-Plan P-B pour 19 facteurs	3-0	20
20-23	-Plan P-B pour 23 facteurs	3-0	24

Le nombre minimum de facteurs à examiner dans un plan est de trois, alors que ceux avec plus de 28 expériences sont considérés comme peu pratiques.

Le plan de *Plackett et Burman* est construit comme suit : la première ligne pour un plan donné de N=8-24 est donné dans le tableau 10 avec N est le nombre d'expérience et (+) et (-) les niveaux ou la modalité du facteur.

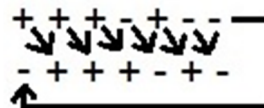
**Tableau 10 : La première ligne pour un plan donné de Plackett et Burman**

Plan (N)	La première ligne
8	+++----
12	+++----+-
16	++++-+-+---
20	+++----+-+-----+-
24	++++-+-+----+-+-----

Dans le tableau ci-dessus, seule la première ligne s'affiche. Cette ligne est permutée de manière cyclique pour obtenir une matrice  $(n - 1) \times (n - 1)$ . Une dernière ligne composée uniquement de signes moins est alors ajoutée. [77]

Par exemple, si l'on souhaite étudier 7 facteurs, on aura à effectuer 8 essais dont la première ligne sera +++----.

On déduit ensuite les N-2 autres lignes par permutation circulaire selon le schéma suivant :



On reproduit l'étape précédente jusqu'à obtenir une matrice de ce type pour 8 essais et 7 facteurs :

**Tableau 11: Exemple d'un plan de Plackett et Burman à 7 facteurs et 8 essais**

Expériences	Facteurs						
	A	B	C	D	E	F	G
1	+	+	+	-	+	-	-
2	-	+	+	+	-	+	-
3	-	-	+	+	+	-	+
4	+	-	-	+	+	+	-
5	-	+	-	-	+	+	+
6	+	-	+	-	-	+	+
7	+	+	-	+	-	-	+
8	-	-	-	-	-	-	-

On peut également procéder par rotation circulaire des colonnes [78]

Note : Après détermination du nombre de facteurs réels à examiner, Les colonnes restantes dans le plan sont définies comme facteurs fictifs. Un facteur fictif est un facteur imaginaire pour lequel le passage d'un niveau à l'autre n'a pas de signification physique. [79]

#### **4. Exécution des expériences**

Les expériences sont faites dans les différentes conditions expérimentales et ce, de préférence dans une séquence aléatoire. Pour des raisons pratiques des expériences peuvent être triées par un ou plusieurs facteurs, dans ce cas il est recommandé de contrôler la dérive (effet de temps) [76], qui peut être définie par l'évolution de la réponse mesurée à des conditions constantes en fonction du temps.

Un blocage par des facteurs externes non examinés dans le plan tel que, par exemple, les jours est également possible. Cependant, l'estimation de ces effets sera biaisée quand ils sont calculés à partir des données mesurée sans prendre certaines précautions, telle que la correction de la dérive en utilisant des répliques nominales [76].

#### **5. Détermination des réponses**

A partir des expériences réalisées, un certain nombre de réponses peuvent être déterminées. Pour les méthodes de dosage, les réponses décrivant une quantité telles que l'aire sous la courbe ou la hauteur du pic sont les plus évidents, pour une méthode de séparation, il faut, aussi considérer un ou plusieurs paramètres décrivant la qualité de la séparation, comme par exemple la résolution ou le temps de rétention relative ; autres réponses peuvent également être étudiées telles que le facteur de capacité, le facteur d'asymétrie ...

## 6. Calcul des effets

Les effets peuvent être calculés à partir des mesures ou les résultats de la réponse corrigée (en cas de dérive). Pour chaque facteur son effet est calculé selon l'équation :

$$E_X = \frac{\sum Y(+)}{N/2} - \frac{\sum Y(-)}{N/2},$$

$E_X$  : L'effet de X sur la réponse

$\sum Y(+)$  : La somme de toute les réponses lorsque X est au niveau extrême (+)

$\sum Y(-)$  : La somme de toute les réponses lorsque X est au niveau extrême (-)

N : le nombre des expériences

Les effets peuvent également être rapportés par rapport au résultat nominal moyen et exprimé donc en pourcentage (voir équation en dessous) ce qui permet à l'utilisateur de la méthode une meilleure considération de l'influence des facteurs, même sans interprétation statistique.

$$E_X(\%) = \frac{E_X}{\bar{Y}} \times 100\%.$$

$E_X$  : L'effet de X sur la réponse.

$\bar{Y}$  : Résultat nominal moyen

$E_X(\%)$  : L'effet normalisé

## 7. Interprétation des données

### 7.1. Approche graphique

L'approche graphique de l'identification des effets importants consiste à représenter un nuage de points mettant en relation les valeurs observées et les valeurs théoriques de la distribution normale [80] (figure 22) ou de la distribution semi normale [58] (figure 23).

Les effets qui ne sont pas significatifs sont généralement distribués autour du zéro et ont tendance à se distribuer de part et d'autre d'une droite qui passe par le zéro (la droite d'Henry). Un exemple des deux courbes est représenté ci-dessous :

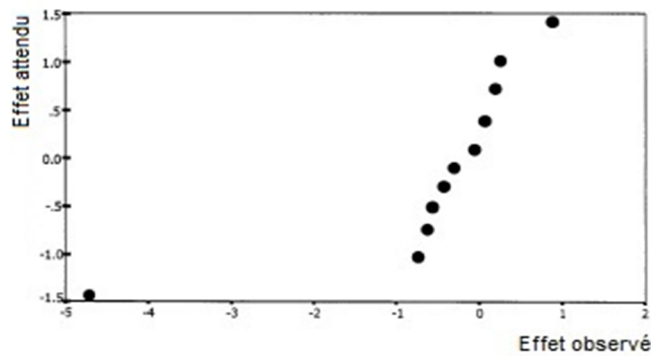


Figure 22 : Normal Plot

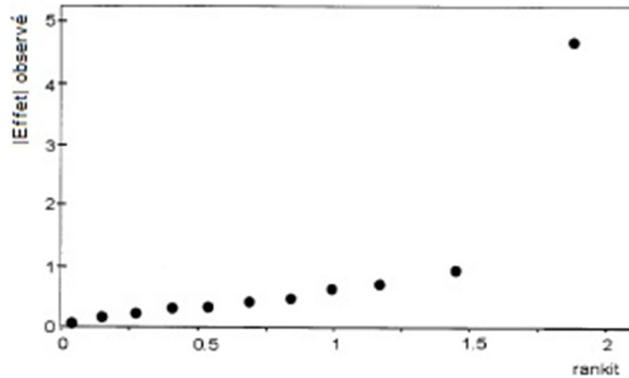


Figure 23 : Half normal plot

Les effets attendus sont les valeurs de la variable aléatoire suivant une loi normale centré réduite, alors que le rankits est données dans le tableau suivant pour les plans les plus utilisés :

**Tableau 12 : Les Rankits correspondants aux plans P-B 8, 12 et 16**

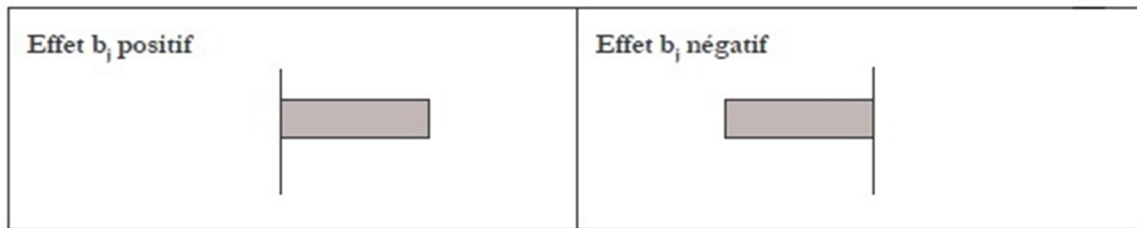
Effet	N=8	N=12	N=16
1	0.09	0.06	0.04
2	0.27	0.17	0.12
3	0.46	0.29	0.21
4	0.66	0.41	0.29
5	0.90	0.53	0.38
6	1.21	0.67	0.47
7	1.71	0.81	0.57
8		0.98	0.67
9		1.19	0.78
10		1.45	0.89
11		1.91	1.02
12			1.18
13			1.36
14			1.61
15			2.04

Pour créer le Half normal plot, les valeurs absolues des n effets sont classés par ordre croissant ensuite chaque point de cette séquence sera représenté par rapport à la valeur correspondante du tableau ci-dessus.

D'autres types de graphique peuvent également être utiles, les plus courants sont :

- **Le diagramme en bâton** : qui consiste à tracer des bâtons ou la surface de chacun, est proportionnelle à la valeur de l'effet (bi) du facteur correspondant sur la variation de la réponse.

Plus le bâton est grand, plus le poids du facteur est important, et le sens de la représentation (à droite ou à gauche) distingue des effets positifs de ceux négatifs.



**Figure 24 : représentation des effets positifs et négatifs sur le diagramme des effets**

Sur ce diagramme, les limites de confiances peuvent être indiquées par deux droites en pointillés correspondant aux seuils de signification.

Nous verrons certains outils d'aide à l'interprétation des résultats qui permettent de fixer ces limites de signification dans la partie de l'analyse statistique

#### • Diagramme de PARETO

Il est possible de décomposer la variation d'une réponse à partir des contributions apportées par chacun des facteurs dans un modèle. L'écriture polynomiale facilite la définition de la contribution d'un facteur  $i$  à partir de la relation suivante :

$$CTR_i = \frac{b_i^2}{\sum_k b_k^2}$$

Les contributions des facteurs sont alors ordonnées par ordre croissant puis représentées sous forme de diagramme en bâtons. Le diagramme de Pareto est complémentaire au tracé des effets moyens. Il permet de déterminer les facteurs influents par ordre de contribution décroissante, il est aussi possible de tracer la fonction cumulée de ces contributions.

## 7.2. Analyse statistique

L'équation du modèle mathématique calculé n'est qu'une approximation de la réalité, la mise en œuvre de tests statistiques nous permet de porter un jugement sur les résultats obtenus et de connaître la qualité des estimations des coefficients [81] c'est-à-dire de fournir à l'utilisateur une valeur limite numérique qui peut être tracée sur la représentation graphique et

qui permet de définir, de manière moins subjective ce qui est important de ce que ne l'est pas. Cette valeur limite qui permet d'identifier statistiquement les effets significatifs provient généralement du test t [52].

$$t = \frac{|E_X|}{(SE)_e} \Leftrightarrow t_{\text{critique}}$$

$(SE)_e$  : l'erreur standard d'un effet

$t_{\text{critique}}$  : une valeur tabulée pour un degré de liberté donné et à un seuil de signification donné. Voir table de Student (annexe 4).

Pour les expériences de robustesse, cette erreur standard peut être estimée de différentes façons [76]:

• **L'estimation de l'erreur à partir de la précision intermédiaire :**

L'erreur standard d'un effet estimé peut être calculée selon l'équation suivante :

$$ES = \sqrt{\frac{S_a^2}{n_a} + \frac{S_b^2}{n_b}},$$

$S_a^2$  et  $S_b^2$  les variances estimées de deux ensembles de mesures et  $n_a$  et  $n_b$  sont respectivement les nombres de mesures de ces ensembles. Si  $S_a^2$  et  $S_b^2$  sont estimées à partir d'une même variance  $S^2$ ,  $n_a=n_b=N/2$  l'équation devient :

$$(ES)_e = \sqrt{\frac{S^2}{N/2} + \frac{S^2}{N/2}} = \sqrt{\frac{4S^2}{N}},$$

La variance  $S^2$  peut être déterminée des expériences répétées au niveau nominal ou d'une répétition du plan.

Quand on répète les expériences au niveau nominal  $ddl=n-1$ ,  $N$  est le nombre d'expériences répétées. Tandis que dans le cas où on répète le plan la variance est calculée comme suit :

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^N d_i^2}{2N}$$

$N=ddl$  et  $d_i$  est la différence entre les répétitions du plan.

Ainsi, ce critère ne peut être utilisé que si des estimations de précision intermédiaire sont disponibles, ce qui n'est souvent pas le cas lorsqu'un test de robustesse est effectué, de même ce n'est pas toujours pratique de faire des répétitions du plan ; pour remédier à cela on peut estimer l'erreur à partir de la distribution des effets.

Dans la partie pratique on, va essayer d'appliquer les deux approches.

• **Estimation de l'erreur à partir des effets fictifs ou des interactions doubles :**

L'estimation peut également être obtenue à partir des effets fictifs ou des interactions négligeables selon l'équation suivante :

$$ES = \sqrt{\frac{\sum E_{\text{erreur}}^2}{n_{\text{erreur}}}}$$

$\sum E_{\text{erreur}}^2$  : La somme des carrés des  $n$  effets fictifs ou interactions doubles

Note : la puissance du test statistique serait proportionnelle au nombre de degrés de liberté, en effet pour avoir une estimation de l'erreur qui serait satisfaisante, on doit sélectionner un plan d'au moins 3 facteurs fictifs.

• **Estimation de l'erreur à partir de la distribution des effets (algorithme de Dong)**

L'algorithme de Dong est un outil approprié pour identifier les effets significatifs [82], cet algorithme peut être appliqué à tous les plans mentionnés au tableau 9.

Dans cette approche une estimation initiale de l'erreur est obtenue de la manière suivante :

$$s_0 = 1.5 \text{ mediane}|E_i|$$

$E_i$  : l'effet de la valeur de l'effet  $i$ .

A partir de  $S_0$ , une estimation finale de l'erreur standard est faite :

$$s_1 = \sqrt{m^{-1} \sum E_i^2} \quad \text{pour tout } |E_i| \leq 2.5s_0$$

$m$  : est le nombre des effets en valeur absolue inférieur à  $2.5S_0$

Ensuite la valeur  $S_1$  est utilisée pour calculer la marge d'erreur (ME) qui correspondrait à l'effet critique.

$$ME = t_{(1 - \alpha/2, ddl)} S_1$$

**$1 - \alpha/2 = 0.975$  et  $ddl = m$**

La ME est statistiquement un critère valable pour tester la signification, quand un seul effet doit être testé. Quand il s'agit de tester plusieurs effets la chance qu'un effet non significatif puisse dépasser la ME augmente, pour pallier à cet événement le niveau doit être ajusté et une seconde limite est définie : La marge d'erreur simultanée (MES).

$$MES = t_{(1 - \alpha^*/2, ddl)} S_1$$

Avec: Le niveau de signification ajusté  $\alpha^* = 1 - (1 - \alpha)^{(1/m)}$

Selon la littérature, un effet qui dépasse le ME, mais inférieur à la MES, est considéré comme potentiellement significatif et un effet supérieur à la MES est considéré comme significatif.

Cependant, dans la pratique, il est recommandé d'utiliser la limite ME comme critère de décision pour tous les effets calculés à partir du test de robustesse. En effet, en utilisant la MES on réduit la probabilité des faux positives (le risque  $\alpha$ ), c'est-à-dire le fait de considérer un effet qui n'est pas significatif comme étant significatif, mais en revanche il augmente considérablement le nombre des faux négatifs (risque  $\beta$ ) ; ce qui fait qu'on qualifie la méthode de robuste alors qu'elle ne l'est pas. Par conséquent il peut être recommandé de ne pas utiliser la limite des MES en test de robustesse.

Si le nombre d'effet significatif est trop grand l'algorithme de Dong peut être itéré, c'est-à-dire que  $S_0$  est remplacé par  $S_1$  et un nouveau  $S_1^*$  est calculé [76].

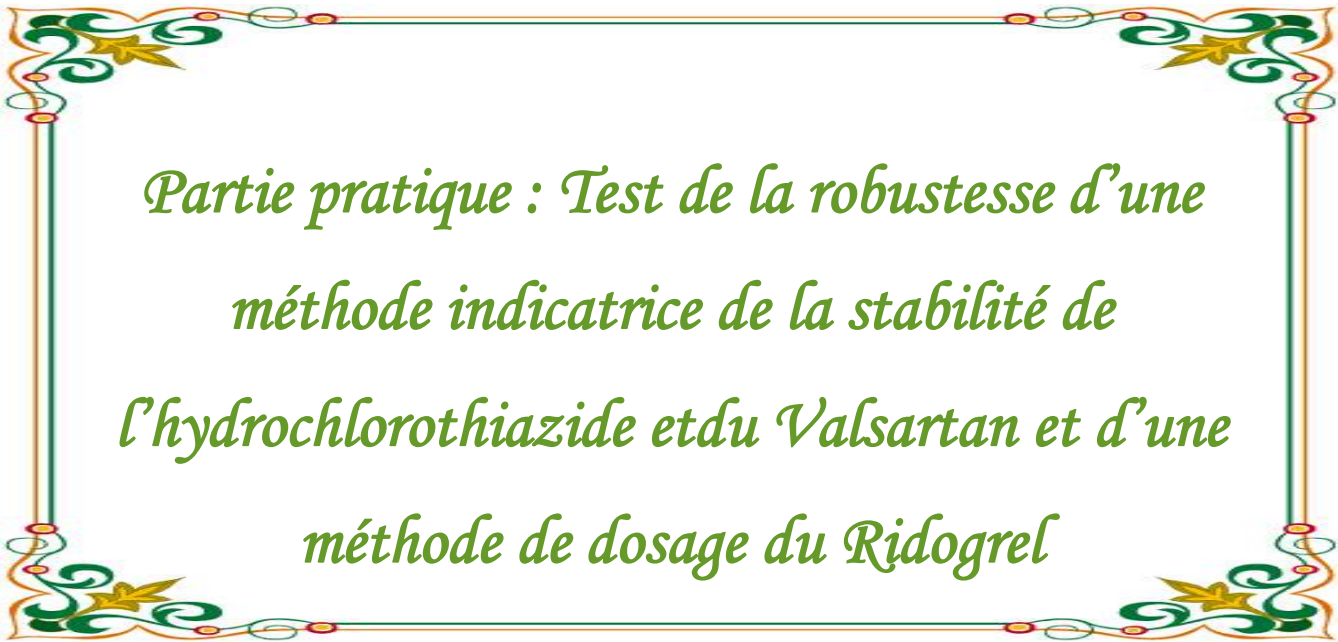
### **8. Estimation des intervalles de non-signification pour les facteurs significatifs**

Une fois qu'on a caractérisé les facteurs à effets significatifs, on peut se demander dans quel intervalle les niveaux de facteur doivent être contrôlés pour éliminer l'effet.

Ces niveaux peuvent être estimés par :

$$\left[ X_{(0)} - \frac{|X_{(1)} - X_{(-1)}|E_{\text{critical}}}{2|E_X|}, X_{(0)} + \frac{|X_{(1)} - X_{(-1)}|E_{\text{critical}}}{2|E_X|} \right]$$

$X_{(0)}$ ,  $X_{(1)}$ , et  $X_{(-1)}$  sont les valeurs réelles du facteur X pour les niveaux (0), (1) et (-1) respectivement.



*Partie pratique : Test de la robustesse d'une  
méthode indicatrice de la stabilité de  
l'hydrochlorothiazide et du Valsartan et d'une  
méthode de dosage du Ridogrel*

## **I. Introduction :**

Les antihypertenseurs sont généralement des médicaments administrés par voie orale, et il existe beaucoup de spécialités pharmaceutiques où on associe deux voir trois molécules anti hypertensives dans le même médicament, cette association permet de diminuer davantage les chiffres tensionnels qu'un doublement de la dose de l'un de ces antihypertenseurs tout en maîtrisant les effets indésirables doses dépendants.

Dans ce travail on s'est intéressé à l'association Hydrochlorothiazide et Valsartan, ce médicament est commercialisé sous une dizaine de représentations au Maroc.

En l'absence d'une méthode robuste et indicatrice de la stabilité pour la quantification simultanée du VS et de l'HCT en présence de leurs impuretés, une méthode HPLC a été développée et validée selon le profil d'exactitude dans un travail antérieur.

Dans la partie suivante on a testé la robustesse de cette méthode, en utilisant le plan d'expérience de *Plackett-Burman* à deux niveaux avec sept facteurs, et dans un deuxième temps on a appliqué le test à une autre méthode de dosage d'un autre Principe actif à 11 facteurs.

## **II. Exemple 1: La méthode indicatrice de la stabilité de l'hydrochlorothiazide et du Valsartan :**

### **1. Matériels et méthodes :**

#### **1.1. Produits chimiques et réactifs**

L'hydrochlorothiazide à 99.9% et le valsartan à 98.6 ont été obtenu auprès du Laboratoire Nationale du Contrôle des Médicaments, en tant qu'étalons secondaires certifiés.

L'acétonitrile de qualité HPLC provenait de Sigma-aldrich ( Darmstadt,Allemagne). Du peroxyde d'hydrogène à 30% et du phosphate de potassium monobasique ont été obtenus auprès de Riedel-de-Haen (Seelze, Allemagne). Des pastilles d'hydroxyde de sodium ont été obtenues auprès de Fluka (Bâle, Suisse). L'acide phosphorique 85% et l'acide chlorhydrique 37% ont été fournis par Merck (Darmstadt, Allemagne).

## 1.2. Conditions nominales

Le Système de séparation utilisé est un appareil HPLC constitué d'une pompe quaternaire waters 2696 couplée à un détecteur de barrette de diodes 2998 et utilisant le logiciel Empower pour le traitement et l'acquisition des données.

La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne YMC Symmetry C18-5 $\mu$ m 250 mm  $\times$  4.6 mm (Waters) à température ambiante (25°C), à travers laquelle une phase mobile constituée de (A) tampon phosphate pH=3 et (B) acétonitrile percolait selon le gradient indiqué au Tableau à un débit de 1mL/min. Le volume d'injection a été 5 $\mu$ L et la longueur de détection a été fixée à 273 nm.

**Tableau 13 : le gradient de solvants utilisés**

Temps (minutes)	% Tampon	% Acétonitrile
0	80	20
8	80	20
10	55	45
30	55	45
31	80	20
40	80	20

La méthode a été validée selon le profil d'exactitude pour une gamme de [62.5 - 175 $\mu$ g/mL] et [405 – 1120 $\mu$ g/mL] pour HCT et VS respectivement.[83]

La robustesse de la méthode a été étudiée en présence des impuretés générées par la dégradation forcée en utilisant le plan d'expérience de *Plackett-Burman*.

*Les conditions de dégradation forcée* consistent en: hydrolyse par HCl (1M) et NaOH (1M) à 22°C pendant une heure. Température (70°C) pendant 4 heures et l'oxydation par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) pendant 30 min.

Le plan d'expérience de *Plackett-Burman* est à deux niveaux avec sept facteurs qui sont :

**Tableau 14 : les facteurs retenus pour le test**

Facteur	unité	Pa ou modalités	Valeur nominale
pH		±0.2	3
Débit	(mL/min)	±0.2	1
%Acétonitrile au début du gradient	%	±5	20
%Acétonitrile à la fin du gradient	%	±5	20
La longueur d'onde	(nm)	±2	273
Température	°C	±5	25
Type de colonne		- YMC Symmetry C18 - Phenomenex Luna C18	- YMC Symmetry C18

Le tableau suivant indique les expériences faites :

**Tableau 15 : La matrice des expériences**

Facteurs							
Expérience	pH	Débit	%ACN début	%ACN fin	Longueur d'onde	Température	colonne
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
2	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1
3	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
5	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
7	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1

En plus de ces expériences aux valeurs extrêmes, six expériences ont été faites à la valeur nominale pour pouvoir estimer l'erreur standard.

## 2. Résultats et discussion :

Les réponses obtenues sont les suivantes :

**Tableau 16 : les résultats obtenus**

	Hydrochlorothiazide			Valsartan			
	Teneur en PA	Temps de rétention	Asymétrie	Teneur en PA	Temps de rétention	asymétrie	résolution
Essais à la valeur nominale (n=6)							
Moyenne	100.66	7.51	1.87	100.20	28.87	1.12	63.11
CV	0.95	0.36	0.05	0.83	0.26	0.05	0.08
Essais aux valeurs extrêmes :							
1	102.08	3.24	1.97	100.41	14.62	1.63	33.06
2	102.17	3.08	1.97	99.84	14.63	1.81	35.72
3	102.60	7.72	1.47	98.87	30.92	1.13	63.10
4	107.7	5.91	1.88	98.87	17.87	1.78	24.51
5	101.6	8.56	1.21	97.99	23.68	1.09	53.05
6	98.25	6.92	1.32	100.01	28.61	1.19	68.75
7	102.84	9.64	1.28	99.24	23.52	1.26	43.90
8	106.61	6.74	1.93	99.80	28.74	2.01	22.26
Moyenne	102.98	6.48	1.63	99.37	22.82	1.48	43.04
CV	2.87	36.21	20.81	0.79	28.40	24.22	40.17

## 2.1. Calcul des effets

Les effets sur les différentes réponses sont calculés et classés dans le tableau suivant :

**Tableau 17 : les coefficients des effets des différents facteurs sur les réponses**

Facteur	Hydrochlorothiazide			Valsartan			
	Teneur en PA	Temps de rétention	Asymétrie	Teneur en PA	Temps de rétention	Asymétrie	Résolution
Effet	-0.528	-0.098	-0.033	0.517	-3.338	-0.045	-0.977
pH	-1.617	-0.692	-0.042	-0.007	-7.423	-0.080	-3.223
Débit	-3.412	-2.473	0.108	0.797	-1.258	-0.095	14.228
% ACN début	1.692	0.223	0.043	-0.357	-2.178	0.015	-2.473
%ACN Fin	1.692	0.223	0.043	-0.357	-2.178	0.015	-2.473
Longueur d'onde	1.028	-0.238	0.008	-0.698	-2.103	-0.160	0.773
Température	-1.102	-0.718	-0.067	-0.393	-3.253	-0.040	4.928
Colonne	-3.318	3.468	-0.618	-0.713	7.718	-0.640	28.313
Effet en %							
pH	0.91	0.05	0.26	12.29	7.57	0.45	0.09
Débit	8.53	2.49	0.45	0.003	37.45	1.41	0.99
%ACN début	37.96	31.76	2.87	29.18	1.07	1.99	19.35
%ACN Fin	9.34	0.26	0.45	5.86	3.22	0.05	0.58
Longueur d'onde	3.44	0.29	0.01	22.32	3.00	5.63	0.06
Température	3.96	2.67	1.13	7.07	7.19	0.35	2.32
Colonne	35.87	62.47	94.82	23.29	40.49	90.49	76.61

## 2.2. Interprétation graphique des effets calculés

- Diagramme des effets :

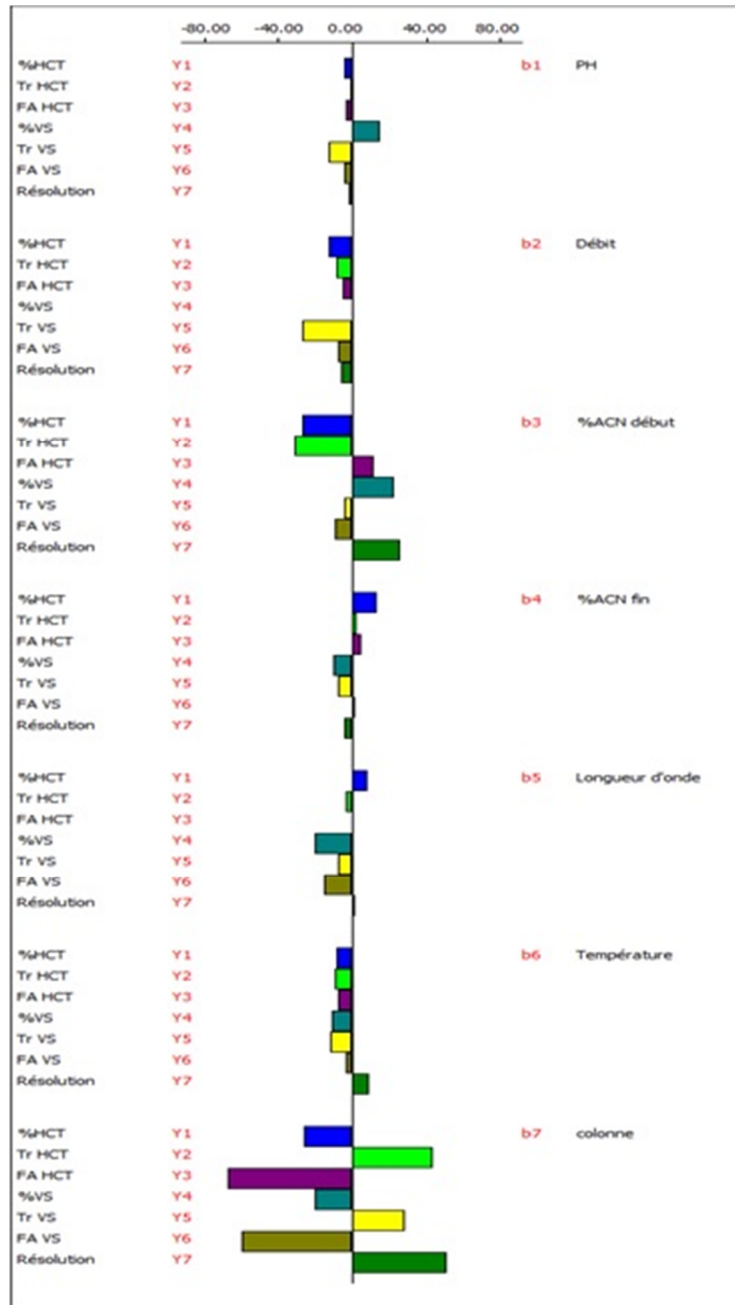


Figure 25 : diagramme des effets de tous les facteurs sur toutes les réponses

- Diagramme de Pareto

Réponse 1 : Teneur de l'hydrochlorothiazide

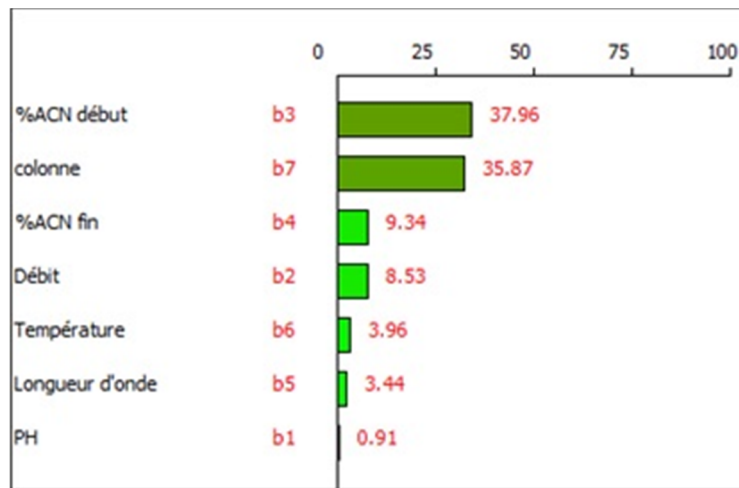


Figure 26 : Effets des facteurs sur la teneur de l'hydrochlorothiazide

Réponse 2 : Temps de rétention de l'hydrochlorothiazide

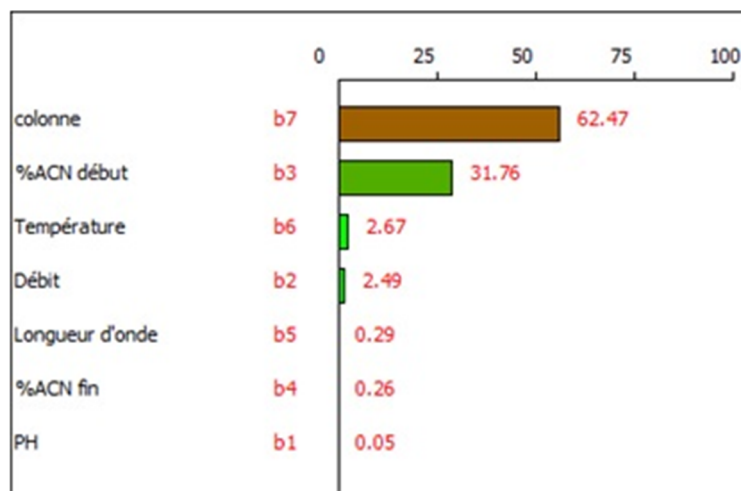


Figure 27: Effets des facteurs sur le Temps de rétention de l'hydrochlorothiazide

Réponse 3 : l'Asymétrie du pic Hydrochlorothiazide



Figure 28 : Effets des facteurs sur l'Asymétrie du pic Hydrochlorothiazide

Réponse 4 : Teneur du Valsartan

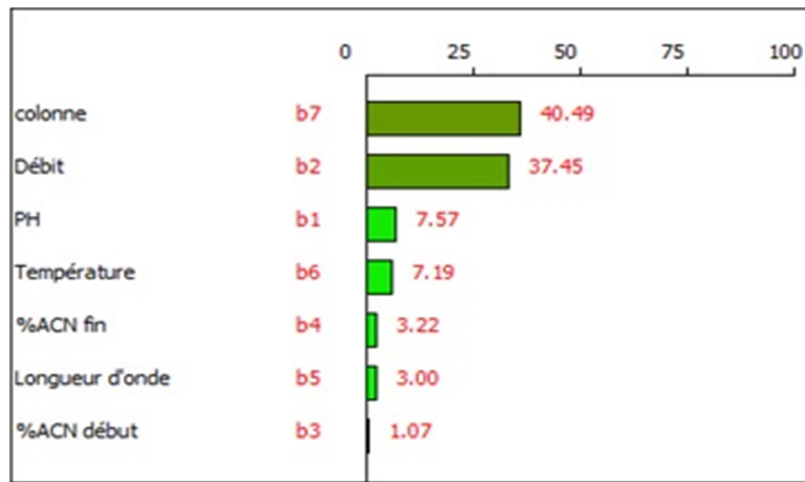


Figure 29 : Effets des facteurs sur la Teneur du Valsartan

Réponse 5 : Temps de rétention Valsartan :

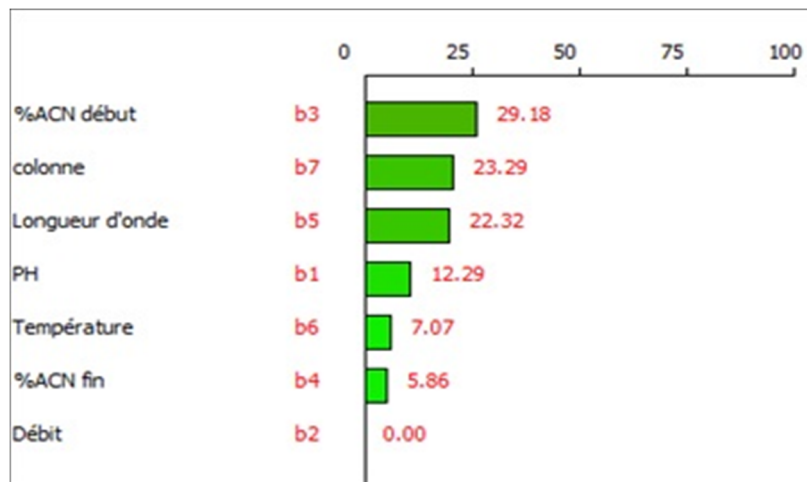


Figure 30 : Effet des facteurs sur le Temps de rétention Valsartan

Réponse 6 : La résolution

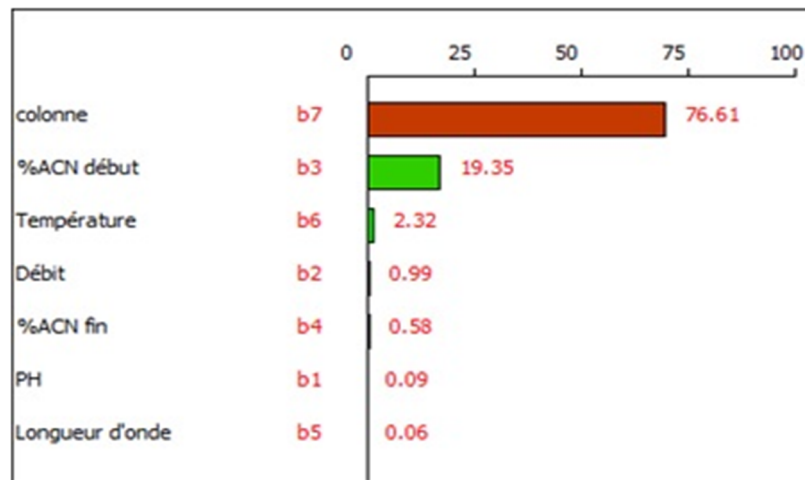


Figure 31 : Effets des facteurs sur La résolution

D'après le tableau des effets, le diagramme des effets et les diagrammes de Pareto on remarque un effet nettement important du facteur type de colonne sur toutes les réponses. Nous avons vérifié cela par l'algorithme de Dong :

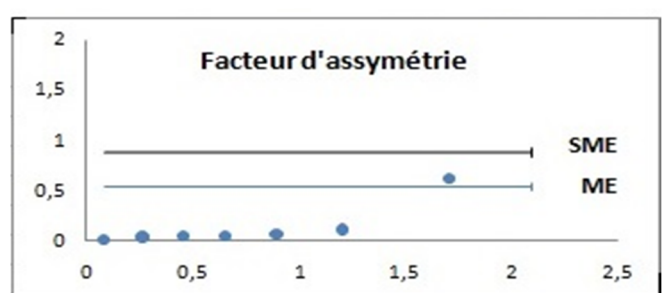
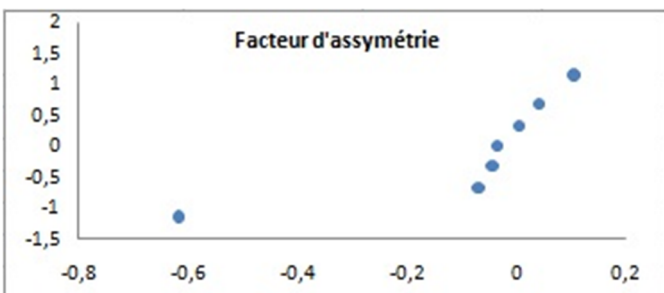
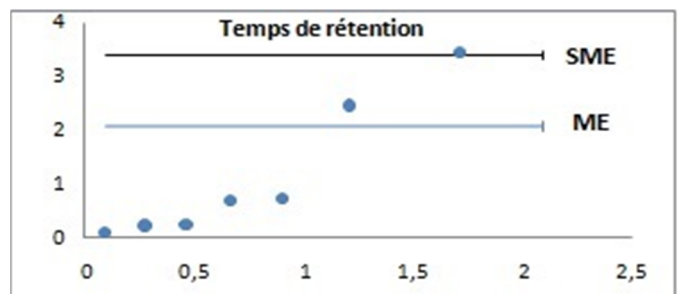
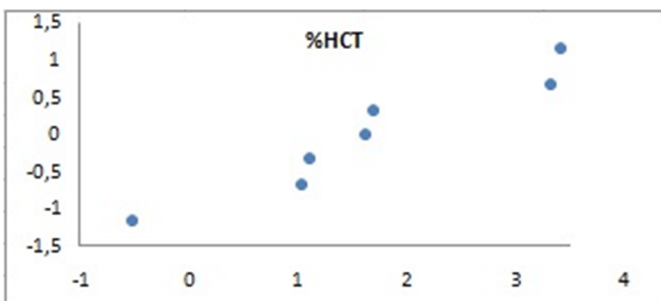
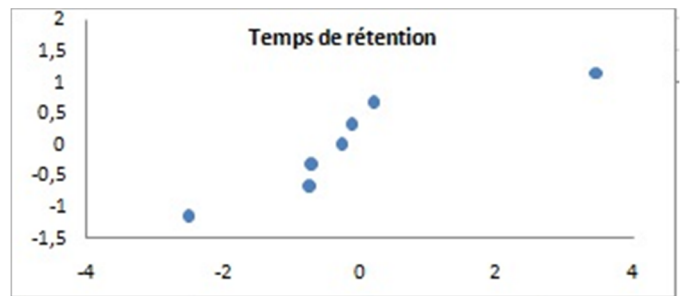
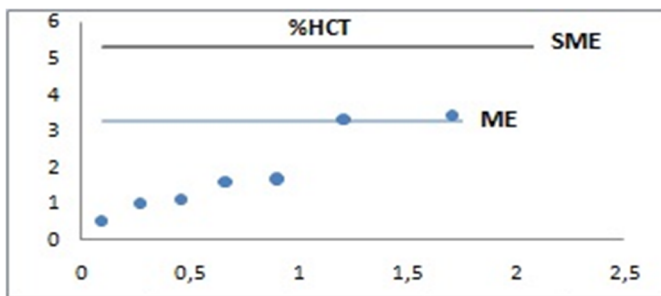
La ME et la MES sont calculés dans le tableau suivant :

**Tableau 18 : la ME et la MES calculées pour les différentes réponses**

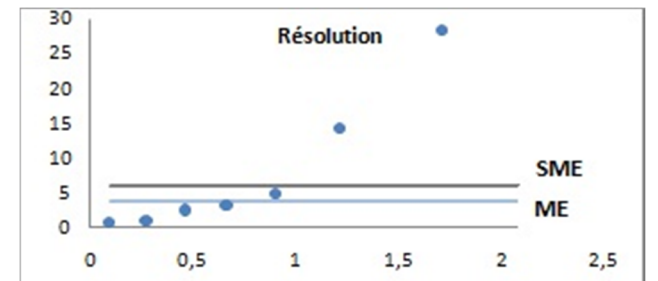
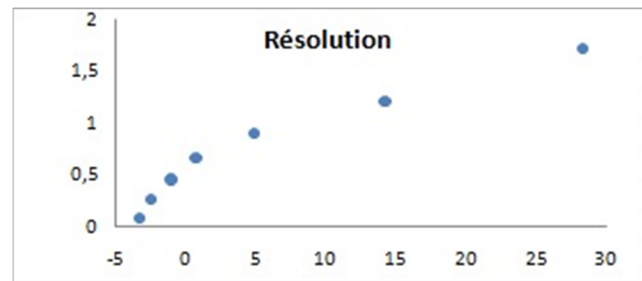
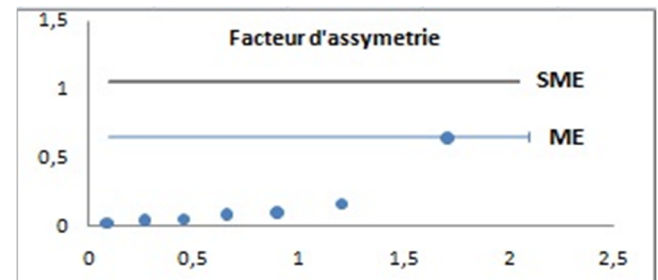
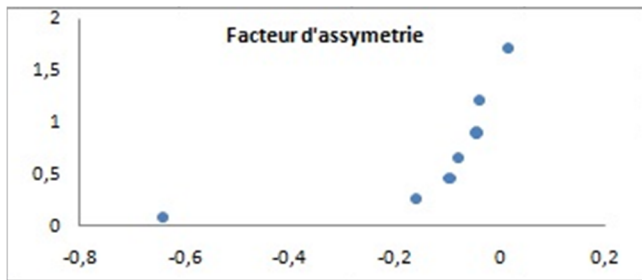
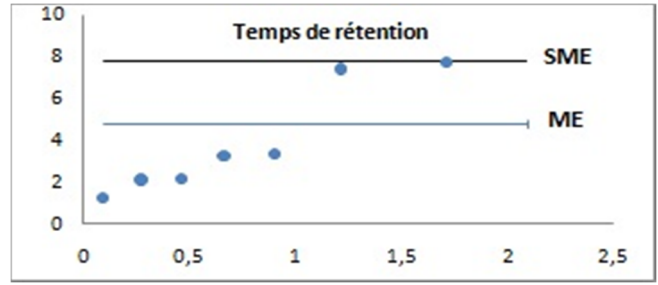
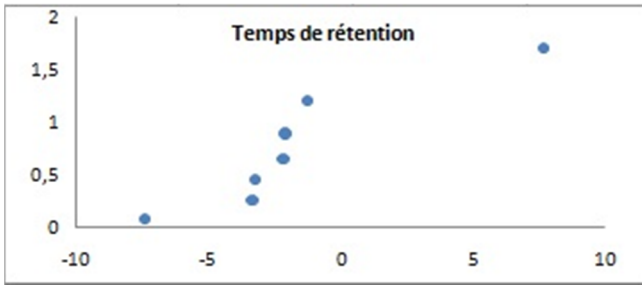
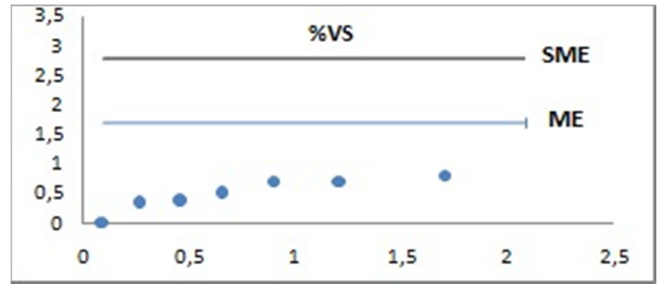
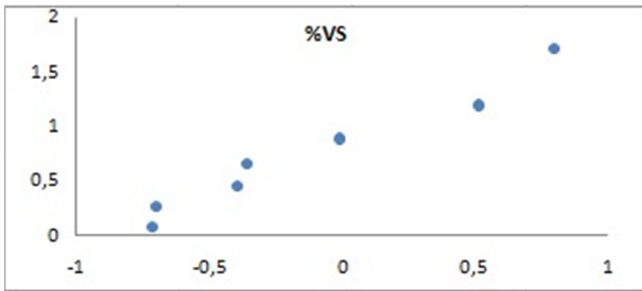
	Hydrochlorothiazide			Valsartan			
	Teneur en PA	Temps de rétention	Facteur d'asymetrie	Teneur en PA	Temps de rétention	Facteur de rétention	Résolution
ME	3.30	2.10	0.55	1.73	4.83	0.66	3.85
SME	5.36	3.42	0.89	2.81	7.86	1.07	6.26

Les courbes Normal probability plot et Half normal plot sont représentées comme suit :

- **Hydrochlorothiazide**



• Valsartan



D'après les courbes Half normal plot, les facteurs qui ont un effet à priori significatif sur les réponses sont :

- Le débit sur le temps de rétention pour l'hydrochlorothiazide
- Le %ACN début sur la teneur, le temps de rétention de l'hydrochlorothiazide et la résolution
- Le type de colonne sur toutes les réponses sauf la teneur du Valsartan

Note : dans la partie théorique on explique que lorsqu'on considère la ME comme critère de décision on augmente le risque des faux positifs, d'où l'intérêt d'une interprétation statistique

### 2.3. Interprétation statistique des effets calculés

Nous avons calculé le  $t_{théorique}$  des différents effets (selon l'équation de la partie 7.2 du chap3) :

**Tableau 19 : le critère de Student calculé des différents facteurs**

	Hydrochlorothiazide						Valsartan							
	Teneur HCT		Temps de rétention		Facteur d'asymétrie		Teneur valsartan		Temps de rétention		Facteur d'asymétrie		Résolution	
	E <sub>i</sub>	t <sub>théo</sub>	E <sub>i</sub>	t <sub>théo</sub>	E <sub>i</sub>	t <sub>théo</sub>	E <sub>i</sub>	t <sub>théo</sub>	E <sub>i</sub>	t <sub>théo</sub>	E <sub>i</sub>	t <sub>théo</sub>	E <sub>i</sub>	t <sub>théo</sub>
pH	0.53	0.01	0.10	0.04	0.03	0.43	0.52	0.01	3.34	0.54	0.05	0.98	0.98	0.24
Débit	1.62	0.02	0.69	0.31	0.04	0.56	0.01	0.0001	7.42	1.21	0.08	1.75	3.22	0.78
%ACN début	3.41	0.04	2.47	1.12	0.11	1.41	0.80	0.01	1.26	0.21	0.10	2.07	14.2	3.45*
%ACN fin	1.69	0.02	0.22	0.10	0.04	0.56	0.36	0.01	2.18	0.36	0.01	0.33	2.4	0.6
Longueur d'onde	1.03	0.01	0.24	0.11	0.01	0.1	0.70	0.01	2.10	0.34	0.16	3.5*	0.77	0.19
Température	1.10	0.01	0.72	0.33	0.07	0.88	0.39	0.01	3.25	0.53	0.04	0.87	4.93	1.20
Colonne	3.32	0.04	3.47	1.57	0.62	8.09**	0.71	0.01	7.72	1.26	0.64	14.0**	28.3	6.87* *

E<sub>i</sub> : l'effet du facteur i en valeur absolue

\*\* :  $t_{théo} > t_{(0,01;6)}$  avec  $t_{(0,01;6)} = 3.7$

\* :  $t_{théo} > t_{(0,05;6)}$  avec  $t_{(0,05;6)} = 2.45$  (voir annexe 4)

On déduit alors que :

- le type de colonne influence le facteur d'asymétrie des pics des deux PA ainsi que leur résolution,
- La longueur d'onde influence le facteur d'asymétrie du pic de Valsartan
- Le %ACN du début influence la résolution des deux pics des PA

### **3. Conclusion :**

Toutes les réponses influencées par les facteurs sont qualitatives on peut donc conclure que la méthode est robuste.

### **III. Exemple 2 : La méthode du dosage du Ridogrel**

#### **1. Introduction :**

L'étude de cas suivante décrit le test de robustesse appliqué à une méthode HPLC pour l'identification et le dosage d'un principe actif (MC) et la détection de deux produits apparentés (RC1 et RC2)

#### **2. Matériels et méthodes :**

##### **2.1. Produits chimiques et réactifs**

Les solutions utilisées dans ce test de robustesse sont:

- (i) une solution étalon contenant 125 mg/L de RC1 et de RC2 dans le méthanol
- (ii) une solution de référence contenant pour 100 ml, 25 mg de matériaux de référence MC et 1ml de solution étalon (i) dans un mélange méthanol : 0,25% d'acétate d'ammonium dans l'eau (9: 1, v: v)
- (iii) un échantillon de solution contenant 100 ml, 25,0 mg de MC, 1ml de la solution étalon (i) et 10 comprimés de formulation placebo dans un mélange méthanol: 0,25% d'acétate d'ammonium dans l'eau (9: 1, v: v)
- (iv) une solution à blanc contenant du méthanol: 0,25% d'acétate d'ammonium dans l'eau (9: 1, v: v)

Les mélanges pour préparer les solutions (ii) et (iii) sont agités mécaniquement pendant 30 minutes, dilués au volume et filtrés à travers un filtre résistant aux produits chimiques de 0,45 mm.

##### **2.2. Conditions nominales**

Les analytes sont élués à travers une colonne de type Hypersil BDS-C18-3 $\mu$ m 10cm  $\times$ 4.6 mm dans un mode d'élution en gradient à un débit de 1.5ml/min à température ambiante. le solvant de gradient utilisé est indiqué dans le tableau 13.

La détection des analytes est effectuée par spectrophotométrie à 265nm. Le volume d'injection est de 10ml

**Tableau 20 : le gradient des solvants utilisés**

Temps	%0.25 Acétate d'ammonium dans l'eau	Acetonitrile	Eau
0	50	25	25
13	50	43	7
15	50	43	7
17	50	25	25
22	50	25	25

**2.3. Sélection des facteurs et de leurs niveaux**

Les facteurs étudiés dans l'évaluation de la robustesse de la méthode HPLC pour l'identification et le dosage de MC et de ses substances apparentés sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 21:les facteurs retenus pour le test**

Facteurs	Unités	Pa ou modalité	Valeur nominale
Débit	ml/min	0.1	1.5
Le pH du tampon		0.3	6.8
La température de la colonne	°C	5	Ambiante
Le type de colonne		Alltech Hypersyl Prodigy, Phenomenex	Alltech
%ACN début	%	1	25
%ACN	%	2	43
Concentration du tampon	% m/v	0.025	0.25
La longueur d'onde	Nm	5	265

Les huit facteurs choisis ont été examinées dans un plan de *Plackett etBurman* pour 11 facteurs :

**Tableau 22 : Plan de Plackett etBurmanpour 11 facteurs et 12 essais**

Exp	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11
1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
4	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
5	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
6	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
7	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
8	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
9	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
10	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
11	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

F1 : pH du tampon ; F2 : type de colonne ; F3,F7 et F11 : facteurs fictifs ; F4 : température de la colonne ; F5 : %ACN début ; F6 : %ACN fin ; F8 : débit ; F9 :longueur d'onde ; F10 : concentration du tampon .

Aucune expérience aux valeurs nominales n'a été ajoutée

### 3. Résultats et discussion :

Les réponses déterminées dans ce test de robustesse sont :

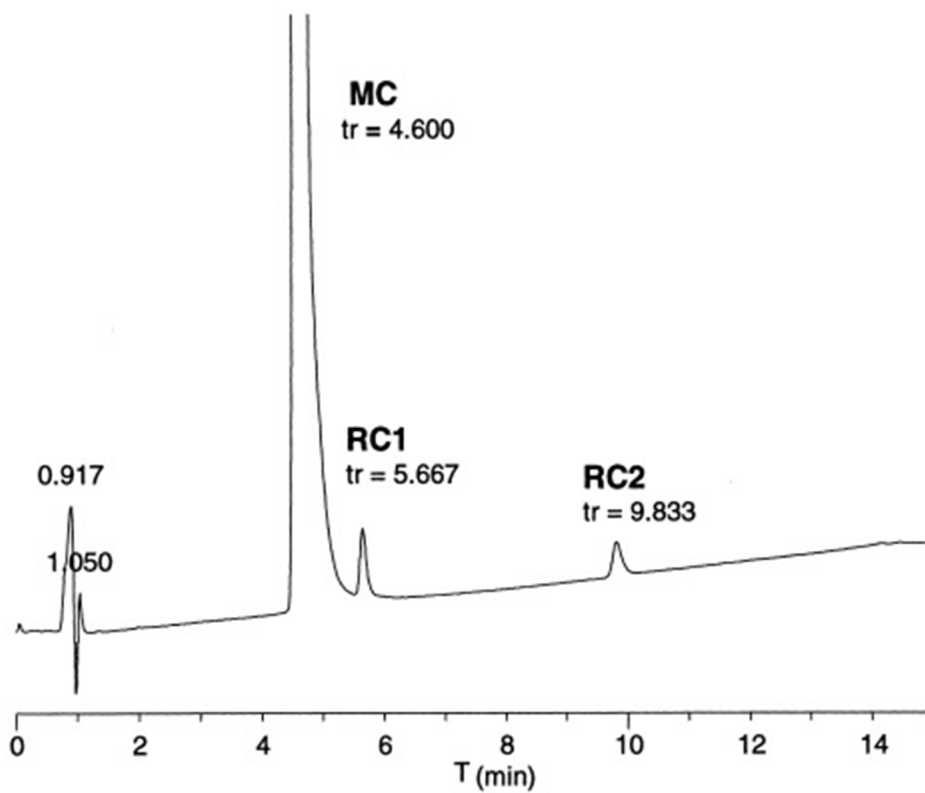
Les recouvrements de MC, RC1 et RC2 ;

La résolution RS de la paire de pics critiques MC et RC1 (voire figure 32)

Le facteur de capacité  $k'$  de MC

Le facteur d'asymétrie  $F_{as}$  de MC

Temps de rétention de la dernière substance éluée EC2 (voire figure 32)



**Figure 32 : Chromatogramme de la solution de référence contenant 100% du PA et 0.5% des substances apparentées aux conditions nominales**

Le tableau suivant montre les réponses obtenues :

Exp	Réponses						
	%MC	%RC1	%RC2	Rs	K'(MC)	fas	Tr
1	101.6	100.9	101.4	5.691	3.800	0.813	11.500
2	101.7	101.2	102.7	7.484	5.083	1.031	13.000
3	101.6	101.7	101.3	5.770	4.000	1.453	9.833
4	101.9	103.0	102.9	5.025	3.167	1.549	9.483
5	101.8	99.3	99.1	5.440	3.800	1.458	10.317
6	101.1	99.9	101.7	5.711	5.817	0.861	12.567
7	101.1	100.8	101.4	5.932	5.250	0.836	12.083
8	101.6	100.2	98.8	4.962	3.200	1.059	8.417
9	98.4	97.1	101.8	5.427	3.367	0.977	9.200
10	99.7	100.5	99.3	6.344	5.350	0.853	13.800
11	99.7	98.6	98.7	6.715	4.783	0.920	13.317
12	102.3	101.1	103.1	5.186	4.933	1.412	11.150
Moyenne	101.0	100.4	101.0	5.807	4.379	1.102	11.222
CV	1.15	1.52	1.61	12.131	20.24	24.519	15.122

Les effets sur les différentes réponses sont calculés et classés dans le tableau suivant :

Facteurs	%MC	%RC1	%RC2	Rs	K'	Fas	Tr
Ph	0.683	0.850	0.000	0.427	-0.547	0.204	0.039
Colonne	-0.450	-0.083	-0.300	1.011	1.269	-0.432	2.978
Facteur fictif 1	-0.683	-0.917	-0.500	-0.154	-0.047	-0.065	-0.039
Température	-0.717	-1.150	-0.367	0.408	-0.008	-0.103	-0.333
%ACNdébut	-1.117	-0.617	-1.067	-0.226	-0.869	-0.147	-0.539
%ACN fin	0.883	1.450	0.467	-0.584	-0.347	-0.013	-1.150
Facteur fictif 2	-0.017	-0.883	-0.300	0.031	-0.592	-0.146	-0.939
Débit	-0.017	-0.883	-0.300	0.031	-0.592	-0.146	-0.939
Longueur d'onde	0.517	0.650	-0.533	0.041	0.047	0.067	0.084
Concentration du tampon	-0.617	0.717	1.100	0.380	-0.019	0.029	0.022
Facteur fictif 3	-0.250	-0.350	-2.500	0.106	0.036	-0.011	0.144

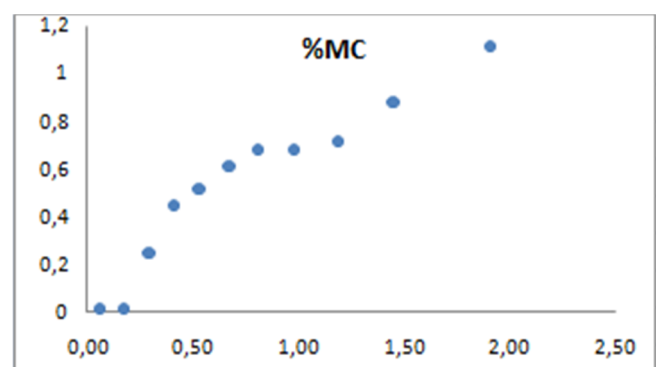
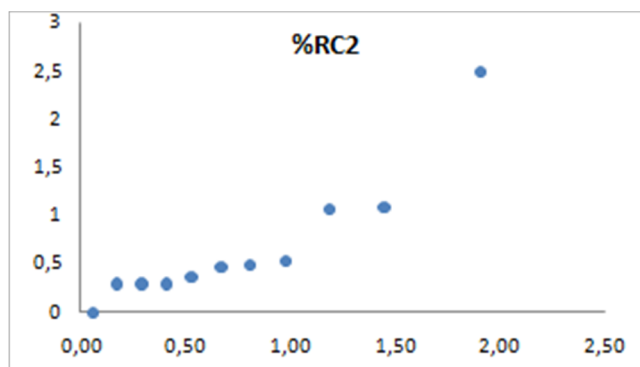
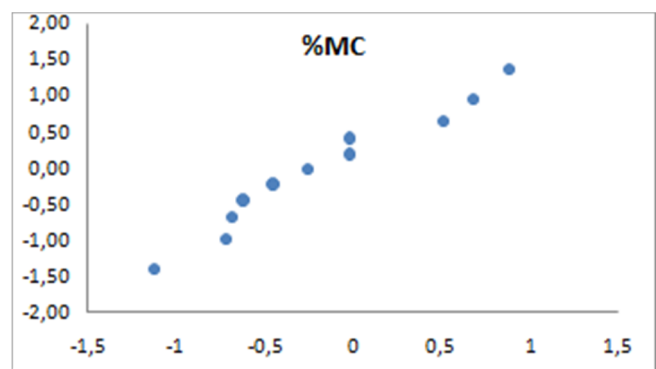
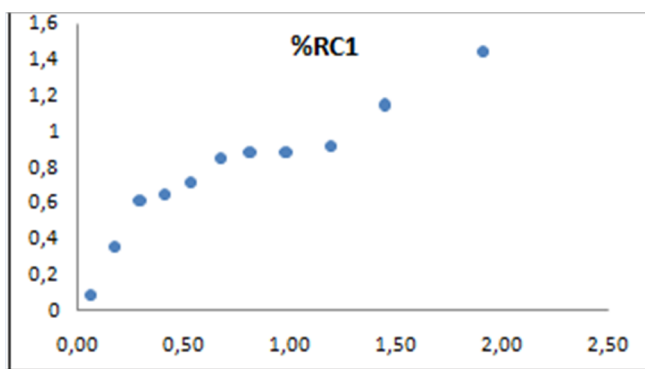
Les effets critiques correspondant à chaque réponse ont été calculés:

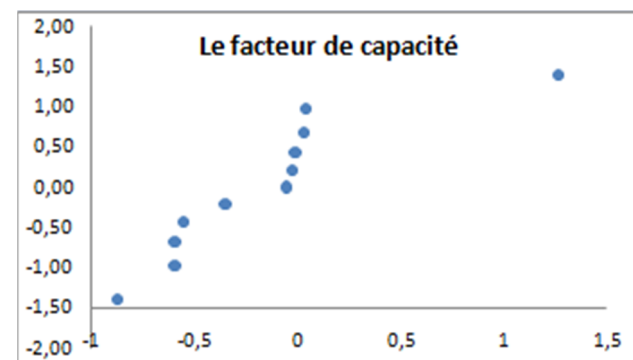
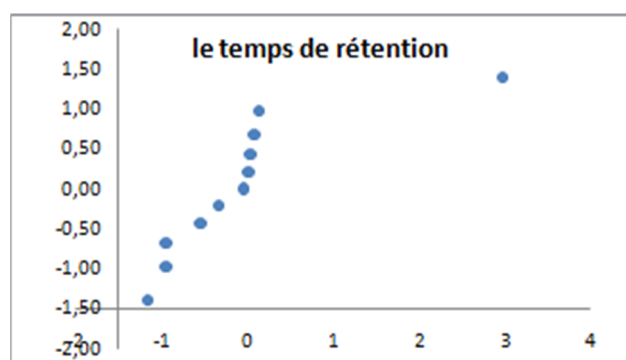
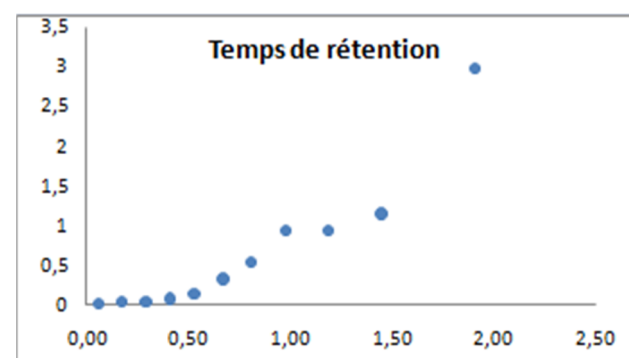
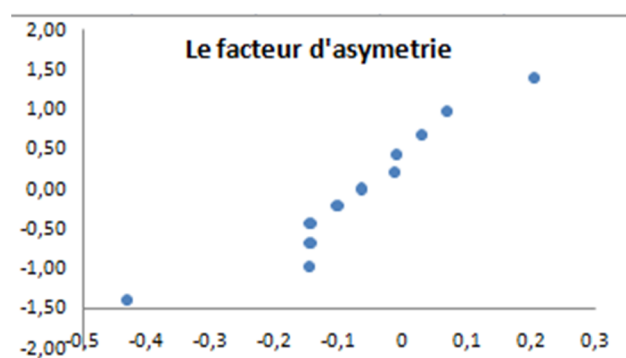
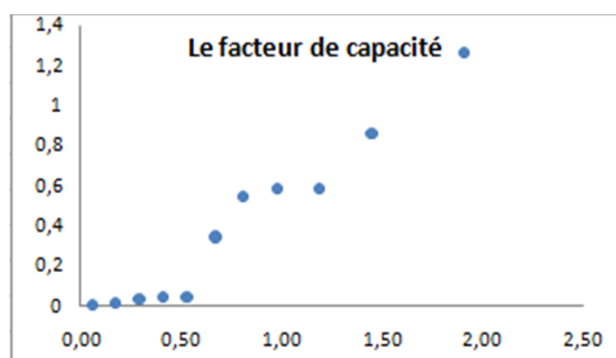
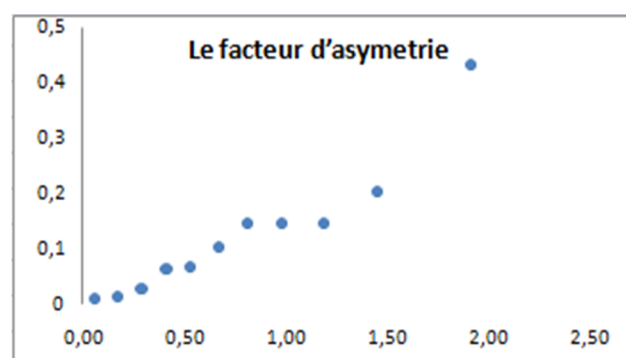
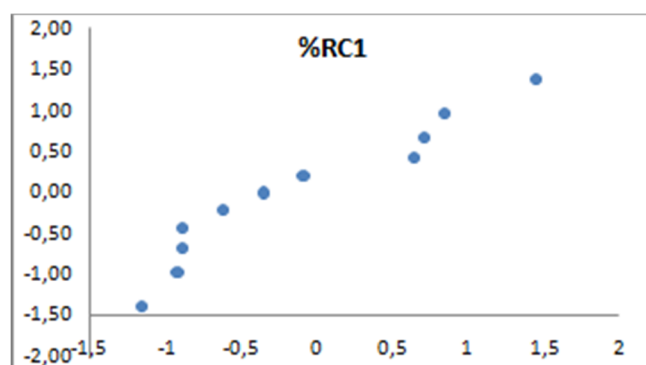
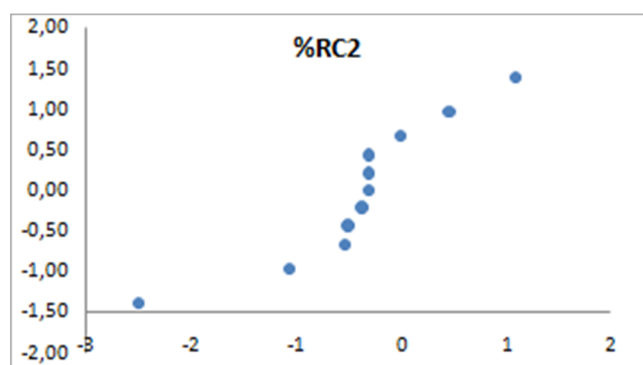
	%MC	%RC1	%RC2	Rs	K'	Fas	Tr
Alpha = 0.05	1.919	2.778	4.694	0.500	0.122	0.121	0.354
Alpha 0.1	1.419	2.054	3.471	0.370	0.090	0.090	0.262

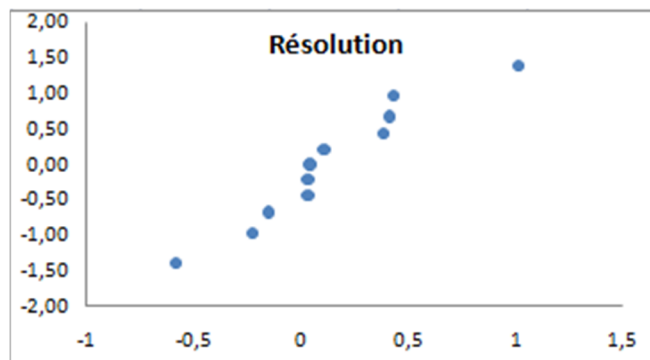
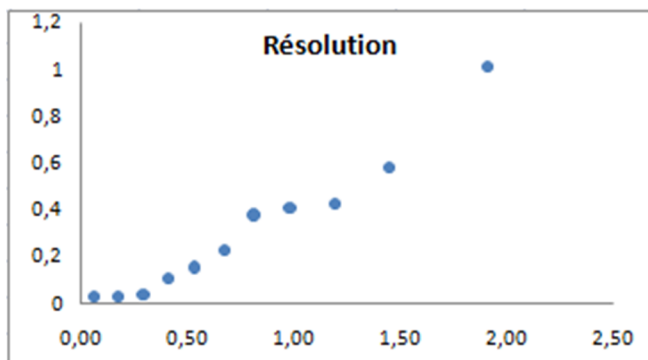
La marge d'erreur est calculée pour les différents facteurs dans le tableau suivant :

	%MC	%RC1	%RC2	Rs	K'	Fas	Tr
ME Alpha = 0.05	1.476	1.939	1.307	0.691	0.084	0.228	0.545
ME Alpha = 0.1	1.205	1.582	1.064	0.562	0.067	0.186	0.440

Les courbes Normal probability plot et Half normal plot sont représentées comme suit :







• Interprétation statistique :

Deux interprétations statistiques ont été effectuées, celle où l'estimation de l'erreur a été faite à partir des effets fictifs, et celle par l'algorithme de Dong. En général, une seule interprétation suffirait mais, dans ce travail, on a opté pour les deux à titre de comparaison.

Les effets critiques obtenus avec les deux interprétations sont indiqués dans le tableau suivant :

	%MC	%RC1	%RC2	Rs	K'	Fas	Tr
Estimation des effets critiques à partir des effets fictifs							
pH	-	-	-	A1	B1	B1	-
Colonne	-	-	-	B1	B1	B1	B1
Facteur fictif 1	-	-	-	-	-	-	-
Température	-	-	-	A1	-	A1	A1
%ACN debut	-	-	-	-	B1	B1	B1
%ACN fin	-	-	-	B1	B1	-	B1
Facteur fictif 2	-	-	-	-	-	-	-
Débit	-	-	-	-	B1	B1	B1
Longueur d'onde	-	-	-	-	-	-	-
Concentration du tempon	-	-	-	A1	-	-	-
Facteur fictif 3	-	-	-	-	-	-	-

Estimation par l'algorithme de Dong							
pH	-	-	-	-	D1	C1	-
Colonne	-	-	-	D1	D1	D1	D1
Facteur fictif 1	-	-	-	-	-	-	-
Température	-	-	-	-	-	-	-
%ACN debut	-	-	C1	-	D1	-	C1
%ACN fin	-	-	-	C1	D1	-	D1
Facteur fictif 2	-	-	-	-	-	-	-
Débit	-	-	-	-	D1	-	D1
Longueur d'onde	-	-	-	-	-	-	-
Concentration du tempon	-	-	C1	-	-	-	-
Facteur fictif 3	-	-	D1	-	-	-	-

A significatif à  $\alpha=0.1$

B significatif à  $\alpha=0.05$

C significatif à ME ( $\alpha=0.10$ )

D significatif à ME ( $\alpha=0.05$ )

En utilisant les effets des facteurs fictifs pour estimer l'erreur expérimentale, On observe que les recouvrements des substances ne sont pas considérés comme significativement affectés par les facteurs étudiés, alors que lorsqu'on a appliqué le critère de Dong certains facteurs ont été trouvés significatifs pour le %RC2 à un niveau de  $\alpha=0.1$ . Cette différence peut être expliquée par le fait que l'effet d'un facteur fictif (facteur 3) est relativement élevé, et affecte l'effet critique estimé à partir des effets fictifs, alors que ce n'est pas le cas pour la limite du critère de Dong.

Cela démontre que le critère de Dong est un estimateur plus robuste que l'erreur expérimentale lorsque les effets fictifs sont relativement importants.

En considérant les méthodes graphiques on pourrait également retirer le facteur fictif 3 de l'interprétation statistique, car il semble être une aberration à la population des effets non significatifs.

Après sa suppression de l'estimation de ES les effets critiques deviennent comparables à ceux estimés par le critère de Dong (voir tableau suivant) :

	%MC	%RC1	%RC2	Rs	K'	Fas	Tr
Alpha = 0.05	1.919	2.778	1.604	0.500	0.122	0.121	0.354
Alpha 0.1	1.419	2.054	1.088	0.370	0.090	0.090	0.262

#### 4. Conclusion :

La méthode de dosage de MC et de ses composés apparentés peut être considérée comme robuste parce que :

- Aucun des facteurs étudiés n'a un effet significatif à  $\alpha=0.05$  sur la détermination des recouvrements quand on estime l'erreur expérimentale à partir des facteurs fictifs.
- En utilisant le critère de Dong, aucun des facteurs n'a un effet significatif.
- Les résultats extrêmes obtenus dans le tableau des réponses se situent dans les limites d'acceptation de recouvrement (95%-105%)
- Les coefficients de variation des résultats sont également considérés acceptables pour cette méthode (1.2 ; 1.5 et 1.6 pour MC, RC1 et RC2 respectivement)

Le fait que pour les autres réponses telles que résolution, facteur de capacité, temps de rétention ou facteur d'asymétrie plusieurs effets significatifs sont trouvés ne signifie pas que la méthode doit être considérée comme non robuste ou que la méthode n'a pas été bien optimisée.

Lorsque l'aspect quantitatif de la méthode n'est pas influencé par les facteurs examinés, la méthode peut être considérée comme robuste.



A partir de ce travail nous avons essayé de présenter, de comprendre et d'utiliser un ensemble de méthodes et de modes de raisonnement destinés à tout expérimentateur désireux de la planification expérimentale et/ou de l'analyse de données dans le but d'optimiser l'efficacité de sa recherche expérimentale. Il existe des méthodes pertinentes et judicieuses adaptées à chaque problématique.

La méthode des essais et des erreurs, qui consiste à effectuer des expériences de manière séquentielle en faisant varier les facteurs d'entrée du système étudié l'un après l'autre, sans planification préalable, présente un certain nombre de limites, elle est très coûteuse en temps car elle nécessite inévitablement la réalisation d'un grand nombre d'expériences.

En regroupant les acteurs d'une étude au cours d'un brainstorming, la réflexion collective doit permettre de trouver les causes possibles d'un problème et les solutions de celui-ci en termes de méthodes ou de combinaisons de méthodes à appliquer.

La méthodologie des plans d'expériences aide l'expérimentateur à exprimer, au mieux, son problème en lui proposant des stratégies expérimentales optimales en fonction des objectifs qu'il s'est fixé, et des moyens dont il dispose. Les objectifs peuvent amener à explorer un domaine expérimental inconnu (recherche exploratoire dans le domaine de variation d'un ensemble de facteurs), à isoler les facteurs influents (plan de criblage), à élaborer des modèles descriptifs ou prévisionnels des phénomènes étudiés (étude quantitative des facteurs et des réponses), à effectuer des optimisations (plans à surfaces de réponses).

Les méthodes d'analyses de données ne peuvent être mises en œuvre sans que l'expérimentateur dispose d'un nombre suffisant de données expérimentales. L'objet de toutes ces méthodes est la description des relations entre plusieurs ensembles de données. Cette méthode ne s'applique qu'à des ensembles de données quantitatives.

A travers ce travail, nous avons développé et appliqué les méthodes qui semblaient les plus appropriées aux deux exemples étudiés. Les outils d'analyse et de synthèse et les plans d'expériences pouvant être utilisés pour traiter un problème sont nombreux et il est nécessaire de les adapter à chaque problématique. Les perspectives sur ce travail seraient d'approfondir la connaissance de ces méthodes mais également de découvrir et d'appliquer de nouveaux outils.



# *Résumés*

## Résumé

**Titre :** Application de la méthodologie des plans d'expérience à la robustesse des méthodes analytiques : Etude de cas Hydrochlorothiazide/ valsartan et Ridogrel

**Auteur :** Yacine AIT BAHCINE

**Mots clés :** Robustesse, approche multivariée, Plackett et Burman, validation analytique.

L'approche univariée classique qu'un expérimentateur effectue pour optimiser un processus, se fait en variant un facteur à la fois. Cette démarche donne des résultats biaisés, elle est coûteuse en temps et nécessite un grand nombre d'expériences. L'approche multivariée basée sur la méthodologie des plans d'expérience permet de collecter, de résumer et de présenter les données de façon à en tirer le maximum d'informations tout en réduisant les coûts et le temps.

L'objectif de cette thèse est, d'une part ; de présenter, la mise en œuvre et l'intérêt de la méthodologie des plans d'expériences à fin d'optimiser la robustesse d'une méthode analytique indicatrice de la stabilité, pour la détermination simultanée de l'hydrochlorothiazide et le valsartan en présence de leurs impuretés respectives ; et d'autre part, montrer l'intérêt des outils statistiques robustes appliqués à cette approche.

Le plan de criblage Plackett et Burman à 7 facteurs et 8 expériences a été appliqué pour déterminer les effets des facteurs importants. L'analyse statistique et graphique appliquées aux données ont montré que le type de colonne est le facteur le plus important affectant les réponses qualitatives : le facteur d'asymétrie, temps de rétention et résolution. Ce facteur a été pris en considération pour que la teneur en principe actif ne soit pas affectée. La méthode indicatrice de stabilité est considérée comme robuste.

Un deuxième exemple a été présenté en vue d'appliquer le test à un plan de Plackett et Burman à 11 facteurs, après avoir estimé l'erreur standard par l'algorithme de Dong et procédé à l'analyse graphique, la méthode du dosage du Ridogrel s'est avérée robuste.

## **Summary :**

Title: Application of the methodology of design of experiment to the robustness of analytical methods: case study Hydrochlorothiazide/Valsartan and Ridogrel

Autour : Yacine AIT BAHCINE

Keywords : Robustness, multivariate approach, Plackett-Burman, Analytical validation

The classical univariate approach that an experimenter performs to optimize a process with input and output elements, is realized by varying one factor at time, this approach gives biased results and may be time consuming due to the fact that it requires a large number of experiments the multivariate approach based on the design of experiments collects, summarizes and presents data in a way that maximizes the information while reducing the cost and time required to complete the experiments.

The aim of this thesis is to present, the implementation and the interest of the design of experiments methodology, in order to optimize the robustness of a stability indicating method for simultaneous determination of hydrochlorothiazide and valsartan in the presence of their respective impurities. And to raise the interest of the robust statistical tools applied to this approach.

The 7 factors Plackett and Burman screening plan . And 8 experiments has been applied to determine the effects of the main factors, the statistical (student) and graphical analysis histogram for effect estimation, normal probability plot. And half normal plot applied to the data, showed that the column type is the most important factor that affect a number of qualitative responses, namely peak tailing, retention time and resolution, this factor has been taken into account so that the active ingredient content is not affected. The indicating method of stability is considered robust.

A second example has been presented to apply the test to 11 factors Plackett-Burman plan, after estimating the standard error by the Dong algorithm and performing a graphical analysis the assay of Ridogrel is proved robust.

## ملخص

**العنوان:** تطبيق منهجية تصميم الاختبارات لدراسة متانة الطرق المقدارية : دراسة حالة الهيدروكلوروثيازيد/فالسارتان والريدوكريل.

**الكاتب:** ياسين ايت باحسين

**الكلمات الأساسية:** متانة – مقارنة متعددة المتغيرات – بلاكيت و بورمان – المصادقة التحليلية.

إن المقارنة ذات المتغير الواحد الكلاسيكية؛ التي يجريها مجرب ما قصد تحسين سيرورة العملية؛ تتم عن طريق استبدال متغير واحد كل مرة هذه الطريقة تقدم نتائج مُحَرَّفة، ومكلفة من حيث كونها تتطلب وقتا طويلا وتستلزم عددا كبيرا من التجارب. أما المقارنة المتعددة المتغيرات، التي تعتمد منهجية تصميم التجارب، فإنها تسنح بجمع وتلخيص وعرض البيانات بطريقة تُمكن من استخلاص الحد الأقصى من المعلومات مع اختزال التكاليف والمدة الزمنية.

الهدف من هذه الأطروحة هو؛ من جهة، تقديم آليات وصلاحيات منهجية تصميم التجارب لتحسين متانة المنهجية التحليلية الدالة على الاستقرار، من أجل التحديد المتزامن لـ "هيدروكلوروثيازيد" (Hydrochlorothiazide) و"فالسارتان" (Valsartan) في وجود الشوائب الخاصة بكل منهما؛ ومن جهة أخرى، إبراز أهمية الأدوات الإحصائية المتينة المطبقة على هذه المقارنة.

لقد تم تطبيق خطة اختبار "بلاكيت و بورمان" (PLACKET et BURMAN)؛ ذي العوامل السبعة والتجارب الثمانية؛ من أجل تحديد آثار العوامل الهامة. وأظهر التحليل الإحصائي والرسومي البياني المطبقين على البيانات، أن نوع العمود هو العامل الأكثر أهمية الذي يؤثر على الاستجابات النوعية: وقت الاستبقاء (temps de Rétention) و درجة الفصل (Résolution) لقد تم الأخذ بعين الاعتبار هذا العامل لكي لا يتأثر محتوى المكون النشط. كما تم اعتبار الطريقة الدالة على الاستقرار متينة.

وتم تقديم مثال ثانٍ لتطبيق الاختبار على تصميم "بلاكيت و بورمان" ذات العوامل الإحدى عشر؛ بعد تقدير الخطأ القياسي بواسطة "خوارزمية دونك" (Algorithme de DONG) وإجراء تحليل رسومي - بياني؛ فأثبتت "الطريقة المقدارية لـ ريدوكريل" (la méthode du dosage du Ridogrel) متانتها.



*Annexe*

## *Annexe 1 : Vocabulaire plan d'expérience (liste non définitives)*

- **Criblage :**

Plan d'expériences qui aide à dégager le poids des facteurs principaux.

- **Effet d'un facteur :**

Quantification de l'influence d'un facteur sur une réponse.

- **Essai :**

Réalisation d'une expérience.

- **Expérience :**

Combinaison de niveaux ou modalités des facteurs contrôlés.

- **Expérimentation :**

Ensemble des expériences réalisées.

- **Facteur :**

Cause possible de variation de la ou des réponses étudiées.

- **Facteur bruit :**

Facteur habituellement non maîtrisé, et dont les fluctuations en fonctionnement normal peuvent être une source de variation de la ou des réponses.

- **Facteur contrôlé :**

Facteur dont la variation est maîtrisée pendant l'expérimentation.

- **Fonction de désirabilité :**

Fonction qui permet de combiner plusieurs réponses dans le but de réaliser une optimisation multiple.

- **Interaction :**

Effet pour lequel l'influence apparente d'un facteur sur la réponse dépend d'un ou de plusieurs autres facteurs.

- **Matrice d'expériences :**

Traduction formalisée du plan d'expérience par tableau dont chaque ligne est une expérience et chaque colonne est un facteur.

- **Modalité :**

Valeur que peut prendre un facteur qualitatif durant l'expérimentation.

- **Modèle :**

En plans d'expériences, c'est une équation permettant de relier la réponse aux facteurs.

- **Niveau :**

Valeur numérique prise par un facteur quantitatif durant l'expérimentation.

- **Plan d'expériences :**

Ensemble des expériences prévues et organisées par l'expérimentateur.

- **Réponse :**

Caractéristique traduisant le fonctionnement du système.

- **Randomisation :**

Consiste à tirer au hasard l'ordre des essais pour supprimer l'influence des facteurs perturbateurs non identifiés pouvant être corrélés avec l'ordre des essais.

- **Série d'essais :**

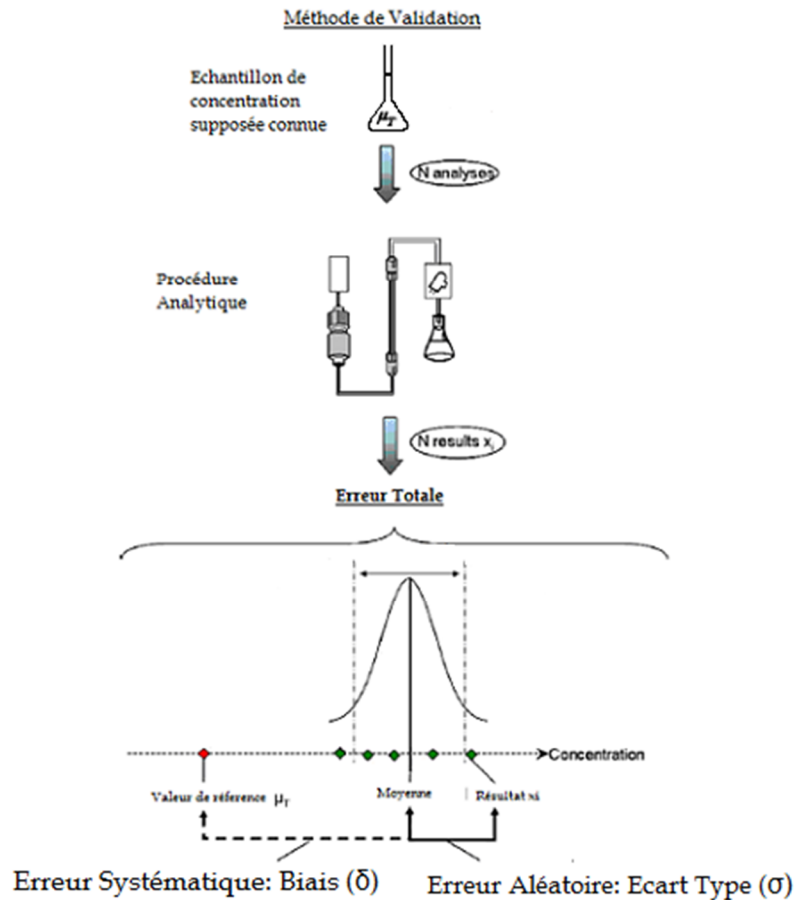
Ensemble des essais réalisés dans le cadre d'un plan d'expériences.

## ***Annexe 2 : Rappel sur les types d'erreur***

En règle générale, deux principaux types d'erreur sont reconnus en chimie analytique: l'erreur systématique et l'erreur aléatoire, comme le montre la Figure en dessous . Pour estimer l'erreur aléatoire, les variances, les écarts-types ou les coefficients de variation sont calculés sur la base des mesures répétées du même échantillon. Pour estimer l'erreur systématique, la première étape consiste à calculer la moyenne de plusieurs répétitions de mesures de même échantillon, puis l'écart à une valeur de référence est calculé afin d'estimer le biais.

Ces deux composantes d'erreur sont faciles à estimer lorsque plusieurs répétitions d'un échantillon avec une concentration de référence ou une valeur conventionnellement vraie sont analysées. L'évaluation séparée de ces deux parties est souvent appliquée dans la validation des méthodes, dans le transfert, dans la comparaison des méthodes ou dans les études inter-laboratoires.

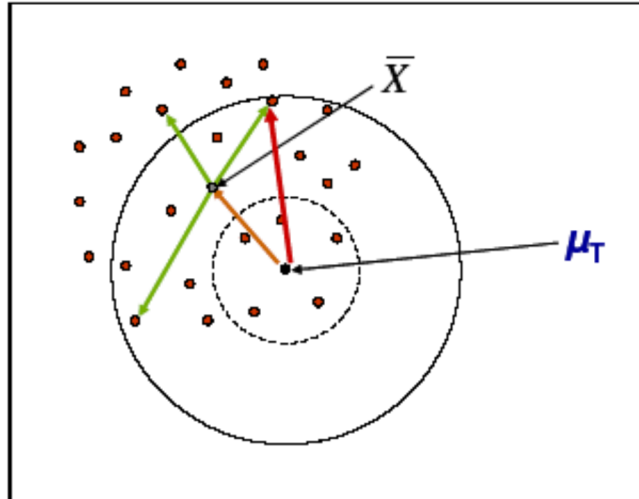
Enfin, certains auteurs ont proposé de subdiviser ces deux grandes catégories d'erreurs afin de diagnostiquer les sources les plus importantes d'erreurs [19, 20,45, 54-57]. La détermination de la quantité relative de chaque source est essentielle, si l'on vise à améliorer les performances analytiques d'une méthode (par exemple, en réduisant le biais dont l'origine est due à des facteurs contrôlables, tels que les opérateurs ou les équipements). Ce point est d'un intérêt surtout pour les laboratoires de R & D ou les fabricants des kits de dosage.



**L'erreur totale pour la validation des méthodes. \* La concentration de l'échantillon n'est jamais connue parfaitement, c'est, en général, la valeur de référence ou valeur vraie par convention qui est utilisée.**

Cependant, quand seulement une seule mesure est effectuée, comme lors de l'analyse en routine, il est impossible de différencier ces deux types d'erreur. Comme l'illustre la Figure

13, une seule mesure est soumise à l'ensemble des erreurs d'analyse, c'est-à-dire de la combinaison simultanée des composantes systématiques et aléatoires de l'erreur.



**Représentation schématique des composantes de l'erreur; flèche orange: Erreur systématique ou biais, flèche verte : erreur aléatoire ou écart type ; Flèche rouge : erreur totale.  $\bar{X}$  est la moyenne des résultats (points rouges) et  $\mu_T$  est la vraie valeur.**

Donc, l'erreur totale est une mesure de la distance entre tout résultat individuel et la valeur de référence de la concentration de l'analyte présent dans l'échantillon. L'erreur d'analyse totale ou l'erreur totale est donc la combinaison simultanée des parties systématiques et aléatoires de l'erreur.

*Annexe 3 : liste non exhaustive des logiciels d'analyses de données et des plans d'expériences.*

NEMRODW	université de Marseille	<a href="http://www.Nemrodw.com">www.Nemrodw.com</a>
JMPSAS	Institute SA	<a href="http://www.jmp.com">www.jmp.com</a>
STATISTIC	AStatsoft France	<a href="http://www.statsoft.com">www.statsoft.com</a>
STATGRAPHICS	Sigma plus	<a href="http://www.sigmaplus.fr">www.sigmaplus.fr</a>
MINITAB	Minitab Inc	<a href="http://www.minitab.fr">www.minitab.fr</a>
STAVEX	Aicos technologies AG	<a href="http://www.aicos.com">www.aicos.com</a>
MODDE	Sigma plus	<a href="http://www.sigmaplus.fr">www.sigmaplus.fr</a>
CORICO	Statistique industrielle	<a href="http://www.knowllence.com">www.knowllence.com</a>
EXCEL	Microsoft	<a href="http://www.products.office.com">www.products.office.com</a>
XLSTAT	Addinsoft	<a href="http://www.xlstat.com">www.xlstat.com</a>

*Annexe 4 : Table de la Loi t de Student (pour test bilatéral)*

*Niveau de confiance 95% ( $\alpha=0.05$ )*

<i>n-1</i>	<i>t</i> ( $\alpha=0.05$ )	<i>n-1</i>	<i>t</i> ( $\alpha=0.05$ )	<i>n-1</i>	<i>t</i> ( $\alpha=0.05$ )
1	12.706	21	2.080	45	2.014
2	4.303	22	2.074	50	2.009
3	3.182	23	2.069	55	2.004
4	2.776	24	2.064	60	2.000
5	2.571	25	2.060	65	1.997
6	2.447	26	2.056	70	1.994
7	2.365	27	2.052	80	1.990
8	2.306	28	2.048	90	1.987
9	2.262	29	2.045	100	1.984
10	2.228	30	2.042	110	1.982
11	2.201	31	2.040	120	1.980
12	2.179	32	2.037	130	1.978
13	2.160	33	2.035	140	1.977
14	2.145	34	2.032	150	1.976
15	2.131	35	2.030	200	1.972
16	2.120	36	2.028	250	1.970
17	2.110	37	2.026	300	1.968
18	2.101	38	2.024	400	1.966
19	2.093	39	2.023	500	1.965
20	2.086	40	2.021	1000	1.962



# *Références*

- [1]. Feinberg. M -LABO-STAT - Guide de validation des méthodes d'analyse; LavoisierEdition Tec & Doc 2009.
- [2]. Rozet E., Improvement of the predictive character of test results issued from analytical methods life cycle, Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège, 2007-2008.
- [3]. Feinberg M., Boulanger B., Dewe W., Hubert Ph., New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data, *Analytical and Bioanalytical chemistry*, 380, 502 – 514 (2004).
- [4]. Marini R., Evaluation des différentes approches pour l'estimation de l'incertitude des Mesures analytiques, Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège, 2005-2006.
- [5]. Duarte A.C., Capelo S., 2006, Application of Chemometrics in Separation Science, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29, 114-1176.
- [6]. Goupy J., Stratégie de recherche, Définition et objectifs des méthodes des plans d'expériences, Dunod, Paris, France (1996).
- [7]. Albert A., Analyses statistiques multivariées, Edition de l'ULg, Liège (2006).
- [8]. Sado G., Sado M.-C., De l'expérimentation à l'assurance de qualité in Les plans d'expériences, AFNOR, Paris, France (1991).
- [9]. Servais A.-C., séparation et dosage de substances médicamenteuses par électrophorèse capillaire en milieux non aqueux : influence de l'utilisation simultanée d'une cyclodextrine et d'un agent d'appariement d'ions, Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège, 2004 – 2005.
- [10]. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Geneva, Switzerland, 2005.
- [11]. Application of the statistics-accuracy (trueness and precision) of the results and methods of measurement – Parts 1 to 6, International Organization of Standardization (ISO), ISO 5725, ISO, Geneva, Switzerland, 1994.

- [12]. US Federal Government, Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Rockville, MD, USA, May 2001.
- [13]. The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory guide to method validation and related Topics, Eurachem, Teddington, Middlesex, UK, 1998.
- [14]. IUPAC Technical Report Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis 2002
- [15]. AOAC, Official Methods of Analysis, Vol. 1, Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Arlington, VA, 15th ed., pp. 673-674, 1990,
- [16]. Caporal-Gautier J., Nivet J.M., Algranti P., Guilloteau M., Histe M., Lallier L., N'Guyen-Huu J.J., Russotto R., Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. I : Méthodologie, *STP Pharma Pratiques*, 2, 205-226 (1992)
- [17]. Hubert Ph., Nguyen-Huu J.-J., Boulanger B., Chapuzet E., Chiap P., Cohen N., Compagnon P.-A., Dewe W., Feinberg M., Lallier M., Laurentie M., Mercier N., Muzard G., Nivet C., Valat L., Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures, A SFSTP proposal - Part I : *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36, p. 579-586 (2004).
- [18]. Hubert Ph., Chiap P., Crommen J., Boulanger B., Chapuzet E., Mercier N., Bervoas-Martin S., Chevalier P., Grandjean D., Lagorce P., Lallier M., Laparra M.C., Laurentie M., Nivet J.C., The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory, *Analytica Chimica Acta*, 391, 135-148 (1999)
- [19]. ISO 5725-1, International Organization for Standardization (ISO), Statistical methods for quality control, accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results-part 1: General principles and definitions, Geneva, ISO vol. 1, 4th ed. (1994)

- [20]. Hubert Ph., Nguyen-Huu J.-J., Boulanger B., Chapuzet E., Cohen N., Compagnon P.-A., Dewé W., Feinberg M., Laurentie M., Mercier N., Muzard G., Valat L., Rozet E., Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal– Part II : *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45, p. 70-81 (2007).
- [21]. Boulanger B., Chiap P., Dewe W., Crommen J., Hubert Ph., An analysis of the SFSTPguide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progresses and limitations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32, 753-765 (2003)
- [22]. Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Massart D.L., McDowall R.D., Validation of bioanalytical chromatographic methods, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17, 193-218 (1998)
- [23]. Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Penninckx W., Vander Heyden Y., Vankeerberghen P., Massart D., Reappraisal of hypothesis testing for method validation: detection of systematic error by comparing the means of two methods of two laboratories, *Analytical Chemistry*, 67, 4491-4499 (1995)
- [24]. Schuirmann D.J., A comparison of the two one-sided tests procedure and the power approach for assessing the equivalence of average bioavailability. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 15, 657-680 (1987)
- [25]. Kringle R.O., An assessment of the 4-6-20 rule for acceptance of analytical runs in bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies, *Pharmaceutical Research*, 11, 556-560 (1994)
- [26]. Hubert Ph., Nguyen-Huu J.-J., Boulanger B., Chapuzet E., Cohen N., Compagnon P.-A., Dewé W., Feinberg M., Laurentie M., Mercier N., Muzard G., Valat L., Rozet E., Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal–Part III, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45, p. 82-96 (2007).

- [27]. Hubert Ph., Nguyen-Huu J.-J., Boulanger B., Chapuzet E., Cohen N., Compagnon P.-A., Dewé W., Feinberg M., Laurentie M., Mercier N., Muzard G., Valat L., Rozet E., Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal–Part IV, Examples. *Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis*, 48, p. 760-771 (2008).
- [28]. Bouklouze .A, Digua .K, Démarche statistique de la validation analytique dans le domaine pharmaceutique(méthodologie et exemple pratique ) – Les technologies de laboratoire N1 (2006).
- [29]. M. Elkarbane, M.A. Al-Kamarany, H. Bouchafra, M. Azougagh, Y. Cherrah, P. Hubert, Y. Vander Heyden, A. Bouklouze, Total Error-Based Validation Including the Experimental Design-Based Robustness Evaluation of a Stability-Indicating Method for the Simultaneous Quantification of Hydrochlorothiazide and Valsartan in Tablet Formulations, *Acta Chromatographica*, 27 (2015) 195- 214.
- [30]. WALD (A.) et WOLFOWITZ (J.). – Tolerance limits for a normal distribution. *Annals of Mathematical Statistics*, 17, p. 208-215 (1946).
- [31]. JCGM 200:2012 (Joint Committee for Guides in Metrology). – Vocabulaire international de métrologie – Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM). 3e édition (2012)
- [32]. EURACHEM/CITAC. – Quantifier les incertitudes de mesure. 2<sup>nde</sup> édition 2000
- [33]. AFNOR. – Analyse des produits agricoles et alimentaires – Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude. NF V03-110:2010.
- [34]. FEINBERG (M.), BOULANGER (B.), DEWÉ (W.) et HUBERT (P.). – New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380 (3 SPEC.ISS.), p. 502-514 (2004).
- [35]. FEINBERG (M.). – Validation of analytical methods based on accuracy profiles. *Journal of Chromatography A*, 1158(1-2), p. 174-183 (2007).

- [36]. MARINI (R.D.), CHIAP (P.), BOULANGER (B.), RUDAZ (S.), ROZET (E.), CROMMEN (J.) et HUBERT (P.). – LC method for the determination of R-timolol in S-timolol maleate: Validation of its ability to quantify and uncertainty assessment. *Talanta*, 68(4), p. 1166-1175 (2006).
- [37]. Max FEINBERG –Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude. Qualité et sécurité au laboratoire. Dossier technique de l'ingénieur. [P 224] (2012).
- [38]. ISO 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO, Geneva, Switzerland (2000)
- [39]. Rius A., Ruisanchez I., Callao M.P., Rius F.X., Reliability of analytical systems: use of control charts, time series models and recurrent neural networks (RNN), *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 40, 1–18 (1998)
- [40]. Kringle R.O., An assessment of the 4-6-20 rule for acceptance of analytical runs in bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies, *Pharmaceutical Research*, 11, 556-560 (1994)
- [41]. Kringle R.O., An assessment of the 4-6-20 rule for acceptance of analytical runs in bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies, *Pharmaceutical Research*, 11, 556-560 (1994)
- [42]. Jacques Goupy and Lee Creighton. 2007. Introduction to Design of Experiments with JMP Examples, Third Edition (3rd ed.). SAS Publishing.
- [43]. BOX George.E. P. , HUNTER William G. , HUNTER J. Stuart «Statistics for Experimenters» deuxième édition. John Wiley and Sons. New-York. 633 pages. (2005).
- [44]. Chiap P., Association de la dialyse à la chromatographie liquide pour le dosage automatisé de médicaments dans le plasma, Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège, 1999 – 2000.
- [45]. Goupy J., Creighton L., Introduction aux plans d'expériences, Dunod, Paris, France (2001)
- [46]. Mason R.L., Statistical design and analysis of experiments, Wiley, New Jersey (2003)
- [47]. Dean A., Voss D., Design and analysis of experiments, Springer, New York (1999)

- [48]. Feinberg M., Optimisation de la réponse, La validation des méthodes d'analyse – Une approche chimométrique de l'assurance qualité du laboratoire, Masson, Paris, France (1996)
- [49]. AFNOR, FD X 06-081 : juin 2003. Plans d'expériences Guide pour le choix d'un plan d'expériences.
- [50]. FDA, 2000, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, draft guidance.
- [51]. Gautier, J.C., Nivet, J.M., Algranti, P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, M., N'guyen-Huu, J.J. et Russotto, R. 1992. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. I- Méthodologie. STP Pharma Prat. Vol.2 (4): 205-226.
- [52]. Youden, E.H. Steiner, Statistical manual of the association of official analytical chemists, The Association of Official Analytical Chemists ed., Arlington, 1975, pp.33–36, 70–71, 82–83.
- [53]. J.A. Van Leeuwen, L.M.C. Buydens, B.G.M. Vandeginste, G. Kateman, P.J. Schoenmakers, M. Mulholland, RES, an expert system for the set-up and interpretation of a ruggedness test in HPLC method validation. Part 1: the ruggedness test in HPLC method validation, Chemometrics and Intelligent Laboratory systems 10 (1991) 337–347.
- [54]. J.C. Miller, J.N. Miller, Statistics for Analytical Chemistry, Ellis Horwood, New York, 1993, pp. 53–59.
- [55]. D. Dadgar, P.E. Burnett, M.G. Choc, K. Gallicano, J.W. Hooper, Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 13 (1995) 89–97.
- [56]. Fabre H., 1996, Robustness testing in liquid chromatography and capillary electrophoresis, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 14, 1125-1132.
- [57]. Eurachem, A focus for analytical chemistry in Europe, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, First Edition 1995.

- [58]. Y. Vander Heyden, D.L. Massart, Review of the use of robustness and ruggedness in analytical chemistry, in: A. Smilde, J. de Boer, M. Hendriks (Eds.), *Robustness of Analytical Methods and Pharmaceutical Technological Products*, Elsevier, Amsterdam, 1996, pp. 79–147.
- [59]. E. Morgan, *Chemometrics: experimental design*, Analytical Chemistry by Open Learning, J. Wiley, Chichester, 1991, p. 118-188.
- [60]. Y. Vander Heyden, D.L. Massart, Review of the use of robustness and ruggedness in analytical chemistry, in: A. Smilde, J. de Boer, M. Hendriks (Eds.), *Robustness of Analytical Methods and Pharmaceutical Technological Products*, Elsevier, Amsterdam, 1996, pp. 79–147.
- [61]. J.J. Pignatiello and J.S. Ramberg, Discussion, *Journal of Quality Technology*, 17 (1985) 198-206.
- [62]. J.H. de Boer, *Chemometrical Aspects of Quality in Pharmaceutical Technology. The application of robustness criteria and multi criteria decision making in optimization procedures for pharmaceutical formulations*, Doctoral thesis, 1992.
- [63]. R.N. Kacker, Off-line Quality Control, Parameter Design, and The Taguchi Method, *Journal of Quality Technology*, 17 (1985) 176-188.
- [64]. M.J. Cozar-Bernal, A.M. Rabasco, M.L. Gonzalez-Rodriguez, Development and validation of a highperformance chromatographic method for determining sumatriptan in niosomes, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72 (2013) 251-260.
- [65]. V.A.L. Wortel, W.G. Hansen, S.C.C. Wiedemann, Optimising multivariate calibration by robustness criteria, *Journal of near Infrared Spectroscopy*, 9 (2001) 141-151.
- [66]. S. Bruns R.E. , I.S., de Barros Neto B. , *Statistical Design - Chemometrics*, Elsevier B.V., Amsterdam, 2006.
- [67]. G. Box, W. Hunter, J. Hunter, *Statistics for Experimenters, an introduction to Design, Data analysis and Model Building*, J. Wiley, New York, 1978, p. 306- 418.
- [68]. G. Wynia, P. Post, J. Broersen and F. Maris, Ruggedness testing of a gas chromatographic method for residual solvents in pharmaceutical substances, *Chromatographia*, 39(5/6) (1994) 355-362.

- [69]. T.B. Solanki, P.A. Shah, K.G. Patel, Central composite design for validation of hptlc method for simultaneous estimation of olmesartan medoxomil, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide in tablets, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76 (2014) 179-187.
- [70]. R. Petkovska, C. Cornett, A. Dimitrovska, Experimental design approach for the development and validation of an enantiospecific RP-HPLC method for simultaneous determination of clopidogrel and related compounds, *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 27 (2008) 53-64.
- [71]. [71] R.L. Plackett, J.P. Burman, The design of optimum multifactorial experiments, *Biometrika*, 33 (1946) 305-325.
- [72]. Y. Vander Heyden, M.S. Khots, D.L. Massart, Three-level screening designs for the optimisation or the ruggedness testing of analytical procedures, *Anal. Chim. Acta*, 276 (1993) 189-195.
- [73]. M. Mulholland, J. Waterhouse, Development and evaluation of an automated procedure for the ruggedness testing of chromatographic conditions in highperformance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 395 (1987) 539-551.
- [74]. L. Abdel-Malek, Test de robustesse, Comett Euro training course in advanced HPLC and capillary electrophoresis, Montpellier, September 1993.
- [75]. J.A. Van Leeuwen, L.M.C. Buydens, B.G.M. Vandeginste, G. Kateman, P.J. Schoenmakers, M. Mulholland, RES, an expert system for the set-up and interpretation of a ruggedness test in HPLC method validation. Part 2: The ruggedness expert system, *Chemometrics and Intelligent Laboratory systems*, 11 (1991) 37-55.
- [76]. Y Vander Heyden, A Nijhuis, J Smeyers-Verbeke, B.G.M Vandeginste, D.L Massart, Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 24, pp.723-753 .
- [77]. Y. Vander Heyden, K. Luybaert, C. Hartmann, D.L. Massart, J. Hoogmartens, J. De Beer, Ruggedness tests on the HPLC assay of the United States Pharmacopeia XXII for tetracycline hydrochloride. A comparison of experimental designs and statistical interpretations, *Analytica Chimica Acta* 312 (1995) 245–262.
- [78]. Support du logiciel minitab version 18

- [79]. <http://www.wikilean.com/Articles/Improve/5-Les-plans-de-Plackett-et-Burman> pour-Screening consulté le 24/03/2017
- [80]. <http://www.statsoft.fr/concepts-statistiques/glossaire/h/henry.html> consulté le 24/03/2017
- [81]. A. Bouklouze et K. Digua, Outils statistiques pour l'analyse – LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE - N°1 - 2006 — p15
- [82]. F. Dong, On the identification of active contrasts in unreplicated fractional factorials, *Statistica Sinica* 3 (1993) 209–217.
- [83]. M. ELKarbane, M. Amood AL-Kamarany, M. Azougagh, H. Bouchafra, Y. Cherrah, Ph. Hubert , Y. Vander Heyden, A. Bouklouze - Total error based validation including the experimental design based robustness evaluation of a stability indicating method for simultaneous quantification of hydrochlorothiazide and valsartan in Tablet



## Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.
- D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé publique, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.
  - D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.
- Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.

جامعة محمد الخامس  
كلية الطب والصيدلة  
- الرباط -



قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

أقسم بالله العظيم

- أن أراقب الله في مهنتي

- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.

- أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.

- أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.

- أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلي أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.

- لأحظى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

**تطبيق منهجية تصميم الاختبارات  
لدراسة متانة الطرق المقدارية:  
دراسة حالة الهيدروكلوروثيازيد / فالسارتان وريدوكريل**

**أطروحة**

قدمت ونوقشت علانية يوم : .....

من طرفه

**السيد: ياسين آيت باحسين**

المزاد في: 11 أبريل 1993

**لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة**

الكلمات الأساسية: متانة - مقارنة متعددة المتغيرات - بلاكيت وبورمان - المصادقة التحليلية.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

السيد: يحيى الشراح

أستاذ في علم الصيدلة

مشرف

السيد: عبد العزيز بوكلوز

أستاذ في علم التطبيقات الصيدلانية

السيد: محمد أنصار

أستاذ في الكيمياء العلاجية

أعضاء

السيد: مولاي العباس فوزي

أستاذ في علم الصيدلة

السيد: مصطفى بوعطية

أستاذ في الكيمياء التحليلية