

Université de Strasbourg  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**

N° d'ordre : 2186

**MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN  
PHARMACIE**

-

**LE DÉVELOPPEMENT DE NOUVELLES MÉTHODES  
ANALYTIQUES RAPIDES**

Présenté par : LACORE Cécile

Soutenu le 16/01/2023 devant le jury constitué de

Pr. Eric Marchioni, Directeur de thèse et Président du jury

Mme. Ludivine Valois, membre du jury

Dr. Mélanie Senn, membre extérieur du jury

Dr. Maéva Bulber, membre extérieur du jury

Approuvé par le doyen et par le Président de l'Université de  
Strasbourg



Septembre 2022

**Doyen :** Jean-Pierre GIES

**Directeurs-adjoints :** Esther KELLENBERGER (enseignant)

Émilie SICK (enseignant)

Pauline SOULAS-SPAUEL (hôpital/recherche)

**Étudiant :** Gauthier MARCOT

## LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT-CHERCHEUR

### Professeurs :

Philippe	AMBIÉ	Bactériologie
Philippe	BOUCHER	Physiologie
Loïc	BUCHÉ	Chimie thérapeutique
Pascal	DEBIB	Biophotonique
Sébastien	ENNAHAN	Chimie analytique
Philippe	LEBIAU	Bactériologie, Virologie
Jean-Marc	GREY	Pharmacologie moléculaire
Esther	HEILBRUNN	Bio-informatique
Maline	LEHMANN	Biologie cellulaire
YJC	MADRIGNÉ	Chimie analytique
François	REGERON	Droit et économie pharm.
Yves	RELLÉ	Physique et Biophysique
Jean-Yves	RADSI	Droit économique pharm.
François	POHL	Toxicologie
Valérie	SCHEWENBERG	Pharmacologie
Florence	TOTI	Pharmacologie
Thierry	VANGANHE	Biocatalyse
Catherine	VONTROUX	Pharmacogénétique
Rémi	WEHLE	Pharmacie galénique

### Professeurs-praticiens hospitaliers

Jean-Marc	LESINGES	Biochimie
Stéphane	MICHA	Pharmacio-économie
Pauline	SOUAS-SPAUEL	Immunologie
Séverine	DELAUD-SEQUIER	Pharmacologie
<b>MARY</b>		
Mathieu	FORBET	Pharmacie d'effluents
Philippe	GALAS	Droit et économie pharm.
Philippe	NARDE	Industrie pharmaceutique
Caroline	WELTEU - WEHLE	Pharmacie d'officine

### Maîtres de Conférences :

Nicolas	ANTON	Pharmacie biogénétique
Mathieu	BORGALTYZÉ	Chimie analytique
Nathalie	BON-ARDET	Parasitologie
Aurélien	BREBESSE	Pharmacocinétique
Emmanuel	BOUTANT	Virologie et Microbiologie
Véronique	BREMAN	Physiologie et physiopath.
Arnaud	CACOT	Toxicologie
Thierry	ESMAYRIS	Pharmacologie
Manuela	CHIFFI	Pharmacie biogénétique
Guillaume	CHIFFI	Pharmacie galénique
Marcelle	DESJOURS	Pharmacochimie
Serge	DUBOIS	Biologie cellulaire
Esther	GEFFROY	Microbiologie
Grégoire	HAAS-BOCHPOFF	Maladies infectieuses
Mathieu	HEURTAT	Pharmacie galénique
Christine	JACQUARD	Chémoinformatique
Julie	KARIMAO	Pharmacochimie
Christine	MACEBINE	Chimie physique
Bachet	MATZ-WEISSNAE	Pharmacologie
Cherifa	MEDALI	Chimie
Nathalie	NICHERCEFF	Pharmacologie
Serge	OTTE-AGORIC	Pharmacocinétique
Sylvie	PERDREY	Parasitologie
Romain	PERTECH	Chimie in fine
Fabrice	PREYBIA	Biotechniques
Patrice	RASSAN	Microbiologie
Émile	RELI	Biologie
Andreas	REICH	Biophysique
Ludovic	RIFFAUD-VALOIS	Analyse des médicaments
Carole	ROUSSEAU	Toxicologie
Esther	SICK	Pharmacologie
Maria-Victoria	SPANDELLI	Chimie thérapeutique
Arlette	TEDDARD	Physiopathologie
Nassera	YOUNG	Chimie physique
Aurélien	URBAIN	Pharmacocinétique
Bruno	VAN DERCOOP	Physiologie
Maria	ZENONI	Chémoinformatique

### Maîtres de conférences - praticiens hospitaliers

Julie	BRENET	Parasitologie
Isabelle	ETIENNE-SICRIN	Pharmacologie - pharm. clinique
Julien	GOUCÉ	Biophysique - Biostatistiques

### Assistants hospitaliers universitaires

Dominic	RETA	Biologie
---------	------	----------



## SERMENT DE GALIEN

**JE JURE,**

en présence des Maîtres de la Faculté,  
des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens  
et de mes condisciples :

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, dans l'intérêt de la santé publique,  
ma profession avec conscience et de respecter non  
seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles  
de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne dévoiler à personne les secrets  
qui m'auront été confiés et dont j'aurai eu  
connaissance dans la pratique de mon art.

Si j'observe scrupuleusement ce serment,  
que je sois moi-même honoré  
et estimé de mes confrères  
et de mes patients.



# Remerciements

J'adresse un grand merci à toutes les personnes m'ayant soutenue et guidée durant ma thèse d'exercice.

Et en particulier je remercie :

- Les personnes travaillant à la faculté de pharmacie de Strasbourg
- Les personnes ayant accepté de faire partie de mon jury
- Mes parents et mes proches pour leurs soutiens tout au long de mes études

Enfin, je remercie tout spécialement Eric MARCHIONI de m'avoir encadrée avec attention et bienveillance tout au long de ma thèse.

## **Table des matières**

<b>Introduction.....</b>	<b>7</b>
<b>I. Pourquoi développe-t-on de nouvelles méthodes analytiques rapides ?.....</b>	<b>7</b>
<b>II. Quels sont les domaines concernés par la recherche de nouvelles méthodes rapides ? .....</b>	<b>8</b>
1) Dans le domaine de l'agroalimentaire.....	8
2) Dans le domaine de la microbiologie .....	12
3) Dans le domaine pharmaceutique et hospitalier .....	21
a. Le développement analytique dans le domaine pharmaceutique .....	21
b. Le développement analytique dans le domaine hospitalier.....	23
<b>III. Les étapes de développement d'une nouvelle méthode analytique rapide .....</b>	<b>28</b>
1) Étape de recherche bibliographique.....	28
2) Étape de choix de la méthode analytique .....	29
3) Étape de l'étude de faisabilité .....	29
4) Développement et mise au point de la méthode d'analyse .....	30
5) Optimisation analytique .....	31
<b>IV. Les étapes de la validation de méthode en respectant les normes en vigueur.....</b>	<b>31</b>
1) Rédaction du protocole de validation.....	31
2) Évaluation des critères de validation selon les normes en vigueur.....	31
a. Évaluation de la linéarité de la méthode.....	31
b. Évaluation de la fidélité de la méthode (répétabilité, reproductibilité et fidélité intermédiaire) .....	32
c. Évaluation de l'exactitude de la méthode.....	34
d. Évaluation de la sélectivité et de la spécificité.....	35
e. Évaluation de la limite ou seuil de détection et de quantification.....	36
f. Évaluation du domaine d'utilisation.....	38
g. Évaluation de la robustesse .....	38
3) Validation des méthodes d'analyses grâce au profil d'exactitude.....	39
4) Rédaction du rapport de validation et évaluation des résultats obtenus .....	40
<b>V. Conclusion .....</b>	<b>41</b>
<b>VI. Annexes.....</b>	<b>42</b>
<b>VII. Bibliographie .....</b>	<b>43</b>

## **Abréviations**

### **A**

ACN : Acétonitrile

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFNOR : Association Française de  
Normalisation

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSES : Agence Nationale de Sécurité  
Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement  
et du travail

### **C**

CE : Certification Européenne

CEE : Communauté Économique Européenne

### **E**

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent  
Assay

ESI : ElectroSpray Ionisation

### **F**

FAME : Fatty Acid Methyl Ester

FTIR : Fourier-Transform Infrared  
spectroscopy

### **G**

GC : Gas Chromatography

### **H**

HPLC : High Performance Liquid  
Chromatography

### **I**

ICH : International Conference on  
Harmonization of Technical Requirements for

the Registration of Pharmaceuticals for Human  
Use

ISO : International Standardization  
Organization

### **L**

LAL : Limulus Amoebocyte Lysate

LMR : Limite Maximale de Résidus

### **M**

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser  
Desorption Ionization-Time of Flight

### **N**

NHC : Nouvel Hôpital Civil

### **P**

PCR : Polymerase Chain Reaction

### **S**

SARS-CoV 2 : Severe Acute Respiratory  
Syndrome Coronavirus 2

SFSTP : Société Française des Sciences et  
Techniques Pharmaceutiques

### **T**

TTD : Time To Detection

### **U**

UFC : Unité Formant Colonie

UV : Ultra-Violet

## **Listes des figures et tableaux**

Figure N°1 : Représentation schématique d'un test immunochromatographique .....	21
Figure N°2 : Représentation schématique d'un test à immunodétection magnétique .....	23
Figure N°3 : Graphique d'un profil d'exactitude issu d'un cours de métrologie .....	40
Tableau N°1 : Paramètres opératoires testés pour l'évaluation de la robustesse d'une méthode analytique selon le champ d'application.....	38

## **Introduction**

Le développement de nouvelles méthodes analytiques rapides est un domaine en constante évolution qui intéresse différents secteurs. L'objectif de ce travail est, tout d'abord, de mettre en avant l'intérêt du développement de nouvelles méthodes analytiques rapides ; puis, de présenter les domaines qui s'y intéressent. Enfin, nous détaillerons les différentes étapes constituant le développement et la validation d'une nouvelle méthode analytique.

### **I. Pourquoi développe-t-on de nouvelles méthodes analytiques rapides ?**

Le développement de nouvelles méthodes rapides est au cœur de la recherche et de l'amélioration continue. Les laboratoires et les entreprises ne se contentent plus de faire des analyses avec les méthodes qu'ils ont à leur disposition mais essaient, dans la mesure du possible, d'innover en mettant au point des méthodes analytiques plus rapides.

La recherche de nouvelles méthodes porte en partie sur des méthodes rapides pour différentes raisons :

Tout d'abord, car les entreprises et les laboratoires suivent de près les évolutions techniques et technologiques. En effet, elles cherchent à innover et à être au cœur des évolutions scientifiques. De nos jours, des appareils analytiques de plus en plus performants et rapides apparaissent sur le marché et intéressent grandement les entreprises. Ces évolutions leur permettent d'obtenir des résultats rapides et de qualité qui leur permettent de garder leur renommée, leur crédibilité et leur réputation auprès de leurs clients et patients. En effet, une entreprise qui ne suit pas les évolutions concernant ses méthodes et qui n'innove pas laissera à la concurrence l'opportunité de se démarquer et récupérer le marché lui appartenant.

Ensuite, pour une question de coût. En effet, le développement d'une méthode rapide permet de réaliser un plus grand nombre d'analyses en moins de temps. Par conséquent, cela permet d'améliorer le contrôle et donc la qualité et la sécurité des médicaments. Cela permet également de réduire les coûts de la main d'œuvre, de matière (par exemple les solvants utilisés pour des phases mobiles) et d'amortir plus rapidement les équipements. Cependant, le développement de méthode génère également un coût qu'il est important de prendre en compte. Il s'agit donc d'un challenge pour les entreprises de réussir à avoir un retour sur leurs investissements concernant les développements de méthodes. Les méthodes peuvent être développées à partir d'anciens équipements mais avec de nouvelles méthodes analytiques mais il peut s'agir également de méthodes analytiques existantes transposées sur de nouveaux équipements ou encore de nouvelles méthodes sur de nouveaux équipements.



Le développement de nouvelles méthodes rapides a donc plusieurs intérêts et intéresse par conséquent plusieurs domaines.

## **II. Quels sont les domaines concernés par la recherche de nouvelles méthodes rapides ?**

Il existe de nombreux domaines concernés par le développement de méthodes rapides par exemple :

### **1) Dans le domaine de l'agroalimentaire**

Dans l'agroalimentaire on utilise des méthodes analytiques utilisant différentes techniques afin d'analyser différents composés. Nous développerons les exemples des résidus de pesticides et de médicaments vétérinaires.

#### Le dépistage des résidus des pesticides dans les aliments

Les Agences Régionales de Santé définissent les pesticides (produits phytopharmaceutique et biocides) comme étant des substances chimiques telles que :

- Les herbicides (substances actives ayant la propriété de tuer des végétaux)
- Les insecticides (substances chimiques ayant comme fonction de tuer les insectes ou leur progéniture)
- Les fongicides (produits phytosanitaires qui ont pour fonction de tuer ou limiter le développement des champignons parasites des végétaux)

Ceux-ci sont utilisées pour la protection des cultures contre les maladies, les insectes ravageurs ou les "mauvaises herbes" [1].

Une réglementation stricte sur ces pesticides est en place dans de nombreux pays. En ce qui concerne les pays européens les normes ISO, AFNOR et la directive de la commission européenne sont applicables.

Une limite maximale en résidu y est décrite pour chaque type de pesticide en fonction de la matrice.

Il existe 2 principales normes pour les aliments d'origine végétale concernant les méthodes d'analyses employées pour les pesticides :

- NF EN 12393 de décembre 2013 : méthode multirésidus de détermination de résidus de pesticides organohalogénés, organophosphorés et organoazotés par chromatographie en phase gazeuse ou chromatographie liquide couplées à la spectrométrie de masse en tandem. Son avantage est d'avoir le choix entre plusieurs protocoles d'extraction, purification et de concentration des extraits [2].
- NF EN 15662 de mai 2018 : méthode polyvalente de détermination des résidus des pesticides se trouvant dans des aliments d'origine végétale par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de

masse en tandem après extraction/partition avec de l'acétonitrile et purification par SPE dispersive. Il s'agit d'une méthode qui a l'avantage d'être rapide, peu chère, robuste et exacte [3].

Les méthodes d'analyses décrites dans ces normes sont similaires. Cependant, celle décrite dans la NF EN 15662, bien qu'utilisant moins de solvant, ne permet pas d'analyser les résidus de pesticides organohalogénés, organophosphorés et organoazotés pour lesquels il est nécessaire d'utiliser les méthodes décrites dans la NF EN 12393.

La limite de quantification (terme défini dans la partie IV. 2) e)) doit être inférieure au seuil réglementaire ou à la limite maximale en résidus.

Avant l'étape d'extraction il est important de respecter des points clefs tels que l'identification de la nature de l'échantillon, la quantité de prélèvements à analyser reçue (pour évaluer la représentativité du lot), l'intégrité de l'échantillon, l'homogénéité du broyat et la quantité broyée avant l'étape d'extraction. Le choix du solvant est très important car il doit permettre d'extraire un maximum d'analyte avec un minimum d'impuretés.

Il faut savoir que la technique d'analyse chromatographique est la technique majeure utilisée pour l'analyse des pesticides. Il existe des méthodes d'analyse multi-résidus ainsi que mono-résidus pour identifier les pesticides contenus dans un échantillon. Ces méthodes permettent également de quantifier des molécules présentes dans l'échantillon.

Enfin, il est possible de développer des méthodes d'analyses chromatographiques permettant de réaliser des analyses rapides grâce à l'optimisation des conditions d'analyses.

### Le dépistage de résidus de pesticides dans l'eau destinée à la consommation humaine

L'ANSES porte aussi bien une attention particulière aux pesticides qu'à leurs métabolites qui pourraient avoir un impact sur des enjeux sanitaires associés à la consommation de l'eau. L'eau est l'élément le plus contrôlé en France [4] [5]. Les prélèvements et analyses sont réalisés par des laboratoires agréés pour effectuer le contrôle sanitaire de l'eau [6].

La présence des pesticides dans l'eau potable est encadrée par la directive européenne 98/83/CE [7]. Il y a par conséquent un suivi permanent de la qualité sanitaire de l'eau de consommation. Cette directive fixe des limites maximales de résidus pour les pesticides et leurs métabolites : 0,1 µg/L pour la plupart des substances en ce qui concerne le dosage individuel et 0,5 µg/L pour la somme de ces substances chimiques. Leur liste exhaustive se trouve dans la partie B de la Directive 98/83/CE.

Les limites maximales de résidus de pesticides autorisées dans l'eau sont de plus en plus faibles. Ces valeurs varient en fonction de la toxicité du composé chimique. Par exemple, en ce qui concerne l'aldrine, la dieldrine, l'heptachlore et l'heptachlorépoxyde, la limite maximale est 0,030 µg/l. C'est pour

cette raison qu'il est nécessaire de développer de nouvelles techniques performantes permettant leur quantification et identification, même à des concentrations très faibles.

Une méthode d'identification des pesticides dans des échantillons d'eau par extraction en phase solide et chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse en tandem a été développé au cours d'une étude visant à identifier et quantifier les pesticides présents dans l'eau potable au Brésil. Cette méthode permet un meilleur suivi de la qualité de l'eau [8]. L'analyse des échantillons par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem s'avère bien adaptée aux propriétés physicochimiques de la majorité des pesticides actuellement recherchés. L'utilisation d'une extraction en phase solide permet de concentrer l'échantillon et de s'affranchir de l'utilisation d'un étalon interne. L'échantillon sera ensuite analysé par chromatographie en phase liquide puis il sera détecté, identifié et quantifié par spectrométrie de masse en tandem. Afin d'optimiser les conditions de détection par spectrométrie de masse il est important de bien choisir la source d'ionisation. La source ESI est la source d'ionisation qui a été choisie lors de cette étude. Il faut également s'assurer d'avoir une séparation chromatographique correcte en un temps raisonnable. La phase mobile joue un rôle prépondérant dans cette séparation et l'on peut donc faire varier la proportion de phase organique et d'acide au sein de la phase mobile afin d'obtenir le meilleur résultat possible. Cette méthode présente de nombreux avantages tels qu'une amélioration du rapport signal sur bruit par rapport à l'analyse par chromatographie liquide simple ainsi que des limites de détection et de quantification plus basses que celles que l'on peut avoir par analyse chromatographique liquide sans couplage à la spectrométrie de masse en tandem.

Des méthodes analytiques sont également développées pour le dépistage de résidus de médicaments vétérinaires.

#### Le dépistage de résidus de médicaments vétérinaires

En ce qui concerne le dépistage de résidus de médicaments vétérinaires il existe plusieurs méthodes utilisées. Si l'on prend comme exemple le dispositif de surveillance des résidus de médicaments vétérinaires dans les volailles et les œufs, l'ANSES a présenté un article avec le bilan des résultats des plans de contrôles français pour diverses molécules présentes dans les muscles de la volaille et les œufs [9]. Les méthodes analytiques employées sont des méthodes immunologiques innovantes utilisant les biopuces.

Les biopuces consistent à fixer une biomolécule (brin d'ADN, protéine, sucre ou cellule) sur une puce. Quand celle-ci rencontrera son complémentaire marqué il sera possible d'observer l'émission de fluorescence qui sera ensuite captée par un scanner et analysée grâce à un logiciel approprié. Par ce procédé la réaction biologique est transformée en signal électronique interprétable. L'utilisation des biopuces est devenu un outil d'analyse multiplexé d'interactions entre une sonde et une cible marquée et extraite des systèmes biologiques. Les sondes sont positionnées précisément à l'aide de méthodes

mécaniques ou elles sont synthétisées directement à la surface du support de la puce. Les biopuces peuvent notamment servir à vérifier la qualité des aliments en temps réel. En effet, la Commission Européenne a aidé au financement d'un projet réalisé grâce à la collaboration d'un développeur/producteur de biocapteur (puce) (Plasmore), un synthétiseur de peptides (Schafer-N) et un institut de contrôle de la sécurité alimentaire développant et produisant des anticorps contre les contaminants alimentaires (RIKILT) qui a abouti à des résultats innovants uniques pour la détection des contaminants alimentaires. Ils ont développé un appareil portable et flexible permettant de réduire le temps des contrôles. Cet appareil, à faible coût détecte et identifie de nombreux contaminants présents sur un échantillon en moins de 15 minutes. Il utilise pour cela une biopuce couplée à un dispositif de lecture électronique qui analyse et évalue les résultats. L'utilisation de cet appareil dans le secteur agro-alimentaire réduira le temps de contrôle et permettrait de garantir la qualité des aliments [10].

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem peut également être employée et est utilisée de plus en plus pour le dépistage de résidus de médicaments vétérinaires. Le laboratoire GIP CYROI a fait partie d'un projet de recherche destiné à développer une méthode innovante de dépistage multirésidus d'antibiotiques dans les produits d'origine animale. Cette méthode consiste à analyser par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem les sérums animaux (porc, volaille, ovin, bovin, caprin). En effet, il est possible de retrouver des résidus d'antibiotiques lorsqu'il y a un non-respect du temps de latence entre l'administration des antibiotiques à l'animal, l'abattage de celui-ci et la collecte de la viande. La présence de ces substances peut présenter un danger pour le consommateur [11]. Ainsi, la législation européenne a mis en place la directive 96/23/CE [12] concernant le contrôle des résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées alimentaires. Celle-ci impose aux États Membres de mettre en œuvre des plans de contrôle des dépistages des produits médicamenteux et de leurs résidus chez les animaux et les denrées alimentaires d'origine animale. De plus, le règlement CEE n°2377/90 établit des LMR pouvant se trouver dans les denrées alimentaires d'origine animale [13].

Afin de répondre à ces exigences réglementaires les laboratoires de contrôle cherchent à développer et valider de nouvelles méthodes analytiques qui s'appuient sur des nouvelles technologies permettant à la fois d'identifier et de quantifier les résidus d'antibiotiques et autres substances pharmacologiquement actives, aux limites maximales de résidus.

### Le contrôle qualité des produits alimentaires

Depuis une trentaine d'année, le domaine de l'agroalimentaire utilise des méthodes rapides notamment pour les contrôles microbiologiques. Ce n'est que plus récemment que les services de Contrôle Qualité microbiologiques dans le domaine de l'industrie pharmaceutique s'y intéressent afin d'avoir des alternatives aux méthodes utilisées traditionnellement.

## 2) Dans le domaine de la microbiologie

Les laboratoires de Contrôle Qualité microbiologique des industries pharmaceutiques, réalisent leurs contrôles des produits finis et de l'environnement à l'aide des réglementations et normes en vigueur. En ce qui concerne les laboratoires européens ils sont soumis aux requis de la Pharmacopée Européenne qui décrit les « Contrôles microbiologique des produits non stériles : essais de dénombrement microbien » [14], « Contrôles microbiologiques des produits cellulaires » [15] et « Essai des endotoxines bactériennes » [16] dans les chapitres 2.6.12, 2.6.13 et 2.6.14 respectivement. Ces méthodes dites « traditionnelles » ont fait leurs preuves depuis de nombreuses années. Elles ont l'avantage de ne pas avoir besoin d'être validées avant de les utiliser en routine puisque toutes les méthodes décrites dans la Pharmacopée Européenne ont déjà été validées. Elles se basent sur les méthodes phénotypiques basées sur le métabolisme des bactéries. Cependant, ces méthodes possèdent des limites. En effet, elles nécessitent des temps de mise en culture pouvant aller jusqu'à 18 jours, dans le cas de l'essai de stérilité, ce qui allonge considérablement la durée totale de l'analyse et il existe des microorganismes viables mais non cultivable qui ne sont pas détectable par ces méthodes conventionnelles.

Bien que les Pharmacopées continuent de recommander les méthodes « traditionnelles », les services de Contrôle Qualité microbiologiques se tournent vers des méthodes dites « alternatives » plus récentes, définies par l'AFNOR dans la norme ISO 16140 comme : « une méthode d'analyse qui permet de déterminer ou d'estimer pour une catégorie de produits donnée, le même analyte que celui mesuré avec la méthode de référence correspondante. Elle se caractérise par des propriétés adaptées aux besoins de l'utilisateur (...) » [17].

Ou encore définies dans la Pharmacopée Européenne au chapitre 5.6.1 « Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique » comme étant « (...) capables de livrer des résultats en temps réel (ou quasi réel), ouvrant la possibilité d'une action corrective plus précoce. Ces nouvelles méthodes, si elles sont validées et adaptées à une utilisation en routine, peuvent également apporter une amélioration significative de la qualité des contrôles. ».

Ces nouvelles méthodes présentent de nombreux avantages et peu d'inconvénients.

Les avantages des méthodes rapides sont :

- De réduire l'erreur humaine car moins de manipulation sont à réaliser par l'homme
- D'accroître la qualité du contrôle des produits pharmaceutiques
- De réduire le nombre de microorganismes nécessaire à l'obtention d'un résultat
- D'être plus sensibles car les appareils utilisés ont un meilleur rapport signal/bruit et une limite de détection plus basse.

- D'augmenter la productivité
- De faciliter l'exécution et l'automatisation car les interventions humaines sont réduites de par la performance des appareils.
- D'avoir une meilleure maîtrise du process de fabrication

Les inconvénients des méthodes rapides sont :

- Des investissements importants (équipement, qualification et validation)
- Une identification parfois impossible post détection car certaines méthodes sont destructives (ce qui empêche la détermination de la charge microbienne d'un produit). Par conséquent, cela nécessite de doubler le test si l'on souhaite identifier le microorganisme (coût associé à prendre en compte).

Bien évidemment l'usage des méthodes alternatives choisies doivent être validées avant leur utilisation en routine et doivent répondre aux exigences réglementaires des pharmacopées. (Pharmacopée Européenne : 5.1.6 Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique. – U.S.P. <1223> Validation of alternative microbiological methods) [18] [19].

Les méthodes de dénombrement microbien, chapitre 2.6.12 de la Pharmacopée Européenne, qui sont des méthodes « traditionnelles » se voient concurrencées par le développement et l'utilisation de nouvelles méthodes plus rapides.

### **Les méthodes de dénombrement microbien**

En ce qui concerne la méthode quantitative de dénombrement microbien, elle reste basée sur la Pharmacopée Européenne (chapitre 2.6.12). Cette méthode « traditionnelle » permet le dénombrement des bactéries mésophiles, des moisissures et des levures capables de croître en aérobiose. Elle permet également de déterminer si un produit satisfait aux spécifications préétablies en matière de qualité microbiologique. Cependant, cette méthode traditionnelle présente des limites. En effet, elle est non applicable aux produits contenant des microorganismes viables en tant qu'ingrédients actifs. Ensuite, le dénombrement s'effectue par comptage des colonies à l'œil humain ce qui prend un temps considérable. De plus, elle nécessite des durées d'incubation pouvant aller jusqu'à 7 jours pour pouvoir obtenir le résultat de l'analyse.

Au vu des limites que présente cette méthode les laboratoires se sont tournés vers des méthodes « alternatives » car les nouvelles méthodes rapides qui se développent permettent, pour la plupart, de réduire de moitié le temps de détection des microorganismes.

Une des méthodes alternatives possible pour le dénombrement microbien est l'utilisation de l'impédancemétrie. En effet, lors de la prolifération bactérienne il y a transformation des protéines et des sucres du milieu de culture en acide aminé, lactate,  $H^+$  et  $OH^-$ . Par conséquent on peut observer une augmentation de la conductivité. La valeur de la conductivité dépend de la mobilité des ions  $H^+$  et  $OH^-$ . Une mesure de la conductance (correspondant au produit de la conductivité avec le rapport entre la surface des électrodes et la distance inter-électrode) en fonction du temps de détection est réalisée. Puis on a une relation décroissante entre le logarithme de la concentration initiale et le temps de détection d'un signal électrique qui permet, par le calcul, de déterminer le nombre d'UFC/mL grâce à la relation suivante :  $\log(UFC/mL) = -a.TTD + b$ .

Cette méthode a pour avantage d'être rapide, elle met de 2 à 15 heures pour obtenir un résultat. De plus, il n'y a pas de limite de détection à proprement parler et il est possible d'analyser plusieurs échantillons en même temps grâce à l'utilisation de plusieurs sondes.

Les limites de cette technique sont que certaines bactéries, notamment les levures, produisent peu voire pas du tout de métabolites chargés. De plus, une croissance bactérienne est nécessaire lors de l'utilisation de cette méthode ce qui engendre des variabilités au niveau des résultats. En effet, il faut prendre en compte : les effets du milieu de croissance et de la température, la variabilité des vitesses de croissance des microorganismes et la variabilité du temps de détection qui peut s'avérer plus grand si les microorganismes subissent un stress ou qu'ils sont en présence d'inhibiteurs de croissance. Enfin, cette méthode se limite aux microorganismes qui ont une croissance relativement rapide donc elle ne convient pas à tous les types de microorganismes.

Une autre méthode alternative pour le dénombrement microbien est l'utilisation du dégagement gazeux par les microorganismes aérobies, telle que les levures et certaines bactéries. Un composé fluorescent va être quenché par l'oxygène qui est ajouté en excès dans un bouillon de culture. La croissance bactérienne à 37°C peut être quantifiée via la libération de  $CO_2$  et augmentation de la fluorescence. Il y a une relation entre le temps de détection de la fluorescence et les UFC/mL.

Cette méthode a des limites. En effet, l'utilisation de capteurs de gaz ne peut se réaliser lorsque l'air à analyser est trop humide car l'humidité interfère avec ces capteurs et cela donne lieu à des résultats non reproductibles. De plus, la température d'incubation et l'algorithme de traitement des signaux enregistrés influencent fortement les résultats.

Cependant, cette méthode a pour avantage d'être plus rapide que l'impédancemétrie pour les microorganismes à croissance lente. En effet, la consommation d' $O_2$  et la libération de  $CO_2$  au cours de la croissance bactérienne est détectable plus tôt que la transformation des protéines et des sucres du milieu de culture en acide aminé, lactate,  $H^+$  et  $OH^-$ .

Enfin, la cytométrie en flux est encore une autre méthode alternative rapide permettant de dénombrer les bactéries. Cette technique consiste en une analyse multiparamétrique des propriétés optiques de cellules individuelles dans un système fluide. Des cellules telles que les bactéries en suspension sont individuellement réparties en un flux linéaire qui s'écoule à travers un dispositif de détection [20]. Cette méthode représente un atout dans le domaine du dénombrement microbien par son délai de résultat court (environ 1 heure). Elle a de nombreux avantages. En effet, elle permet d'analyser un grand nombre de cellules en peu de temps, elle permet une analyse multiparamétrique à l'échelle individuelle et elle fournit des données quantitatives mesurées en temps réel. La mesure en temps réel est possible puisque l'équipement est relié à un ordinateur muni d'un logiciel qui permet l'affichage des données au fur et à mesure qu'elles sont détectées.

La cytométrie en phase solide peut également être utilisée pour le dénombrement rapide des bactéries. Le cytomètre à balayage laser ChemScan RDI est un équipement qui utilise la cytométrie pour quantifier le nombre de micro-organismes viables présents dans un échantillon [21] [22] [23]. Il ne nécessite pas de phase de croissance bactérienne et permet la détection de 1 à  $10^6$  microorganismes. Il a plusieurs applications et peut aussi bien être utilisé pour le contrôle microbiologique de l'environnement que pour l'analyse microbiologique des produits finis. Le résultat est obtenu en 3 heures. Seules 3 étapes sont nécessaires pour réaliser une analyse. La 1<sup>ère</sup> étape consiste à filtrer l'échantillon que l'on souhaite analyser sur une membrane de polyester de 0,45  $\mu\text{m}$ . La 2<sup>ème</sup> étape consiste à marquer les cellules avec un substrat fluorescent. La 3<sup>ème</sup> et dernière étape consiste à placer la membrane dans le cytomètre afin que le filtre soit balayé à haute vitesse par un laser argon. L'équipement va ensuite détecter les cellules fluorescentes grâce à plusieurs tubes photomultiplicateurs, traités pour différencier les micro-organismes marqués et le bruit de fond. Le balayage est affiché sous forme de carte qui identifie la position des événements fluorescents qui sont vérifiés à l'aide d'un microscope à épifluorescence avec une platine motorisée automatisée pour localiser les événements individuels.

La limite de cette méthode analytique et de cet appareil est qu'il n'est utilisable que pour l'analyse de produits filtrables.

En somme, la mise en place de méthodes rapides dans les laboratoires de contrôles microbiologiques en ce qui concerne le dénombrement microbien est de plus en plus répandue car elle présente plus d'avantages que d'inconvénients.

Les méthodes de dénombrement microbien ne sont pas les seules à évoluer vers des méthodes plus rapides que les méthodes traditionnelles, il y a également des innovations dans le domaine des tests de recherche des endotoxines bactériennes.



## **Le test de recherche des endotoxines bactériennes**

La méthode habituellement suivie par les laboratoires est celle de la Pharmacopée Européenne (chapitre 2.6.14).

Le test décrit dans la pharmacopée est destiné à la détection ou la quantification des endotoxines produites par des bactéries gram-négatives, au moyen d'un lysat d'amœbocyte de *Limule*. Trois techniques sont décrites : gélification, turbidimétrie et colorimétrie.

Une nouvelle variante rapide de ce test permet de gagner du temps par rapport à la version standard [24]. En effet, le test ne dure que 15 minutes au lieu de 1 heure dans le meilleur des cas. Cette nouvelle technique permet de détecter les résidus des microorganismes au moment de leur lyse. Cette nouvelle méthode remplace le test LAL communément utilisé qui a pour désavantage d'utiliser des *Limules* (une espèce protégée qu'on ne retrouve pas partout dans le monde) dont l'usage est très règlementé.

Cette méthode alternative utilise le facteur C recombinant également décrit dans la Pharmacopée Européenne au chapitre 2.6.32. Elle est basée sur la séquence génomique codant pour ce facteur chez le *limule* et met en œuvre une détection par fluorimétrie (utilisation possible du Kit Endozyme II GO commercialisé par Biomérieux®) [25].

Cette méthode possède de nombreux avantages :

- Elle possède une spécificité pour les endotoxines à 100% en évitant les faux positifs avec les  $\beta$ -glucanes
- C'est une méthode déjà validée par la Pharmacopée Européenne
- L'utilisation du facteur C recombinant permet de garantir la cohérence de lot à lot
- Cette méthode s'affranchit de l'utilisation des *limules* ce qui permet de préserver l'espèce.
- Elle permet également de ne pas dépendre des sociétés américaines ayant le monopole du marché des *limules*.
- Elle permet la détermination quantitative de l'endotoxine dans des échantillons tels que l'eau et les produits finis. Elle permet le contrôle en cours de fabrication ainsi que les tests sur les dispositifs médicaux.
- La plage de dosage est comprise entre 0,005 à 50 EU/mL alors que pour le test utilisant la *limule* la plage de dosage se situe entre 50 et 100 EU/mL.
- Le temps d'analyse n'excède pas 1 heure.

Il est possible d'utiliser les GOPLATE™ avec le kit Endozyme II GO. Ce sont des microplaques préremplies avec les courbes standards et concentrations de contrôle de produit positif. Cela permet d'avoir une alternative sujette à moins de risque d'erreur contrairement à la préparation manuelle des dilutions standards. De plus, son utilisation réduit de plus de 50 % du temps de manipulation par rapport aux tests conventionnels sur microplaques.

En somme, les méthodes de recherche des endotoxines bactériennes évoluent également vers des méthodes plus rapides, pérennes, moins contraignantes et moins coûteuses. Il en est de même pour les méthodes destinées à réaliser les essais de stérilité.

### **Les essais de stérilité**

La méthode habituellement suivie par les laboratoires est celle de la Pharmacopée Européenne (chapitre 2.6.1) [26] ou le chapitre <71> de l'USP. Cependant, cette méthode a deux désavantages majeurs. Tout d'abord, le temps d'incubation est long (14 à 18 jours). Ensuite, il y a une diminution conséquente de la durée de vie du produit. Pour les médicaments ayant une date d'expiration courte (30 jours par exemple) le test de stérilité réduit de moitié le temps d'utilisation du produit.

Eagle® a développé une alternative au test de stérilité traditionnel qui est à la fois rapide et sensible. Cette entreprise utilise le cytomètre Chem Scan RDI® pour la détection microbienne. Cet équipement, présenté dans la partie « Les méthodes de dénombrement microbien », est suffisamment sensible pour détecter un seul contaminant (bactérien, levure, spores ou moisissure) en quelques heures ce qui permet de réduire considérablement les essais de stérilité [27].

Cette méthode est approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) aux Etats-Unis mais n'est pas encore utilisée pour la commercialisation de médicaments en Europe.

### **Les méthodes d'identification**

Il existe de nombreuses méthodes permettant l'identification des bactéries. Certaines sont plus fiables que d'autres.

Les méthodes les plus anciennes sont :

- La coloration de Gram mise au point en 1884. Cette coloration permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et de distinguer et classer les bactéries Gram + (coloration violette) des bactéries Gram – (coloration rose) après observation microscopique. Le fait de colorer les bactéries permet également de différencier la morphologie des bactéries et donne une indication sur l'identité de la bactérie.

Il s'agit d'une méthode rapide cependant elle ne permet pas d'identifier de manière certaine une bactérie en donnant son espèce ou même sa sous espèce [28].

- La méthode utilisant la galerie API (Appareil et Procédé d'Identification) qui date de 1970 est composée de différentes cupules prêtes à l'emploi qui permettent de réaliser des tests biochimiques miniaturisés dans le but d'identifier des microorganismes. L'identification est rapide et fiable. Cette méthode est la méthode de référence en ce qui concerne l'identification de microorganismes. Les résultats obtenus sont ensuite comparés à des bases de données pour

permettre l'interprétation des résultats et l'identification des microorganismes. Cette méthode a pour avantage d'être simple à utiliser et à mettre en œuvre au laboratoire [29].

- La méthode analytique utilisant le GC FAMES est également utilisée depuis les années 1970, notamment dans le domaine hospitalier, pour l'identification des bactéries. La composition des acides gras que l'on retrouve dans les microorganismes est constituée de telle manière à présenter un bon degré d'homogénéité au sein des groupes taxonomiques. En effet, cette méthode consiste à cultiver l'isolat sur un milieu standard, le récolter, procéder à l'extraction des lipides, les saponifier et de transformer les acides gras libérés en esters méthyliques (FAMES) qui seront alors extraits et analysés par chromatographie en phase gazeuse. L'identification des acides gras méthylés se fait via les temps de rétention observés ainsi que par comparaison du profil avec des banques de données. Malheureusement, cette technique ne permet pas la discrimination de microorganismes étroitement apparentés et elle ne peut pas être employée pour des microorganismes non cultivables [30].
- C'est en 1977 que le séquençage de l'ADN en utilisant la méthode Sanger s'est développée. Il s'agit d'une méthode d'identification génotypique. Cette technique est fiable, précise et reproductible. Son seul défaut est d'être extrêmement onéreuse. En effet, cette technique nécessite des spécialistes aussi bien au niveau analytique qu'au niveau de la classification phylogénique. De plus, le matériel et réactifs génèrent également un coût important. Le coût des équipements s'élève à environ 570.000 euros et le coût d'une analyse par la méthode Sanger s'élève à environ 150 euros [31] [32].

Les méthodes développées plus récemment sont :

- Les analyses par FTIR (Fourier-Transform InfraRed spectroscopy) ne sont pas nouvelles mais elles ont une application plus récente en ce qui concerne les analyses rapides d'identification de microorganismes. Les spectres en moyen et proche infrarouge présentent des vibrations sélectives pour les groupes fonctionnels des biomacromolécules composant, entre autres, les microorganismes.

Pour réaliser une analyse on va, dans un premier temps, cultiver un isolat sur un milieu standard. Puis on récolte l'isolat, on le transfère sur un support (cristal en germanium ou diamant), on l'analyse par spectrométrie FTIR, on le déconvolue et enfin on compare le résultat obtenu à des spectres de référence afin d'identifier le microorganisme. Le spectre obtenu d'un microorganisme entier donne un profil identifiable et représentatif d'un groupe taxonomique. L'exactitude et la sensibilité de la mesure peut permettre d'identifier un microorganisme jusqu'au niveau de la souche.

Les avantages de cette méthode sont qu'une fois la colonie obtenue, qu'elle permet d'obtenir un résultat en quelques minutes et que la méthode est automatisable.

Les désavantages de cette méthode sont qu'elle nécessite une étape de culture, que l'interprétation des résultats est complexe et il y a besoin d'avoir recours à des méthodes bioinformatique pour les interpréter. Enfin, cette méthode ne permet pas de quantifier le nombre de bactéries présentes dans l'échantillon.

- Les méthodes d'identification utilisant la cytométrie en flux décrite dans la partie se référant au dénombrement microbien servent également à l'identification des microorganismes. En effet, la cytométrie en flux permet d'étudier de nombreux paramètres concernant les cellules analysées qui permette de les identifier. Parmi ces paramètres il y a les paramètres de diffraction et réfraction de la lumière laser qui dépendent des caractéristiques physiques de la souche analysée (taille, réfringence et granularité) [20].

- Les techniques de séquençage ont évolué depuis 1977 et le séquençage de 3<sup>ème</sup> génération présente des avantages que l'on n'avait pas à l'époque. En effet, ce séquençage ne nécessite pas d'amplification par PCR donc cela évite d'avoir les biais liés à l'amplification PCR [33].

Cette technologie de séquençage commercialisée par la société Oxford NANOPORE Technologies se base sur l'utilisation d'un nanopore composé de protéines. Ce nanopore est inséré dans une membrane résistante à l'électricité créée à partir de polymères synthétiques. Une différence de potentiel est appliquée à travers cette membrane de sorte à générer un courant circulant uniquement à travers l'ouverture au niveau du nanopore. Une seule molécule qui pénètre dans le nanopore provoque une perturbation caractéristique du courant. Le nanopore va capter un flux d'ions qui varie selon l'encombrement stérique du composé qui le traverse. Ceci permet l'identification de la séquence d'un brin l'ADN sur une grande longueur. Cette technique à l'avantage d'être rapide (résultats en quelques heures), cependant l'analyse des résultats est complexe. En effet, ces analyses génèrent un nombre important de données par secondes et elles sont diffusées dès le lancement de l'analyse. Ces données sont traitées grâce à un logiciel cependant comme on a un grand nombre de données générées par secondes, les signaux émis par les bases individuelles peuvent être brouillées par les signaux des bases voisines. La difficulté majeure est par conséquent de déchiffrer ces signaux et d'en déduire la séquence.

- La méthode analytique utilisant le MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight) est une méthode d'identification phénotypique qui permet l'obtention d'identifications de haute qualité à moindre coût. Cette méthode utilise la spectrométrie de masse qui est facile à mettre en œuvre et demande peu de temps à un technicien formé. On obtient, *in fine*, un spectre de protéines qui sera comparé à une base de données validée qu'il convient de

choisir soigneusement en fonction des besoins du laboratoire. En effet, certaines des bases commercialisées sont orientées vers le domaine clinique et sont sollicitées par les laboratoires hospitaliers et d'analyses biologiques afin d'identifier les microorganismes responsables de pathologies humaines. Les autres bases de données existantes sont plus à visée industrielle et permettent aux unités de productions pharmaceutiques de suivre de façon précise l'évolution de leur flore dans les environnements de production. Il est important de mettre à jour ces bases de données de manière régulière, afin d'y voir apparaître de nouveaux spectres de référence qui n'étaient pas disponibles sur la base de données de la version précédente, ce qui nécessite par conséquent de périodiquement revalider la base de données.

L'avantage de cette méthode rapide est qu'elle permet d'identifier les microorganismes en quelques minutes. Cette avancée en matière de temps permet d'améliorer la réactivité face à une tendance ou une investigation portant sur des microorganismes.

Ces diverses méthodes d'identification permettent de mener des investigations poussées lors d'incident en production et permettent d'approfondir le nettoyage dans les zones où des microorganismes ont été retrouvés. En effet, il est important de connaître la flore présente dans l'environnement de production surtout dans le cas de production de médicaments stériles, afin de pouvoir la maîtriser.

En somme, ces nouvelles méthodes sont une avancée dans le domaine de la microbiologie autant d'un point de vue qualité qu'au niveau de la réduction des coûts de stockage et des délais de mise sur le marché des médicaments puisqu'elles permettent le contrôle de produits pharmaceutiques avec des délais plus brefs. Elles permettent d'assurer la qualité microbiologique des médicaments commercialisés et de l'environnement dans lequel le médicament est produit. Il est également important que ces méthodes microbiologiques soient fiables car de nombreux médicaments sont libérés sur le marché grâce aux résultats obtenus lors des différents contrôles. En effet, la santé du patient dépend entre autres de la qualité du médicament qui lui est administré.

Enfin, le développement de nouvelles méthodes rapides permet d'avoir une meilleure réactivité sur le terrain en fonction des résultats obtenus. En prenant l'exemple d'analyses de résultats de prélèvements microbiologiques, le fait d'obtenir un résultat rapide permet d'avoir une meilleure réactivité en cas de contamination et donc une résolution du problème plus efficace.

Deux autres domaines sont intéressés par des méthodes analytiques plus rapides : le domaine pharmaceutique et hospitalier.

### 3) Dans le domaine pharmaceutique et hospitalier

#### a. Le développement analytique dans le domaine pharmaceutique

Le domaine pharmaceutique s'intéresse au développement de nouvelles méthodes analytiques rapides dans différents secteurs et notamment en ce qui concerne les tests qualitatifs que sont les tests antigéniques utilisés pour réaliser des diagnostics *in vitro*. Les tests antigéniques ou immunochromatographiques sont connus depuis les années 1970 pour détecter une grossesse mais ont ensuite été développés pour détecter une infection à streptocoques ou même le SARS-CoV-2.

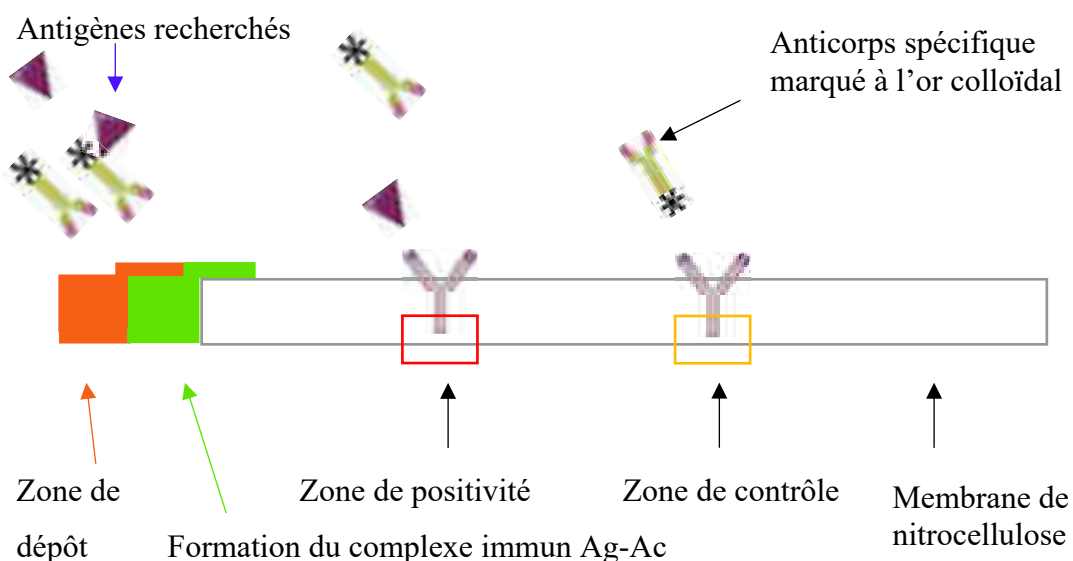
Leur mode de fonctionnement est basé sur la migration de l'échantillon déposé au niveau de la zone de dépôt à travers une membrane de nitrocellulose. Le prélèvement est mélangé avec un réactif de détection conjugué qui est constitué : d'un anticorps spécifique dirigé contre l'un des épitopes de l'antigène (qui doit être détecté) et d'un réactif de détection. Si l'échantillon contient l'antigène cible il va se lier au réactif conjugué et va former un complexe immun. Celui-ci migrera le long de la bandelette de test. Si l'échantillon ne contient pas l'antigène cible il migrera séparément du réactif conjugué.

Comme indiqué dans la figure N°1, la zone de réaction présente une ligne test et une ligne contrôle. La ligne test est réalisée le plus souvent par un dépôt d'anticorps dirigés contre la molécule d'intérêt. La ligne de contrôle, quant à elle, est constituée par des anticorps dirigés contre la molécule du réactif de détection [34].

Ces tests ont l'avantage d'être simple et rapide. Ils peuvent encore être perfectionnés notamment en ce qui concerne leurs performances (exactitude, fidélité, spécificité...).

Ces tests utilisent la propriété des particules d'or colloïdal à former un précipité coloré lorsqu'elles sont proches les unes des autres.

Figure N°1 : Représentation schématique d'un test immunochromatographique



L'inconvénient majeur de ces tests immunochromatographiques est leur manque de sensibilité analytique par rapport aux méthodes séparatives réalisées en laboratoire. En effet, les résultats faux positifs et faux négatifs sont bien plus fréquents par rapport aux autres méthodes analytiques utilisées dans les laboratoires.

Ainsi des chercheurs ont essayé de développer de nouvelles techniques utilisant notamment des nanoparticules [35].

#### Exemple des tests sérologiques invasifs nécessitant une prise de sang pour détecter le COVID-19 [36]

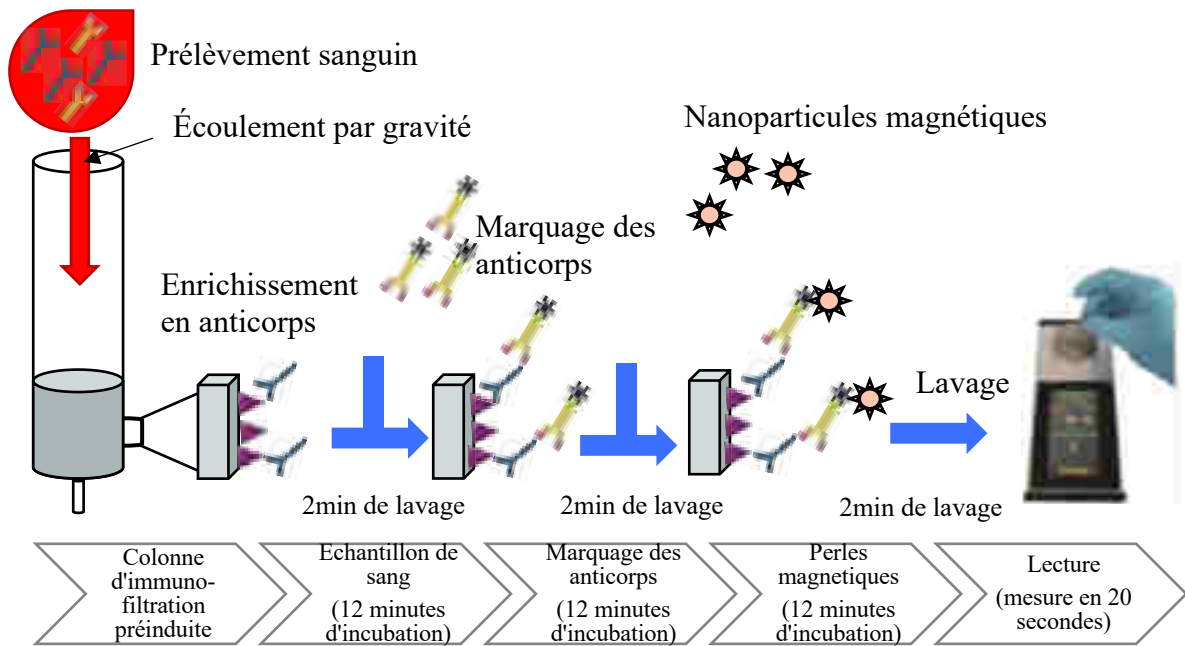
Actuellement le système utilisé n'est pas suffisamment sensible ou spécifique et ne permet pas le dosage des anticorps dirigés contre le SARS-CoV-2. De plus, le point faible des tests sérologiques disponibles est l'antigène utilisé dans le test. L'antigène le plus efficace est la glycoprotéine spike. Celle-ci est ciblée par les anticorps neutralisants et est essentielle pour l'entrée du virus dans la cellule hôte. La glycoprotéine spike a une sous unité S1 qui est la plus recommandée pour détecter spécifiquement une réponse immunitaire liée au SARS-CoV-2. Cependant, aucun test utilisant cet antigène n'est actuellement disponible.

Des chercheurs travaillent sur une alternative qui utiliserait l'immunodétection magnétique comme représenté dans la figure N°2. Il s'agit d'une méthode basée sur l'immunofiltration où l'on utilise une matrice recouverte d'antigènes pour piéger des anticorps spécifiques dans l'échantillon appliqué à la matrice par écoulement gravitaire. La détection des anticorps est réalisée grâce à des anticorps secondaires.

Puis l'on ajoute des nanoparticules magnétiques spécialement conçues pour étiqueter les anticorps secondaires. Enfin, on procède à la lecture magnétique que l'on obtient grâce à un appareil portable qui utilise la technologie de détection de mélange magnétique en fréquence.

Cette technologie permet d'exposer l'échantillon à un champ d'excitation magnétique composé de deux fréquences distinctes. L'une des fréquences correspond à un champ magnétique fort (kHz) et l'autre est une fréquence plus faible (Hz). Ces fréquences permettent d'obtenir un balayage par des oscillations de la surface analysée. Les signaux obtenus correspondent à la quantité d'anticorps liés dans l'échantillon que l'on analyse.

Figure N°2 : Représentation schématique d'un test à immunodétection magnétique



Temps de détection de 42 minutes

Le développement de cette nouvelle méthode à la fois rapide et sensible est une avancée majeure dans le domaine de l'immunochromatographie. Cependant, cette méthode peut encore être optimisée notamment afin de réduire le temps d'analyse. Il serait possible, par exemple, de diminuer le temps d'incubation en utilisant des nanoparticules magnétiques auxquels des anticorps spécifiques à l'antigène sont déjà liés. Cela éliminerait le besoin d'incubation avec des anticorps secondaires et l'on réussirait à atteindre une durée totale de test de 20 minutes. Enfin, si l'on optimisait le lecteur magnétique en instrument permettant d'effectuer des diagnostics médicaux cela rendrait le test adapté à plusieurs applications notamment les diagnostics dans les cabinets médicaux au vu du faible coût engendré comparé aux tests ELISA.

Le domaine pharmaceutique n'est pas le seul à s'intéresser au développement de nouvelles méthodes analytiques rapides. En effet, les laboratoires d'analyse hospitaliers s'intéressent également au développement de nouvelles méthodes analytiques rapides.

### **b. Le développement analytique dans le domaine hospitalier**

Les hôpitaux possèdent des laboratoires de contrôle et des laboratoires d'analyses biologiques qui utilisent des méthodes analytiques qui peuvent être optimisées. Ces laboratoires présentent également une activité de recherche et développement afin de mettre au point et valider de nouvelles méthodes de dosages. Nous nous focaliserons ici sur le laboratoire de contrôle des préparations réalisées au Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg (NHC).



Toutes les préparations (magistrales à risque, de série et hospitalières) produites au NHC dans le secteur préparatoire de la pharmacie hospitalière sont contrôlées au laboratoire dont c'est l'activité principale. Les analyses sont réalisées soit par spectrophotométrie UV couplée à une spectrométrie Raman grâce à un automate QCPrep® qui analyse les spectres en UV-Raman des solutions, soit par HPLC couplée à détecteur UV-visible à barrettes de diodes.

Après avoir été déclarés conformes, les résultats d'analyses sont vérifiés et validés par le pharmacien responsable qui libère le lot s'il est conforme. Les lots sont enregistrés et un échantillon de celui-ci est conservé dans l'échantillonnage.

Dans la mesure où les lots sont préparés en fonction des besoins il n'y a pas un grand stock en avance de médicament. Il faut donc réaliser les analyses libératoires en fonction du flux des préparations. Plus la durée totale d'analyse est courte plus vite le lot pourra être libéré et plus tôt le patient pourra recevoir son traitement.

#### Exemple de recherche d'un développement d'une méthode rapide de dosage par HPLC d'un mélange morphine/ropivacaïne utilisé pour des injections intrathécales au NHC de Strasbourg

Lors de mon stage hospitalier il m'a été donné comme mission principale de développer une méthode rapide de dosage par HPLC d'un mélange morphine/ropivacaïne utilisé pour des injections intrathécales et dont le contrôle qualité n'était assuré jusqu'à présent que par un double contrôle lors de la réalisation de la préparation hospitalière. Ces préparations ne sont pas réalisées en série mais devraient l'être en devenir. Cependant, afin de remplacer le double contrôle, il est nécessaire d'avoir une méthode analytique validée qui permettent d'analyser les lots produits avant libération et administration au patient.

La morphine et la ropivacaïne sont des puissants analgésiques et anesthésiants qui peuvent être utilisés pour de la rachianesthésie [37] [38].

La morphine est classée « stupéfiant », elle agit sur le système nerveux central, elle est dotée d'une action analgésique dose-dépendante. Elle est utilisée pour soulager les douleurs intenses lorsque les médicaments de palier 2 ne suffisent plus. Le préparatoire du secteur pharmacotechnie du NHC prépare déjà des gels de morphine formulés en seringues qui sont contrôlées en routine par le laboratoire de contrôle, et qui sont destinées à traiter les mucites. Dans notre étude, il s'agit de doser une solution de morphine contenue dans une seringue pour des injections intrathécales (injection sous méningée) [39].

Concernant la ropivacaïne, sa propriété la plus caractéristique est sa longue durée d'action ; il s'agit d'un anesthésique local de type amide. Le délai d'installation et la durée d'efficacité de l'anesthésie sont dépendants du site d'administration mais ne sont pas influencés par la présence d'un vasoconstricteur. Elle est utilisée pour soulager les douleurs intenses, en anesthésie et rachianesthésie [40].

L'association morphine/ropivacaïne (antidouleur de palier 2 et antidouleur de palier 3) dans une seringue pour injection intrathécale permettrait de diminuer la concentration de la morphine (antidouleur de palier 3) et donc de diminuer ses effets indésirables (dépression respiratoire, constipation, risque d'accoutumance à forte dose...).

L'objectif de ce travail était de mettre au point une méthode de dosage par HPLC-UV du mélange morphine/ropivacaïne dont le temps maximal de la durée d'analyse est de 10 min par échantillon. Pour cela, nous allons adapter la méthode de dosage de la morphine validée pour le contrôle des gels de morphine dans du purillon en s'inspirant de méthodes de dosage de la ropivacaïne décrites dans la littérature scientifique. C'est-à-dire mettre au point une méthode de dosage compatible entre les conditions chromatographiques développées pour la morphine et les méthodes existantes de la ropivacaïne dans la littérature scientifique.

Le matériel à disposition était le suivant :

Pour réaliser le dosage HPLC, nous disposons de :

- Chlorhydrate de morphine : 1 ampoule de 1 mL à 10 mg/mL
- Chlorhydrate de ropivacaïne : 1 ampoule de 20 mL à 10 mg/mL

La chaîne HPLC utilisée au laboratoire de contrôle est composée :

- Injecteur automatique : Shimadzu SIL-20AC
- Dégazeur : Shimadzu DGU-20A
- Gestionnaire du solvant binaire : Shimadzu LC-20AD
- Détecteur à barrette de diodes : SPD-M20A
- Four à colonne : Shimadzu CTO-10AS
- Module de communication : Shimadzu CBM-20
- Logiciel d'acquisition : LabSolution 5.85

En ce qui concerne les méthodes utilisées :

Lors de la partie de recherche et développement de la méthode il a d'abord été question de tester sur le mélange morphine et ropivacaïne la méthode existante et validée pour l'analyse de la morphine dans les gels.

Pour cela, nous avons utilisé les conditions chromatographiques suivantes :

- Colonne INERTSIL-ODS-2 ; 4,6 x 250 mm ; 5 µm ; précolonne LichroCart 4-4 Licrospher 100 RP-18 (5 µm)
- Longueur d'onde 230 nm
- Four 40 °C

- Débit 1 mL/min
- Volume d'injection de 20 µL
- Mode isocratique

Pour la phase mobile : **ACN / Eau (45 : 55 ; V/V)** + triéthylamine à une concentration de 10 µL/100 mL

- Préparer 1 échantillon de ropivacaïne à une concentration de 50 mg/L avec pour solvant de l'eau distillée (diluer cet échantillon à 1/200 avec de l'eau distillée+ triéthylamine).
- Sélectionner la méthode « morphine » dans le logiciel Labsolutions® Shimadzu TM.
- Passer l'échantillon seul de ropivacaïne à 50 mg/L avec un temps d'analyse de 30 minutes.

Les résultats ne se sont pas révélés concluants car nous n'arrivions pas à obtenir des résultats répétables avec une bonne résolution et un temps d'analyse correcte pour les essais réalisés avec la méthode de la morphine sur la ropivacaïne. Ainsi nous avons donc décidé de changer de stratégie.

Nous avons choisi une colonne plus courte et choisi d'introduire un tampon acide dans la phase mobile (colonne NUCLEODUR C18 Gravity ; 4,6 x 150 mm ; 5 µm) et nous avons créé un 1<sup>er</sup> tampon en nous basant sur une publication [41]. On réalise un tampon constitué de 3,4 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans 1 L d'eau distillée ajusté à un pH de 2,5 avec de l'acide orthophosphorique 85%.

Après avoir testé cette méthode avec les conditions chromatographiques suivantes :

- Colonne NUCLEODUR C18 Gravity; 4,6 x 150 mm ; 5 µm
- Longueur d'onde 230 nm
- Four 30 °C
- Débit 1 mL/min
- Volume d'injection de 20 µL

Pour la phase mobile : **ACN / tampon (40 : 60 ; V/V)**

Nous avons passé l'échantillon de morphine à 50 mg /L seul puis l'échantillon de ropivacaïne à 50 mg /L seul avec un temps d'analyse de 30 minutes.

Là encore les pics observés ne sont pas suffisamment séparés et sortent en même temps que le front de solvant à 2 minutes. Il a été décidé de tester des conditions très différentes des précédentes au niveau des proportions de tampon et d'ACN.

On a testé la proportion suivante :

- **ACN / tampon (20 : 80 ; V/V)**

Le pic de la morphine sort en même temps que le front de solvant quelles que soient les proportions de phase organique. Il a donc été décidé de changer de tampon en ajoutant au précédent de l'acide octane-1 sulfonique. Cet agent permet d'effectuer une paire d'ions avec la morphine afin d'augmenter son

caractère apolaire. Le nouveau tampon de 1 L est constitué de 1,01 g de sel de sodium d'acide octane-1 sulfonique et 3,4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ajusté à un pH 2,5 avec de l'acide orthophosphorique à 85%.

Cette méthode a été utilisée avec les mêmes conditions chromatographiques que pour les tests précédents mais avec des proportions de phases mobiles différentes afin de trouver celle qui donnait les meilleurs résultats pour notre analyse. La proportion qui a permis d'obtenir les meilleures rétention et séparation fut : **ACN / tampon (25 : 75 ; V/V)**.

Les temps de rétention obtenus avec cette méthode est de 2,30 minutes pour la morphine et 17 minutes pour la ropivacaïne.

Suite à ces résultats, un gradient de solvant organique est nécessaire pour éluer en premier la morphine avec de faibles proportions de phase organique (phase mobile de 20/80 (ACN/tampon)) puis évoluer vers des proportions de phase mobile de 35/65 (ACN/tampon) pour éluer la ropivacaïne afin qu'elle sorte sans que le temps total d'analyse du mélange n'excède 10 min.

On réalise des essais sur la morphine puis sur de la ropivacaïne en injectant un volume de phase mobile juste après l'échantillon afin de vérifier que le système chromatographique ne soit pas contaminé par les molécules recherchées et pour être certains que le pic visualisé sur le chromatogramme corresponde bien à notre molécule injectée. Le chromatogramme du blanc est présenté en annexe 1.

Pour cela nous avons préparé des échantillons de morphine et de ropivacaïne à une concentration de 50 mg/mL. Ils ont été chromatographiés avec un temps d'analyse de 15 minutes à l'aide de la programmation du gradient de phase mobile (cf. Annexes 2 et 3).

On réalise des tests avec différents paramétrages pour le gradient afin de trouver celui qui donne les meilleurs résultats.

Le gradient retenu est le suivant :

0-2min : 20/80 (ACN/tampon +contre-ion sulfonate)

2,5 min : 78/22 (ACN/tampon +contre-ion sulfonate)

5 min : 20/80 (ACN/tampon +contre-ion sulfonate)

Avec ce gradient nous obtenons des résultats avec une résolution correcte ainsi qu'un temps total d'analyse relativement court. Le temps de rétention de la morphine est de 4 minutes et 7 minutes pour la ropivacaïne (cf. Annexe 4). La phase de recherche est donc terminée.

## Discussion

Un développement de méthode se heurte à certains obstacles, particulièrement lorsqu'on veut doser des mélanges de molécules qui imposent une technique séparative telle que la chromatographie. Ces molécules ont chacune leurs propriétés et ne réagissent pas forcément de la même façon avec les phases mobiles et stationnaires utilisées pour permettre leur dosage.

Les premiers essais ont permis de mettre en évidence la nécessité de raccourcir la longueur de colonne. Puis les essais suivants ont montré la nécessité d'utiliser un tampon fixant un pH plus propice à la ropivacaïne et moins à la morphine. L'ajout de l'octane sulfonate en contre ion de la morphine a favorisé son interaction et rétention par la phase C18 (Temps de rétention de 2 min vers un temps de rétention de 4 min.)

La morphine très hydroxylée et donc plus polaire que la ropivacaïne composée de plusieurs groupes aliphatiques. Ces particularités chimiques ont imposé un gradient de phase organique afin de réussir à séparer les 2 molécules et de pouvoir les doser en une seule méthode.

Cependant, si on avait pu avoir d'autres matériels que celui imposé il aurait été possible d'opter pour d'autres options lors du développement de cette méthode, comme par exemple des colonnes neuves et un logiciel d'acquisition plus intuitif. La méthode ainsi développée doit ensuite être validée en se basant sur les requis que l'on retrouve dans l'ICHQ2.

En somme, plusieurs motifs incitent les laboratoires de contrôle utilisant des méthodes analytiques à développer des techniques rapides lors de la mise en place de nouvelle méthode analytique notamment dans le cas de la réalisation d'une nouvelle préparation hospitalière jamais préparée auparavant ou lorsqu'il y a la volonté de remplacer le double contrôle par une méthode analytique. Ces techniques d'analyses doivent bien évidemment être au préalable validées.

De nombreux domaines s'intéressent donc à la recherche de nouvelles méthodes rapides et mettent en œuvre des moyens pour leur permettre de développer ces nouvelles méthodes. Ce développement passe par plusieurs étapes.

### **III. Les étapes de développement d'une nouvelle méthode analytique rapide**

Il existe plusieurs étapes prépondérantes lorsque l'on souhaite développer une méthode analytique [42]. Il y a, tout d'abord, la réalisation d'une étude bibliographique, ensuite le choix de la méthode analytique, la réalisation d'une étude de faisabilité, le développement et la mise au point de la méthode d'analyse, l'optimisation analytique et pour finir l'étape de validation analytique.

#### **1) Étape de recherche bibliographique**

Tout d'abord, lorsque l'on cherche à développer une nouvelle méthode analytique, il est important de se poser les bonnes questions et de passer par une étape de recherche bibliographique. On commence par réaliser des recherches concernant les méthodes déjà existantes et validées sur la ou les substances que l'on souhaite analyser. Pour effectuer cette recherche il est important de se baser sur de la documentation fiable. On peut par exemple se baser sur des publications scientifiques, des monographies

de Pharmacopées (Européenne, Américaine, Japonaise, etc.), des dossiers d'AMM, etc. En somme, tout texte fiable qui pourrait constituer une base pour notre développement de méthode.

Une fois l'étape de recherche bibliographique terminée on passe à l'étape de choix de la méthode analytique.

## **2) Étape de choix de la méthode analytique**

Le but premier d'une nouvelle méthode analytique est qu'elle puisse permettre d'obtenir les meilleurs résultats possibles à faible coût. Le choix de la méthode va passer par un raisonnement analytique. Il est important pour cela de poser le problème de départ et en déduire les analyses à réaliser. On se base le plus souvent, dans un premier temps, sur les limites de détection et de quantification de ce que l'on souhaite atteindre. Puis, il est important de s'assurer que la méthode choisie permette de réaliser des mesures aux niveaux des concentrations voulues et qu'elles soient adaptées au type d'échantillon (matrice) à analyser.

Enfin, le choix d'une méthode d'analyse doit prendre en compte le rapport du coût de la méthode par rapport au bénéfice. On souhaite que ce rapport soit le plus petit possible.

Lorsque la méthode analytique a été choisie il faut en réaliser l'étude de faisabilité.

## **3) Étape de l'étude de faisabilité**

L'étude de faisabilité consiste à évaluer si la méthode choisie est techniquement réalisable et économiquement viable [43].

### La faisabilité technique

L'évaluation de la faisabilité technique peut se réaliser grâce à des experts techniques, des responsables qualité et sécurité qui étudieront la méthode choisie sous différents angles (notamment en réalisant des essais) avant de conclure à la faisabilité de celle-ci.

### Évaluation des coûts

Il convient de faire une évaluation des coûts du développement de la méthode dans le cadre de l'étude de faisabilité. En effet, lorsque l'on développe une méthode on peut être restreint au niveau du budget, à ce titre il est important de trouver des alternatives si les coûts sont au-dessus de ce qu'il est possible d'investir dans le projet.

Ce coût comprend à la fois :

- La main d'œuvre

- Le matériel
- Les réactifs
- Les solvants
- Les coûts énergétiques
- Les petits matériels consommables
- Les systèmes de contrôle qualité
- Le calibrage et la validation
- La maintenance des équipements
- Les licences (logiciels)

Une fois que l'étude de faisabilité est terminée et concluante on peut passer à la mise au point de la méthode d'analyse.

#### **4) Développement et mise au point de la méthode d'analyse**

L'étape de développement et de mise au point consiste à combiner les informations recueillies concernant les méthodes analytiques décrites dans la bibliographie scientifique avec les exigences de la méthode que nous souhaitons développer.

Tout d'abord, il faudra lister le matériel, les réactifs, les solvants mis à notre disposition ou dont il faudra se munir pour pouvoir réaliser les essais nécessaires.

Ensuite, vient la partie de réalisation des essais en fonction des premiers paramètres choisis à tester. On réussit rarement du 1<sup>er</sup> coup à trouver les bons paramètres de dosage des échantillons.

En effet, il existe une variabilité entre les équipements et les substances utilisés lors des essais se trouvant dans la bibliographie et ce que l'on manipule réellement.

En fonction des résultats que l'on obtient il est important d'adapter les paramètres analytiques tels que la proportion des phases mobile et stationnaire utilisées lors de l'analyse, le mode d'analyse (isocratique ou gradient), le débit, etc.

Enfin, nous pouvons procéder à la rédaction d'un rapport interne pour mettre sur papier ce qui a été fait. Ce rapport est constitué de plusieurs parties dont une contenant le matériel et les méthodes que nous avons développées ainsi que la description de la mise en œuvre de la méthode. Pour finir, nous pourrions exposer les résultats et réaliser une analyse critique des résultats.

Une fois le développement de méthode rapide effectué il convient d'optimiser celle-ci.

## **5) Optimisation analytique**

L'optimisation analytique consiste à améliorer la méthode analytique et à permettre la rentabilisation des investissements réalisés notamment dans les équipements. Pour cela, nous pouvons essayer de travailler sur certains paramètres tels que la durée de l'analyse.

Enfin la dernière étape de développement d'une nouvelle méthode analytique rapide est la validation analytique. Celle-ci passe également par plusieurs étapes et nécessite de respecter la norme NFT90210 et l'ICHQ2.

## **IV. Les étapes de la validation de méthode en respectant les normes en vigueur**

Une fois que nous avons développé la méthode adéquate à l'analyse du composant souhaité il est obligatoire de procéder à la validation de celle-ci afin de pouvoir utiliser la méthode en routine. Il est nécessaire de se référer aux référentiels adaptés qui sont la norme NFT90210 et l'ICHQ2 [44] [45] ce qui permet d'assurer la conformité des résultats d'analyses. D'après l'ICH : La validation d'une procédure analytique a pour objectif de démontrer qu'elle est appropriée à l'usage auquel elle est destinée. La validation d'une procédure analytique est le processus par lequel il est établi, par des études en laboratoire, que les performances répondent aux exigences des applications analytiques prévues. La première étape de la validation de méthode est de rédiger un protocole de validation.

### **1) Rédaction du protocole de validation**

Avant de se lancer dans les différentes étapes de validation il est important de rédiger un protocole de validation clair et détaillé. Ceci afin que n'importe qui, ayant les compétences nécessaires puisse le suivre et réaliser les étapes qui y sont décrites.

Dans un protocole de validation on retrouvera la description de la méthodologie des tests à réaliser pour valider la méthode analytique en se basant sur les critères de validation décrits dans la partie ci-après. Attention cependant il ne s'agit pas d'un protocole figé, il peut évoluer en fonction des résultats trouvés en cours d'analyse.

### **2) Évaluation des critères de validation selon les normes en vigueur**

Il existe de nombreux critères à examiner pour valider la méthode analytique développée :

#### **a. Évaluation de la linéarité de la méthode**

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité, sur un intervalle défini, à obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (ou concentration) de substance à doser dans l'échantillon. La linéarité d'une méthode analytique est déterminée dans l'ensemble du domaine d'utilisation de celle-ci. Elle peut se déterminer directement à partir d'une gamme d'étalonnage de la substance active ou en



utilisant des fractions de chaque composante du produit fini pesées séparément. La linéarité doit être évaluée par inspection visuelle d'un tracé de signaux en fonction de la concentration ou de la teneur en analyte. Si la relation entre ces 2 grandeurs est linéaire, les résultats des tests sont évalués par des méthodes statistiques telles que par le calcul d'une droite de régression par la méthode des moindres carrés. Après avoir calculé la droite de régression linéaire, il faut déterminer la pente de cette droite, l'ordonnée à l'origine, le coefficient de corrélation et la somme des carrés des résidus.

De plus, une analyse de l'écart des points de données réels par rapport à la ligne de régression peut s'avérer utile pour évaluer la linéarité. Cet écart est évalué grâce au coefficient de détermination  $R^2$  qui a une valeur comprise entre 0 et 1. Si  $R^2$  tend vers 1 (valeurs préférentiellement de l'ordre de 0,999) l'écart des points de données par rapport à la ligne de régression sera faible.

Enfin, pour établir la linéarité d'une méthode il est nécessaire de choisir un minimum de 5 concentrations différentes.

### **b. Évaluation de la fidélité de la méthode (répétabilité, reproductibilité et fidélité intermédiaire)**

La fidélité d'une méthode d'analyse exprime l'étroitesse de l'accord parmi une série d'analyses provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène analysées dans des conditions plus ou moins variables. La fidélité est généralement exprimée numériquement par la variance, l'écart-type, un intervalle de confiance ou le coefficient de variation d'un ensemble de mesures.

La fidélité est évaluée lors du dosage de la teneur en principe actif et impuretés, sur l'ensemble du domaine d'utilisation ou à 100% de la teneur attendue.

La fidélité peut s'évaluer à trois niveaux : répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité.

#### Répétabilité

La répétabilité ou précision intra-analyse est l'expression de la fidélité de l'analyse lorsque celle-ci est reprise dans les mêmes conditions de réalisation, après un court intervalle de temps.

La répétabilité prend en compte la variabilité sur les paramètres suivants : la préparation de l'échantillon, l'extraction, la pesée, la dilution et de la réponse de l'instrument.

Les conditions de répétabilité correspondent aux conditions 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

- des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps

Il est important également de réaliser un minimum de 9 mesures englobant le domaine d'utilisation de la méthode (3 concentrations de 3 échantillons chacune) ou bien un minimum de 6 mesures d'une concentration à 100% de la teneur escomptée.

Ensuite, un calcul de l'écart-type robuste des résultats obtenus est effectué, plus l'écart est faible plus la méthode analytique est répétable.

Enfin on calcule le coefficient de variation (exprimé en pourcentage) qui correspond au rapport entre l'écart-type et la moyenne des valeurs obtenues multiplié par 100. Si celui-ci est inférieur à 5% (seuil donné par l'enseignant au cours de l'UE « métrologie ») on peut considérer que la méthode est répétable.

### Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire correspond aux variations survenant au sein d'un même laboratoire. Les analyses sont effectuées des jours différents, par des personnes différentes, au moyen d'appareils différents. Elle comprend la variabilité de la réponse des différents appareillages, des réactifs, de l'opérateur ainsi que des étalons utilisés lors de l'analyse.

Il convient de préparer un plan d'expérimentation en fonction des sources de variation afin de décrire les conditions que l'on fait varier et celles qui restent inchangées.

### Reproductibilité

La reproductibilité correspond à la concordance entre les laboratoires (essais inter-laboratoires). L'évaluation de la reproductibilité a pour but l'uniformisation de la méthodologie.

Les conditions d'évaluation de la reproductibilité correspondent aux conditions 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. Il convient de préparer un plan d'expérimentation en fonction des sources de variation afin de décrire les conditions que l'on fait varier et celles qui restent inchangées.

Les conditions de reproductibilité ne sont pas obligatoirement réalisées lors de la validation d'une nouvelle méthode analytique.

Afin de pouvoir conclure quant à la fidélité d'une méthode on calcule le coefficient de variation (exprimé en pourcentage). Celui-ci correspond au rapport entre l'écart-type robuste et la médiane des valeurs obtenues multiplié par 100. Si le résultat obtenu est inférieur à 5% (seuil donné par l'enseignant au cours de l'UE « métrologie ») on peut considérer que la méthode est considérée comme étant fidèle.

*Nota bene* : lors de l'évaluation de la fidélité d'une méthode chromatographique il est également important de prendre en compte la fidélité instrumentale qui comprend l'évaluation de la détection, de la qualité de l'injection, de l'intégration, de la séparation ainsi que les variations du débit de la phase mobile.

L'évaluation de la fidélité instrumentale est réalisée lors de l'étude de répétabilité à l'aide de tests statistiques.

### **c. Évaluation de l'exactitude de la méthode**

L'exactitude exprime le degré de concordance entre la valeur théorique acceptée comme valeur conventionnellement vraie ou comme valeur de référence acceptée et la valeur moyenne associée à son incertitude obtenue en appliquant la méthode un certain nombre de fois.

Que ce soit pour une substance active, un produit fini ou des impuretés il existe différentes méthodes de déterminations de l'exactitude.

- Pour une substance active :

Méthode 1 : Application d'une méthode analytique à une substance de référence dont l'exactitude est définies.

Méthode 2 : Comparaison des résultats de la méthode analytique proposée avec ceux d'une deuxième méthode bien caractérisée, dont l'exactitude est définie.

Méthode 3 : Déduction de l'exactitude une fois que la précision, la linéarité et la spécificité ont été établies.

- Pour un médicament :

Méthode 1 : Utilisation de la méthode analytique à un mélange réunissant tous les composants auxquels des quantités connues de la substance à analyser ont été ajoutées. Ce mélange correspond au placebo.

Méthode 2 et 3 : Identiques à celles décrites pour la substance active.

- Pour les impuretés

L'exactitude doit être évaluée à l'aide d'échantillons (substance active ou produit fini) auxquels on a ajouté des quantités connues d'impuretés.

Lorsqu'il n'est pas possible d'obtenir des échantillons de certaines impuretés et/ou produits de dégradations, il est acceptable de comparer les résultats obtenus par une procédure indépendante. Le facteur de réponse du principe actif peut être utilisé.

Il faudra également préciser si les impuretés sont dosées individuellement ou de manière globale par rapport à la substance active.

Enfin, l'évaluation de l'exactitude se fait avec un minimum de 9 résultats obtenus par l'analyse sur un minimum de 3 niveaux de concentration couvrant le domaine d'utilisation.

L'exactitude est la différence entre la moyenne des résultats obtenus et la valeur vraie acceptée avec les intervalles de confiance correspondant.

L'exactitude s'exprime en g/L.

#### **d. Évaluation de la sélectivité et de la spécificité**

##### Sélectivité

La sélectivité est définie dans le vocabulaire international de métrologie comme étant la propriété d'un système de mesure qui fournit des valeurs mesurées indépendantes des autres quantités mesurées dans la substance analysée [46].

Celle-ci est nécessaire pour mettre en évidence l'absence d'interférence entre les composés de la matrice et l'analyte.

##### Spécificité

La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse évalue sans équivoque possible le composé visé en présence de tout autre composé pouvant raisonnablement être supposé présent. Il peut aussi bien s'agir d'impuretés, de produits de dégradation, de la matrice, etc. La spécificité permet de s'assurer de l'identité d'un analyte, de s'assurer que toutes les procédures analytiques effectuées permettent une déclaration précise de la teneur en impuretés d'un analyte et enfin de fournir un résultat exact qui permet une déclaration précise sur le contenu ou la teneur de l'analyte dans un échantillon.

Elle est donc déterminée pour des tests d'identité, de dosage des impuretés et de la teneur de l'analyte. Afin de s'assurer d'un degré de discrimination souhaité, il est recommandé de suivre au minimum deux méthodes (méthode d'identification et méthode de teneur et dosage des impuretés).

En ce qui concerne la méthode d'identification, elle consiste à attribuer un résultat positif à l'échantillon contenant l'analyte et un résultat négatif pour un échantillon dépourvu d'analyte ou avec des substances similaires.

En ce qui concerne la méthode de teneur et dosage des impuretés, on distingue 2 situations distinctes :

- En présence d'étalons d'impuretés :

La démarche consiste à analyser une substance pure et une substance pure avec des impuretés en quantité suffisante pour ensuite comparer les profils obtenus.

- En l'absence d'étalons d'impuretés :

La démarche consiste à comparer des résultats de 2 méthodes différentes par exemple la méthode de la pharmacopée avec toute autre méthode validée.

## e. Évaluation de la limite ou seuil de détection et de quantification

### Limite de détection

La limite ou seuil de détection d'une méthode d'analyse correspond à la plus faible quantité d'analyte qui peut être détectée dans un échantillon de manière reproductible sans forcément fournir la valeur exacte. En dessous de cette limite, l'analyte est considéré comme non détecté.

Pour déterminer la limite de détection il existe plusieurs approches possibles, selon que la méthode analytique à valider utilise un instrument ou non.

Ci-après une liste non exhaustive des approches qui peuvent être envisagées :

- Méthode basée sur une évaluation visuelle

Cette méthode est utilisable aussi bien pour des méthodes instrumentales que non instrumentales. Avec cette méthode la limite de détection est déterminée par l'analyse d'échantillons dont les concentrations d'analyte sont connues et on établit le niveau minimum auquel l'analyte peut être détecté de manière fiable.

- Méthode basée sur le rapport signal sur bruit

Cette méthode n'est envisageable que si la méthode analytique présente un bruit de fond et utilise des instruments de détection délivrant un signal quantifiable. La détermination du rapport signal sur bruit est effectuée en comparant les signaux mesurés d'échantillons contenant de faibles concentrations connues d'analyte avec ceux d'échantillons à blanc (le blanc étant un contrôle qualité réalisé afin d'évaluer une contamination potentielle de la chaîne de mesure). On établit également la concentration minimale à laquelle l'analyte peut être détecté de manière fiable. Un rapport signal sur bruit de l'ordre de 3:1 est généralement considéré comme acceptable pour estimer la limite de détection.

- Méthode basée sur l'écart-type et la pente

La limite de détection peut s'exprimer grâce à la formule suivante :  $LD = \frac{3,3 \sigma}{S}$  et est exprimée en g/L.

Avec  $\sigma$  correspondant à l'écart type de la réponse et S correspondant à la pente de la courbe d'étalonnage qui peut être estimée à partir de la courbe d'étalonnage de l'analyte.

L'estimation de  $\sigma$  peut être effectuée à l'aide de différentes méthodes dont voici deux exemples :

- o Méthode basée sur l'écart-type du blanc

La mesure de l'ampleur de la réponse de fond analytique est effectuée en analysant un nombre approprié d'échantillons blancs et en calculant l'écart type de ces réponses.

- o Méthode basée sur la courbe d'étalonnage

Ici, une courbe d'étalonnage spécifique doit être étudiée en utilisant des échantillons contenant un analyte dont certaines des concentrations étudiées se trouvent dans la plage de

limite de détection. L'écart type résiduel d'une droite de régression ou l'écart type des ordonnées à l'origine des droites de régression peut être utilisé comme écart type.

### **Limite de quantification**

La limite de quantification ou de dosage d'une méthode analytique correspond à la quantité la plus faible de la substance à analyser qui peut être dosée avec un degré acceptable de fidélité et exactitude.

Cette limite est un paramètre des analyses quantitatives des composés présents en faible quantité dans les matrices d'échantillons, notamment utilisée pour la détermination d'impureté et/ou des produits de dégradation.

Tout comme pour la limite de détection, il existe plusieurs approches possibles, selon que la méthode analytique à valider utilise un instrument ou non.

Ci-après une liste non exhaustive des approches qui peuvent être envisagées :

- Méthode basée sur une évaluation visuelle

Cette méthode est utilisable aussi bien pour des méthodes instrumentales que non instrumentales. Avec cette méthode la limite de quantification est déterminée par l'analyse d'échantillons dont les concentrations d'analytes sont connues et on établit le niveau minimum auquel l'analyte peut être quantifié avec une exactitude et une justesse acceptables. La justesse étant définie comme le degré de concordance entre la valeur obtenue lors de l'application de la méthode et la valeur de référence.

- Méthode basée sur le rapport signal sur bruit

Cette méthode n'est envisageable que si la méthode analytique présente un bruit de fond. La détermination du rapport signal sur bruit est effectuée en comparant les signaux mesurés d'échantillons contenant de faibles concentrations connues d'analyte avec ceux d'échantillons à blanc et en établissant la concentration minimale à laquelle l'analyte peut être détecté de manière fiable. Un rapport signal sur bruit typique est de 10 :1.

- Méthode basée sur l'écart-type et la pente

La limite de quantification peut s'exprimer avec la formule suivante :  $LQ = \frac{10\sigma}{S}$  et est exprimée en g/L.

Avec  $\sigma$  correspondant à l'écart type de la réponse et S correspondant à la pente de la courbe d'étalonnage qui peut être estimée à partir de la courbe d'étalonnage de l'analyte.

L'estimation de  $\sigma$  peut être effectuée à l'aide de différentes méthodes dont voici deux exemples :

- o Méthode basée sur l'écart-type du blanc

La mesure de l'ampleur de la réponse de fond analytique est effectuée en analysant un nombre approprié d'échantillons blancs et en calculant l'écart type de ces réponses.

- o Méthode basée sur la courbe d'étalonnage

Ici, une courbe d'étalonnage spécifique doit être étudiée en utilisant des échantillons contenant un analyte dont certaines des concentrations étudiées se trouvent dans la plage de

limite de quantification. L'écart type résiduel d'une droite de régression ou l'écart type des ordonnées à l'origine des droites de régression peut être utilisé comme écart type.

La méthode utilisée pour déterminer cette limite doit être indiquée. La limite recherchée doit ensuite être validée par l'analyste avec un nombre approprié d'échantillons dont on sait que leurs concentrations sont proches de la limite de quantification.

#### f. Évaluation du domaine d'utilisation

L'évaluation du domaine d'utilisation d'une méthode d'analyse est définie dans l'ICH Q2 comme étant l'intervalle compris entre la concentration ou quantité la plus élevée et la concentration ou quantité la plus faible d'un composé analysé dans un échantillon pour lequel on a démontré que la méthode avait un degré acceptable de fidélité, de justesse et de linéarité.

Le domaine d'utilisation est généralement dérivée de l'étude de linéarité et dépend également de l'application prévue par la procédure analytique.

#### g. Évaluation de la robustesse

La robustesse d'une méthode analytique est la mesure de sa capacité à ne pas être affectée par de faibles variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode analytique. La robustesse fournit une indication sur la fiabilité de la méthode aux conditions normales d'utilisation.

Les paramètres opératoires testés pour évaluer la robustesse d'une méthode analytique sont résumés dans le tableau N°1 suivant :

Tableau N°1 : Paramètres opératoires testés pour l'évaluation de la robustesse d'une méthode analytique selon le champ d'application

Application	Variations caractéristiques	Chromatographie liquide	Chromatographie gazeuse
<b>Paramètres opératoires</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Variation des solutions d'analyse</li> <li>• Durée d'extraction</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colonnes différentes</li> <li>• Variation de la température de la colonne</li> <li>• Variation du débit de la phase mobile</li> <li>• Variation du pH de la phase mobile</li> <li>• Variations de la composition de la phase mobile</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colonnes différentes</li> <li>• Variation de la température du four</li> <li>• Débit du gaz vecteur</li> </ul>

*Nota Bene* : La robustesse ne fait pas strictement partie des paramètres de validation. En effet, lors de la phase finale de mise au point de la méthode décrite dans la technique de contrôle, celle-ci doit être testée.

### 3) Validation des méthodes d'analyses grâce au profil d'exactitude

Une commission de la SFSTP propose une autre approche pour permettre la validation d'une méthode analytique basée sur l'établissement d'un profil d'exactitude [47].

La construction de ce profil d'exactitude permet à la fois d'évaluer la justesse, la fidélité, la limite de quantification.

Il s'agit d'un outil visuel de décision sur les performances globales d'une méthode.

Il existe plusieurs étapes lors de la réalisation d'un profil d'exactitude :

#### 1. Définition de l'objectif de la méthode :

L'objectif d'une méthode de dosage est de réussir à déterminer de façon la plus exacte chacune des concentrations inconnues qu'il y aura à doser. Pour cela il est important de pouvoir garantir que les résultats obtenus grâce à la méthode d'analyse seront suffisamment proches de la valeur vraie de l'échantillon à doser.

Pour ce faire il faut choisir la limite d'acceptabilité qui correspond à l'écart maximum  $\lambda$  accepté entre la valeur obtenue par la méthode d'analyse ( $V_{mes}$ ) et la valeur de référence acceptée comme valeur vraie ( $V_{ref}$ ) :  $|V_{mes} - V_{ref}| < \lambda$

Pour garantir que l'équation ci-dessus soit vérifiée il faut que sa probabilité soit supérieure ou égale à une valeur minimale  $\beta$  d'au moins 80% :  $\Pr(|V_{mes} - V_{ref}| < \lambda) \geq \beta$

#### 2. Choix du plan d'expérience de validation :

Le plan d'expérience de validation doit permettre de réaliser des mesures par séries en tenant compte des différentes sources d'incertitude (ex : évolution des échantillons et réactifs, changement d'opérateurs ou d'étalonnage, modification des réglages instrumentaux...). Il est important de choisir le nombre de séries de mesures, le nombre de répétitions par niveau et par jour ainsi que le nombre de niveaux de concentration.

Dans chaque série on réalisera au moins 3 niveaux de concentration afin de vérifier la linéarité et la justesse sur tout le domaine de validation.

#### 3. Choix du plan d'expérience d'étalonnage :

Le nombre de séries doit être le même que pour les échantillons de validation car l'on vérifiera sur plusieurs jours si la méthode est dans la capacité de quantifier de la même manière au cours du temps les échantillons de validation.

#### 4. Collecte des données de validation et d'étalonnage :

Pour les données d'étalonnage on calcule des coefficients des modèles d'étalonnage. Pour cela plusieurs fonctions de réponse peuvent être envisagées : droite passant par l'origine, fonction quadratique, etc.

En ce qui concerne les données de validation, on calcule des concentrations expérimentales en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage. En effet, les méthodes d'analyses quantitatives



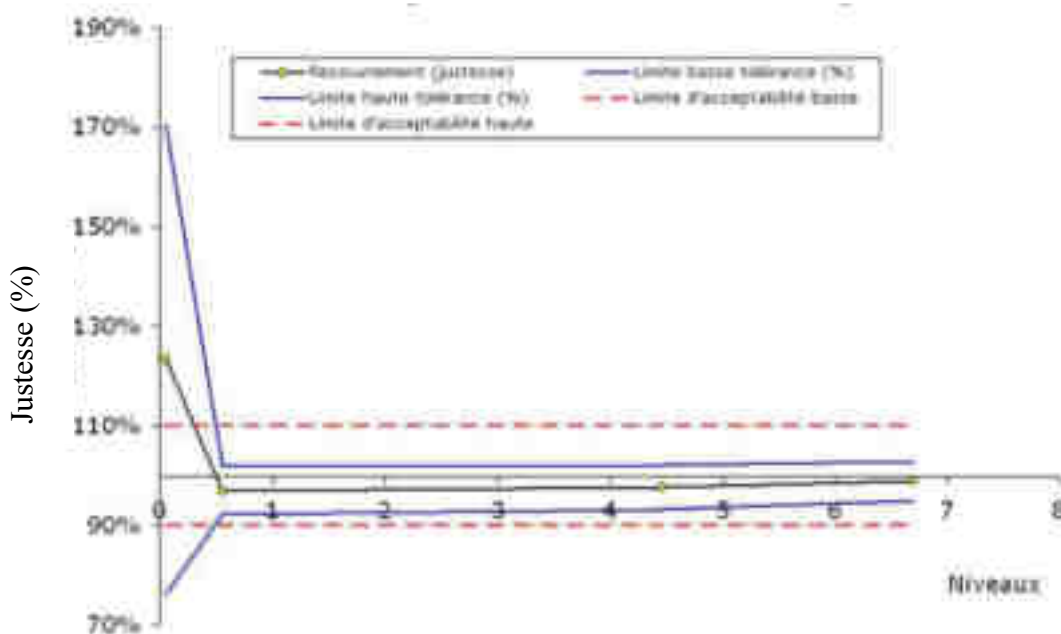
mesurent rarement directement une quantité absolue de l'analyte. Elles procèdent de manière indirecte en comparant le résultat avec une quantité connue de l'analyte. Il est donc nécessaire d'utiliser la fonction inverse du modèle d'étalonnage afin de transformer les réponses mesurées en concentrations calculées pour chaque mesurage.

5. Calcul des critères de validation pour chaque niveau. Il est nécessaire de calculer la justesse et la fidélité pour chaque niveau.
6. Construction du profil d'exactitude

Comme représenté sur la figure N°3, le profil d'exactitude correspond à une représentation graphique des résultats en valeurs relatives par rapport à la valeur de référence du niveau.

En abscisse on retrouve les valeurs de références moyennes et en ordonnée on retrouve les limites de tolérance relatives haute et basse, les taux de recouvrement moyens ainsi que les limites d'acceptabilité relatives haute et basse.

Figure N°3 : Graphique d'un profil d'exactitude issu d'un cours de métrologie



7. Interprétation des résultats

Le domaine d'utilisation correspond aux concentrations pour lesquelles l'intervalle de tolérance est compris dans les limites d'acceptabilité.

#### 4) Rédaction du rapport de validation et évaluation des résultats obtenus

Tout essai réalisé et résultats d'analyses associés dans le cadre de la validation d'une méthode analytique et du protocole correspondant doit être documenté selon les procédures en vigueur.

La rédaction d'un rapport de validation doit comprendre :

- Une présentation claire des résultats obtenus
- Une évaluation des résultats par rapport aux critères d'acceptation mentionnés dans le protocole de validation

- Les différentes conclusions découlant des résultats

Le rapport de validation précisera également les conditions dans lesquelles la validation a été réalisée (appareillage, critères validés, nombre d'injections, ...) ainsi que les références du protocole de validation correspondant.

Si les résultats obtenus sont conformes, la méthode analytique est validée et peut être ensuite utilisée en routine pour des analyses.

Enfin, en ce qui concerne la validation des méthodes analytiques, une revalidation des méthodes peut s'avérer nécessaire dans certaines situations. En effet, elle peut se faire lors de changements dans la synthèse de la substance médicamenteuse, de changements dans la composition du produit fini et de modifications de la procédure analytique.

Une modification de réglage de l'appareil de mesure est considérée comme mineure, alors qu'une modification qui touche le principe de la méthode est considérée comme majeure. Cette dernière nécessite une procédure de validation complète.

En somme, la validation analytique permet d'assurer la fiabilité et la traçabilité des résultats d'une analyse en laboratoire. Elle est adaptable aux exigences et à l'usage auquel elle est destinée. Bien que le principe de validation analytique soit reconnu comme indispensable à la gestion de la qualité dans les industries pharmaceutiques, son application pratique n'est pas toujours des plus aisées.

## **V. Conclusion**

Le développement de méthodes rapides est un domaine complexe qui se situe au cœur de l'innovation. Celui-ci nécessite de passer par plusieurs étapes et des équipements adaptés pour être portée à son terme. Il nécessite également de la rigueur et de la patience lors de la réalisation des essais. En effet, il englobe des projets de grande envergure qui peuvent prendre plusieurs mois.

Enfin, le développement de méthodes analytiques peut faire face à des obstacles auxquels on ne s'attendait pas au départ du projet. Les équipes projets sont donc défiées quotidiennement pour trouver des solutions à chaque problème.

Le développement analytique est un domaine en constante évolution concernant des secteurs variés en qui a encore beaucoup d'avenir.

## **VI. Annexes**

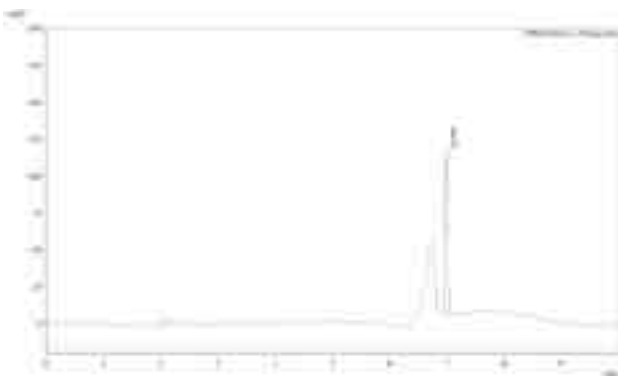
Annexe 1 : chromatogramme du blanc



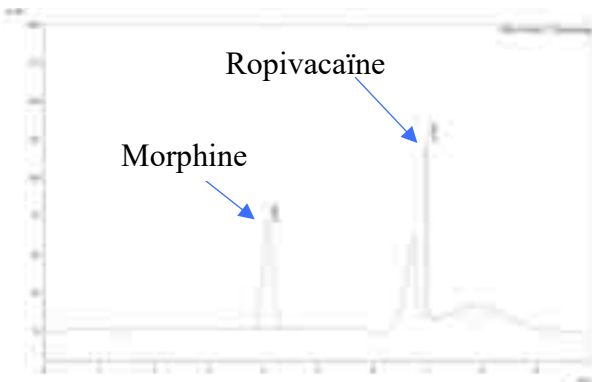
Annexe 2 : chromatogramme de la morphine à 50 mg/L



Annexe 3 : chromatogramme de la ropivacaïne à 25 mg/L



Annexe 4 : chromatogramme du mélange morphine à 50 mg/L+ ropivacaïne à 25 mg/L en gradient optimal



## VII. Bibliographie

- [1] **Agence régionale de santé.** Pesticides / Produits phytosanitaires [Internet]. [cité 31 août 2022]. Disponible sur: <https://www.nouvelle-aquitaine.ars.sante.fr/index.php/pesticides-produits-phytosanitaires>
- [2] **NF EN 12393** [Internet]. Afnor EDITIONS. [cité 31 août 2022]. Disponible sur: <https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-en-123931/aliments-dorigine-vegetale-methodes-multiresidus-de-determination-de-residu/fa175127/42548>
- [3] **NF EN 15662** [Internet]. Afnor EDITIONS. [cité 31 août 2022]. Disponible sur: <https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-en-15662/aliments-dorigine-vegetale-multimethode-de-determination-des-residus-de-pes/fa187718/81211>
- [4] **Ministère des Solidarités et de la Santé.** Le contrôle de la qualité de l'eau du robinet [Internet]. [cité 7 juin 2022]. Disponible sur: <https://solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/eaux/article/le-controle-de-la-qualite-de-l-eau-du-robinet?>
- [5] **Ministère de la Santé et de la Prévention.** Le contrôle de la qualité de l'eau du robinet [Internet]. [cité 7 juin 2022]. Disponible sur: [https://solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/eaux/article/le-controle-de-la-qualite-de-l-eau-du-robinet?TSPD\\_101\\_R0=087dc22938ab200012c9fe6e96775eb048b1850fb65a851b325af95c57b3c9cad26eb1bd5bd858ad08641b86ed143000e7f558582507cfff314f768460d88db1419f1c355b750171569d1c8aa49cbeef878ca2c3234233dc09d737eac6f8e8c4](https://solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/eaux/article/le-controle-de-la-qualite-de-l-eau-du-robinet?TSPD_101_R0=087dc22938ab200012c9fe6e96775eb048b1850fb65a851b325af95c57b3c9cad26eb1bd5bd858ad08641b86ed143000e7f558582507cfff314f768460d88db1419f1c355b750171569d1c8aa49cbeef878ca2c3234233dc09d737eac6f8e8c4)
- [6] **Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.** Pesticides dans les eaux destinées à la consommation humaine : quelle contribution de l'Anses pour protéger la santé des consommateurs ? [Internet] [cité 7 juin 2022]. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/content/pesticides-dans-les-eaux-destin%C3%A9es-%C3%A0-la-consommation-humaine-quelle-contribution-de-l%E2%80%99anses>
- [7] **DIRECTIVE 98/83/CE DU CONSEIL.** Journal officiel des Communautés européennes [Internet]. [cité 7 juin 2022]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0083>
- [8] **VON AMELN LOVISON O, JANKB L, MACHADO DE SOUZAC W, RAMALHO GUERRAC R, ELIAS LAMASD A, DA COSTA BALLESTRIN R, et al.** *Identification of pesticides in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography–electrospray*

*ionization mass spectrometry*. 2021 [Internet]. [cité 28 août 2022]. Disponible sur : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34355448/>

- [9] **ROUDAUT B, FOURNET I.** *Le dispositif de surveillance des résidus de médicaments vétérinaires dans les volailles et les œufs*. Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation no 77/Numéro spécial – Surveillance sanitaire des aliments. – p.37-41. <https://hal-anses.archives-ouvertes.fr/anses-01637641/file/roudaut37.pdf>, consulté le 7 juin 2022.
- [10] **Commission Européenne.** La surveillance en temps réel de la qualité des aliments | IMPRESS Project | Results in brief | FP7 [Internet]. [cité 7 juin 2022]. Disponible sur: <https://cordis.europa.eu/article/id/152043-realtime-monitoring-of-food-quality/fr>
- [11] **QualiREG.** Dépistage des résidus d’antibiotiques dans les produits animaux / Antibiotiques et médicaments vétérinaires [Internet]. [cité 7 juin 2022]. Disponible sur: <https://www.qualireg.org/actions/surete-des-aliments/residus/antibiotiques-et-medicaments-veterinaires/depistage-des-residus-d-antibiotiques-dans-les-produits-animaux>
- [12] **DIRECTIVE 96/23/CE DU CONSEIL.** Journal officiel des Communautés européennes [Internet]. [cité 7 juin 2022]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX:31996L0023>
- [13] **Conseil de l’Union Européenne.** Règlement (CEE) n° 2377/90 du Conseil du 26 juin 1990 établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d’origine animale - Office of the EU [Internet]. [cité 7 juin 2022]. Disponible sur: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/bc789f56-7ee4-43c1-aad1-fafbcde2d06d/language-fr>
- [14] **Contrôle microbiologique des produits non stériles : essais de dénombrement microbien,** Chapitre 2.6.12. Pharmacopée Européenne 10<sup>ème</sup> édition. Strasbourg, France : Conseil de l’Europe ; 2019
- [15] **Contrôle microbiologique des produits non stériles : recherche de microorganismes spécifiés,** Chapitre 2.6.13. Pharmacopée Européenne 10<sup>ème</sup> édition. Strasbourg, France : Conseil de l’Europe ; 2019
- [16] **Essai des endotoxines bactériennes,** Chapitre 2.6.14. Pharmacopée Européenne 10<sup>ème</sup> édition. Strasbourg, France : Conseil de l’Europe ; 2019

- [17] **TORDJMAN-VALENCY L.** Défi du dénombrement microbien dans l'industrie pharmaceutique: les nouvelles méthodes alternatives sont-elles appliquées? Th D Pharmacie, Grenoble (2016).
- [18] **A3P.** Les méthodes rapides en microbiologie. Une opportunité pour tout un chacun au sein de l'entreprise. [Internet] [cité 24 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.a3p.org/methodes-rapides-microbiologie/>
- [19] **USP 30**, Chapitre <1223> Validation of Alternative microbiological methods
- [20] **GREGORI G.** Du dénombrement à l'analyse de fonctions cellulaires. [Internet] [cité 24 avr 2022]. Disponible sur: <https://studylibfr.com/doc/1165414/du-denumerement-a-l-analyse-de-fonctions-cellulaires>
- [21] **PDA.** A Method for the Rapid Detection of Microbial Contaminants in Animal Cell Culture Processes | PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology [Internet]. [cité 4 juin 2022]. Disponible sur: <https://journal.pda.org/content/55/6/337>
- [22] **LABMATE.** GlaxoSmithKline Receives FDA Approval to use AES CHEMUNEX's ChemScan RDI for Real-Time In- Process Monitoring Labmate Online [Internet]. [cité 4 juin 2022]. Disponible sur: <https://www.labmate-online.com/news/laboratory-products/3/aes-chemunex/glaxosmithkline-receives-fda-approval-to-use-aes-chemunexs-chemscan-rdi-for-real-time-in-process-monitoring/7773>
- [23] **BIOMERIEUX.** SCANRDI Brochure [Internet]. [cité 4 juin 2022]. Disponible sur: <https://www.biomerieux-industry.com/sites/default/files/2020-03/SCANRDI%20BROCHURE.pdf>
- [24] **ACM Pharma.** Dosage des endotoxines bactériennes en méthode rFC : Une alternative fiable et pérenne au test LAL ! [Internet]. [cité 4 juin 2022]. Disponible sur: <https://www.acmpharma.com/dosage-des-endotoxines-bacteriennes-en-methode-rfc-une-alternative-fiable-et-perenne-au-test-lal-2/>
- [25] **BIOMERIEUX Industry USA.** ENDOZYME® II GO [Internet]. [cité 4 juin 2022]. Disponible sur: <https://biomerieuxdirect.com/industry/c/ENDOZYME%C2%AE-II-GO/p/890031>
- [26] **Stérilité**, Chapitre 2.6.1. Pharmacopée Européenne 10<sup>ème</sup> édition. Strasbourg, France : Conseil de l'Europe ; 2019

- [27] **EAGLE**. ScanRDI® Rapid Sterility Test - Microbiology Testing [Internet]. [cité 4 juin 2022]. Disponible sur: <https://eagleanalytical.com/scanrdi/>
- [28] Coloration de Gram | Principe | Procedure | Interprétation | Astuces [Internet]. [cité 4 juin 2022]. Disponible sur: <https://microbiologie-clinique.com/Coloration-Gram.html>
- [29] **BIOMERIEUX France**. Galeries d'identification API - Diagnostic Clinique [Internet]. [cité 4 juin 2022]. Disponible sur: <https://www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/galleries-didentification-api>
- [30] **RESTEK**. High-Resolution GC Analyses of Fatty Acid Methyl Esters (FAMES) [Internet]. [cité 4 juin 2022]. Disponible sur: <https://www.restek.com/row/technical-literature-library/articles/high-resolution-GC-analyses-of-fatty-acid-methyl-esters-fames/>
- [31] **BioInfo**. Le séquençage, une histoire de générations [Internet]. [cité 4 juin 2022]. Disponible sur: <https://bioinfo-fr.net/le-sequencage>
- [32] **Parlons sciences**. Séquençage de Sanger [Internet]. [cité 4 juin 2022]. Disponible sur: <https://parlonssciences.ca/ressources-pedagogiques/documents-dinformation/sequencage-de-sanger>
- [33] **IGDR**. Séquençage de troisième génération [Internet]. [cité 4 juin 2022]. Disponible sur: <https://igdr.univ-rennes1.fr/sequencage-de-troisieme-generation>
- [34] **VOLLAND H, KHREICH N**. Développement de tests immunochromatographiques sur « bandelette » plus sensibles [Internet] [cité 4 juin 2022]. Disponible sur: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/analyse-biocapteurs-et-technologies-omiques-42160210/tests-de-detection-biologique-tres-sensibles-a-base-de-nouveaux-traceurs-fluorescents-in111/developpement-de-tests-immunochromatographiques-sur-bandelette-plus-sensibles-in111niv10002.html>
- [35] **DELSHADI S**. Tests de diagnostic immunologique rapides combinant des nanoparticules magnétiques et des micro-aimants structurés. Th D Chimie et science du vivant, Grenoble, 2017.
- [36] **MaClinique**. Un test d'immuno-détection magnétique d'anticorps SARS-CoV-2 [Internet] [cité 4 juin 2022]. Disponible sur: <https://ma-clinique.fr/un-test-dimmuno-detection-magnetique-danticorps-sars-cov-2>
- [37] **VIDAL**, Morphine : substance active à effet thérapeutique [Internet]. [cité 13 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/morphine-5636.html>

- [38] **VIDAL**, Ropivacaïne : substance active à effet thérapeutique [Internet]. [cité 13 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/ropivacaine-16989.html>
- [39] **Chlorhydrate de Morphine**, monographie n°0097, Pharmacopée Européenne 10<sup>ème</sup> édition. Strasbourg, France : Conseil de l'Europe ; 2019
- [40] **Chlorhydrate de Ropivacaïne**, monographie n°2335, Pharmacopée Européenne 10<sup>ème</sup> édition. Strasbourg, France : Conseil de l'Europe ; 2019
- [41] **CHIGURUPATI S, APPALA-NEMELA R, SELVARAJAN K, KHAW C, TEOH C, BATUMANATHAN L. et al.** LC Method Development and Validation for the Determination of Ropivacaine Hydrochloride in Bulk Drug and Pharmaceutical Formulations. Pharm. Chem. J., 2017, vol. 51, p. 1-10.
- [42] **FILAB**. Industrie Pharmaceutique : développement analytique en laboratoire [Internet]. [cité 24 avr 2022]. Disponible sur: <https://filab.fr/developpement-analytique-industrie-pharmaceutique/>
- [43] **VASSEUR S**. Etude de faisabilité : Méthode en 7 étapes + Modèle [Internet]. [cité 14 mai 2022]. Disponible sur: <https://blog-gestion-de-projet.com/etude-de-faisabilite/>
- [44] **EMA**. ICH guideline Q2 (R2) Validation analytical procedures step 2b [Internet]. [cité 14 mai 2022]. Disponible sur: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b_en.pdf)
- [45] **EMA**. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology [Internet] [cité 14 mai 2022]. Disponible sur : [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf)
- [46] **BIPM**. International vocabulary of metrology. Consulté le: 14 mai 2022 [En ligne]. Disponible sur : [https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM\\_200\\_2012.pdf/f0e1ad45-d337-bbeb-53a6-15fe649d0ff1](https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM_200_2012.pdf/f0e1ad45-d337-bbeb-53a6-15fe649d0ff1)
- [47] **HUBERT P, NGUYEN-HUU J, BOULANGER B, CHAPUZET E, CHIAP P, COHEN N, et al.** Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal – Part I. J Pharm Biomed Anal. 2007;45(1):70-81.



# Fiche signalétique

LACORE Cécile

Née le 13/12/1997 à Schiltigheim

TITRE DE LA THÈSE :

LE DÉVELOPPEMENT DE NOUVELLES MÉTHODES ANALYTIQUES RAPIDES

Date et lieu de la soutenance : 16/01/2023 à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

N° d'ordre : 2186

Résumé :

Le développement de nouvelles méthodes analytiques rapides est un domaine en constante évolution. Que ce soit pour avoir une meilleure réactivité sur le terrain et une résolution de problème efficace ou pour une question de coût, les laboratoires de contrôles n'hésitent pas à innover en ce qui concerne le développement des méthodes analytiques. Il intéresse un grand nombre de secteurs dont l'agroalimentaire, la microbiologie et le secteur de la santé.

Ce développement passe par plusieurs étapes que sont : la recherche bibliographique, le choix de la méthode analytique, l'étude de faisabilité, le développement et la mise au point de la méthode d'analyse et l'optimisation analytique.

Enfin la méthode nécessite une validation en respectant les normes en vigueur avant de pouvoir être utilisée en routine.

MOTS-CLEFS :

Développement, Méthodes, Analytiques,

Validation, Fidélité, Linéarité

Nom du directeur de thèse : MARCHIONI Eric