

Université Pierre et Marie Curie  
Paris 6

**MÉMOIRE**  
**POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE**  
**« ASSURANCE QUALITÉ AU LABORATOIRE**  
**DE BIOLOGIE MEDICALE »**

**VALIDATION DE MÉTHODE EN PORTÉE B ET ANALYSE DE RISQUE :**  
**MÉTHODE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE**  
**HAUTE PERFORMANCE (CLHP)**

-

**Exemple du dosage de la clozapine**

LANCELIN Frédérique  
Année 2012-2013

## **NOTE AU LECTEUR**

« Les mémoires des stagiaires du Diplôme Universitaire «Assurance Qualité au laboratoire de biologie médicale » sont des travaux réalisés pendant l'année de formation.

Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs.

Les travaux ne peuvent faire l'objet d'une publication en tout, ou partie, sans accord de l'auteur et du responsable du DU concerné ».

**Auteur :**

Docteur LANCELIN Frédérique

Pharmacien Praticien Hospitalier  
Laboratoire Central – secteur pharmacologie  
Centre hospitalier Sainte Anne  
1 rue Cabanis 75674 PARIS CEDEX

## **REMERCIEMENTS**

Je remercie toute l'équipe du laboratoire de pharmacologie, Catherine, Valérie et Patrick, pour leur participation active dans la réalisation de ce travail ; Ainsi que le Docteur Mélanie Pannetier pour me suppléer au laboratoire de pharmacologie.

Je remercie le Docteur Vaubourdolle et le Docteur Pernet, ainsi que tous les intervenants du DU pour la qualité de leurs enseignements.

---

## SOMMAIRE

---

<b>LES ABREVIATIONS</b> .....	6
<b>I- INTRODUCTION</b> .....	7
<b>II- CONTEXTE</b> .....	8
2-1 Présentation du CHSA.....	8
2-2 Présentation du laboratoire de biologie du CHSA .....	8
2-3 Démarche qualité.....	9
<b>III- ETAT DES LIEUX</b> .....	10
3-1 La problématique.....	10
3-2 Exigences normatives et recommandations COFRAC.....	10
<b>IV- PLAN D’ACTION</b> .....	12
4-1 Description du processus analytique.....	13
4-2 Matériel critique utilisé au laboratoire.....	13
4-3 Analyse de risque du processus analytique.....	14
4-4 Rédaction du mode opératoire de la validation de méthode en portée B .....	14
4-5 Validation de méthode du dosage de la clozapine sur le système CLHP Ultimate® 3000 (Dionex).....	15
<b>V- RESULTATS</b> .....	17
5-1 Processus analytique .....	17
5-2 Matériel critique .....	17
5-3 Analyse et maîtrise des risques identifiés .....	19
5-4 Mode opératoire de la validation de méthode en portée B.....	21
5-5 Validation du dosage quantitatif de la clozapine .....	22
<b>VI- SYNTHESE ET CONCLUSION</b> .....	27
<b>VII- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	28
<b>VIII- LISTE DES ANNEXES</b> .....	29

---

## ABREVIATIONS

---

<b>CHSA</b>	Centre Hospitalier Sainte-Anne
<b>COFRAC</b>	Comité français d'accréditation
<b>CEQ</b>	Contrôle externe de qualité
<b>CIQ</b>	Contrôle interne de qualité
<b>CLHP</b>	Chromatographie liquide haute performance
<b>CV</b>	Coefficient de variation
<b>EEQ</b>	Evaluation externe de la qualité
<b>EMEA</b>	European medicines agency
<b>ET</b>	Ecart-type
<b>FDA</b>	Food and drug administration
<b>FE</b>	Fiche d'enregistrement
<b>LBM</b>	Laboratoire de biologie médicale
<b>MO</b>	Mode opératoire
<b>Moy</b>	Moyenne
<b>ND</b>	Non détecté
<b>ODM</b>	O-déméthyl-
<b>OH</b>	hydroxy-
<b>RAQ</b>	Responsable assurance qualité
<b>SFBC</b>	Société française de biologie clinique
<b>SFTA</b>	Société française de toxicologie analytique

---

## I- INTRODUCTION

---

Selon la norme internationale NF EN ISO 15189 sur les exigences concernant la qualité et la compétence des laboratoires de biologie médicale, un laboratoire d'analyse médicale doit vérifier et/ou valider son processus analytique. Pour les méthodes conçues ou développées par le laboratoire, celui-ci doit procéder à la validation de ses méthodes en portée flexible étendue (B).

Dans notre laboratoire de pharmacologie, les dosages des médicaments psychotropes sont réalisés à partir de méthodes chromatographiques développées sur place.

La plupart de ces dosages ont été mis au point il y a plusieurs années, et la validation de méthode n'a pas été finalisée. Par ailleurs nous n'avons pas évalué les risques de notre processus analytique comme la norme l'exige. Et aucun document expliquant la validation des méthodes de dosage n'a été rédigé dans notre laboratoire.

L'objectif de ce travail est de déterminer la bonne démarche à suivre pour valider l'ensemble de nos méthodes de dosages en portée B. Un mode opératoire sera rédigé sur la validation des dosages de médicaments mis au point au laboratoire de pharmacologie du CHSA. Ce document servira de référence pour les validations de méthodes en cours et à venir.

Et enfin nous finaliserons ce travail par la validation du dosage de la clozapine qui a été réalisée au cours de l'année 2013 sur un nouveau système chromatographique couplé à un détecteur à barrette de diodes.

---

## II- CONTEXTE

---

### 2-1 Présentation du CHSA

Le centre hospitalier Sainte-Anne se situe au 1 rue Cabanis dans le 14<sup>ème</sup> arrondissement de Paris. C'est en 1863 que Napoléon III décide la création d'un hôpital psychiatrique à Paris sur l'emplacement de la ferme Sainte-Anne. Cet hôpital est désigné alors sous le nom d'asile psychiatrique. L'asile est inauguré le 1<sup>er</sup> janvier 1867 et le premier patient est admis le 1<sup>er</sup> mai de la même année. En 1952 se développe la neurochirurgie et c'est en 1974 que le service de neurologie est installé à l'hôpital Sainte-Anne. Aujourd'hui, le CHSA est un pôle de référence en psychiatrie et neurosciences. Les différents services sont organisés en pôle. Le pôle médico-technique regroupe les services suivants : le laboratoire de biologie, la pharmacie et le laboratoire d'anatomopathologie.

### 2-2 Présentation du laboratoire de biologie du CHSA

Organisation du laboratoire : le laboratoire central de l'hôpital Sainte-Anne est un laboratoire polyvalent ouvert 24h/24 et 7 jours/7. Il réalise des analyses de routine (biochimie, hémostase, hématologie, bactériologie, immuno-hématologie) et des analyses plus spécialisées comme les électrophorèses du LCR et les dosages des médicaments psychotropes. Ces derniers sont réalisés au niveau du secteur de pharmacologie dont je suis le biologiste référent.

#### Organisation du secteur de pharmacologie :

Le laboratoire de pharmacologie est situé hors du laboratoire central, dans le bâtiment d'anatomopathologie. Ce laboratoire est ouvert du lundi au vendredi de 8h 30 à 17h 10.

Entre 300 et 400 analyses (molécules mères et métabolites) sont réalisées par mois, ce qui représente une activité annuelle d'environ 1 million de B totaux (B + BHN).

Trois techniciens sont habilités pour l'activité de pharmacologie et deux biologistes valident les résultats des dosages (1 biologiste référent du secteur et 1 biologiste suppléant).

Au laboratoire de pharmacologie sont réalisés les dosages par CLHP des neuroleptiques, des antidépresseurs et des antiépileptiques. De nouvelles méthodes de dosages sont mises au point dans notre laboratoire à la demande des cliniciens pour doser les nouveaux psychotropes ou dans le cadre de protocoles de recherche.

Le laboratoire accueille des étudiants en pharmacie (master, 5<sup>ème</sup> année hospitalo-universitaire), des internes en biologie et des étudiants en BTS ou DUT.

Les étudiants participent à la mise au point des dosages et à la validation de méthode.

Plusieurs de nos méthodes de dosages ont été publiées dans des revues scientifiques<sup>1,2</sup>.

### **2-3 Démarche qualité**

Le laboratoire de biologie est accompagné dans sa démarche d'accréditation par BioQualité depuis le mois de mai 2010. La qualification BioQualité a été obtenue en février 2013.

Le responsable assurance qualité (RAQ) est un biologiste et deux référents qualité ont été désignés : la cadre supérieur du laboratoire et le technicien référent en métrologie.

---

## III- ETAT DES LIEUX

---

### 3-1 La problématique

Tous les dosages de médicaments psychotropes sont des techniques manuelles mises au point au laboratoire de pharmacologie du CHSA. Les réactifs utilisés pour ses dosages sont des réactifs « maisons ».

Actuellement, 53 molécules sont dosées au secteur de pharmacologie (annexe 1).

La plupart de ses dosages ont été validés partiellement. Les études de fidélité et les limites de quantification ont été effectuées pour l'ensemble de nos méthodes de dosages. Les autres paramètres de performance ont été évalués pour les méthodes les plus récentes mais restent incomplètes pour les autres.

La validation de méthode ne repose sur aucun document écrit (mode opératoire de validation de méthode en portée B non rédigé) ; de plus aucune analyse de risque du processus analytique n'a été réalisée.

### 3-2 Exigences normatives et recommandations du COFRAC

La norme internationale NF EN ISO 15189 sur les exigences concernant la qualité et la compétence des laboratoires de biologie médicale (version décembre 2012), contient un chapitre dédié au processus analytique (§ 5.5 Processus analytique).

La norme précise dans le chapitre § 5.5.1.3 dans quels cas le laboratoire doit valider ses procédures analytiques :

#### 5.5.1.3 Validation des procédures analytiques

Le laboratoire doit valider les procédures analytiques déduites des sources suivantes :

- a) les méthodes non normalisées ;
- b) les méthodes conçues ou développées par le laboratoire ;
- c) les méthodes normalisées utilisées en dehors de leur domaine d'application prévu ;
- d) les méthodes validées, puis modifiées.

La validation doit être aussi étendue que nécessaire et confirmer, par des preuves tangibles (sous la forme de caractéristiques de performances), que les exigences spécifiques pour l'utilisation prévue de l'examen ont été satisfaites.

D'autre part la norme indique que les laboratoires doivent étudier tous les risques potentiels ayant un impact sur le résultat :

#### 4.14.6 Gestion des risques

Le laboratoire doit évaluer l'impact des processus de travail et défaillances potentielles sur la sécurité des résultats des examens et doit modifier les processus pour réduire ou éliminer les risques identifiés, et documenter les décisions et actions menées.

Dans le « Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation » SH REF 02 rédigé par le COFRAC, un chapitre concerne les équipements critiques (§ 5.6.3 Traçabilité métrologique des résultats de mesure).

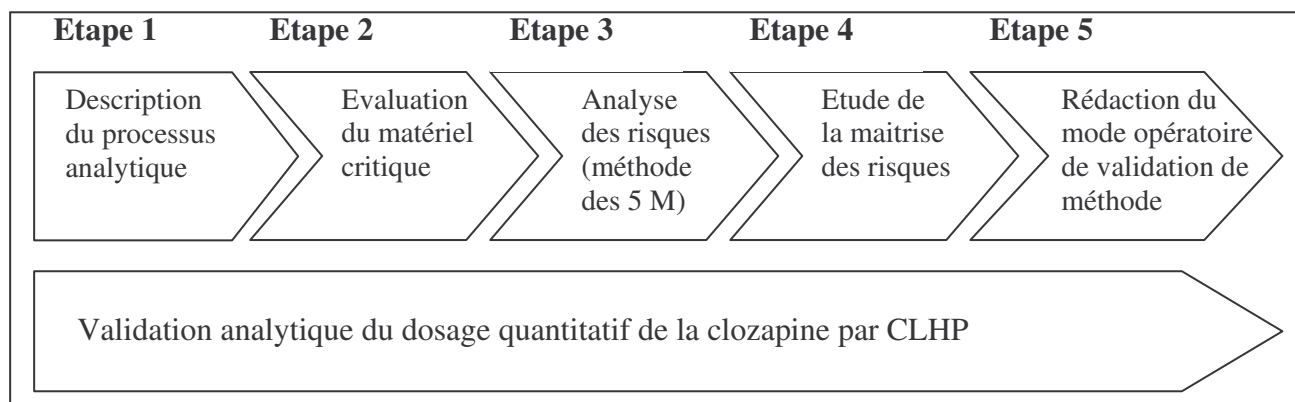
Le LBM identifie ses équipements critiques, c'est-à-dire **ayant une incidence significative sur l'exactitude et la fiabilité des résultats**, employés dans le cadre de la surveillance des conditions de réalisation des examens (ex: balances utilisées pour préparer un réactif, pipettes utilisées pour préparer une solution servant à un étalonnage, étuve intervenant dans une incubation, etc...). Il identifie ainsi les grandeurs mesurées correspondant (masse, volume, température, ...) ainsi que les exigences métrologiques spécifiées (tolérances et plages d'utilisation selon recommandations fournisseurs, bibliographie disponible ou expérience documentée, performances techniques, ...) et les types de raccordement métrologique employés.

Le programme d'étalonnage est établi afin de permettre aux résultats d'être traçables par rapport aux unités du système international où à une constante naturelle ou à une autre référence reconnue et de s'assurer ainsi de leur justesse. Il doit en particulier établir la périodicité des raccordements, en fonction d'une analyse bénéfice/risque, sachant que des contrôles intermédiaires sont mis en œuvre, si besoin.

## IV- PLAN D'ACTION

Le plan d'action s'est déroulé suivant les 5 étapes décrites dans la figure 1 :

**Figure 1 : Les différentes étapes du plan d'action.**



L'ensemble de ce travail a été mis à profit pour valider la méthode de dosage quantitatif de la clozapine par CLHP. Les résultats ont été rédigés à l'aide du SH Form 43 proposé par le COFRAC.

Une réunion d'information a eu lieu en début d'année pour informer le personnel de pharmacologie sur l'objectif et le déroulement de l'étude. Un calendrier prévisionnel a été présenté lors de cette première réunion (tableau I).

**Tableau I : Le calendrier prévisionnel.**

Quoi	Quand	Qui
Décrire chaque étape du <b>processus analytique</b> (logigramme)	Février 2013	Les techniciens de pharmacologie (C. Boyer, V. Olin, P. Tuis) Le biologiste référent (F. Lancelin)
Définir les <b>facteurs influençant le résultat</b> , le matériel critique	Mars 2013	Les techniciens de pharmacologie (C. Boyer, V. Olin, P. Tuis) Le biologiste référent (F. Lancelin)
Ces facteurs sont-ils <b>maîtrisés</b> ? Comment?	Avril, mai 2013	Le biologiste référent (F. Lancelin) Le RAQ (Y. Lemeille)

Comment est maîtrisé le <b>matériel critique</b> ? (maintenance?, par qui?, fréquence?...)	Avril, mai 2013	Le service biomédical (Mr Pons), le référent métrologie (L. Oresve)
Rédaction du <b>mode opératoire</b> de validation de méthode	Juin, juillet 2013	Le biologiste référent (F. Lancelin) Le RAQ (Y. Lemeille)

Remarque : départ au mois de mai 2013 du biologiste Y. Lemeille (RAQ). Non remplacé à ce jour.

#### 4-1 Description du processus analytique

Un processus est « un ensemble d'activités corrélées ou interactives qui transforment des éléments d'entrées en éléments de sorties » (Norme 15189 ; § 3.17)

Dans un premier temps, nous avons défini les limites de notre processus analytique en tenant compte des définitions des différents processus par la norme 15189. Celle-ci précise que le processus analytique se situe entre le processus préanalytique et post-analytique. La norme 15189 indique que le processus préanalytique finit « ... au début de l'analyse » (§ 3.15) et le post analytique « processus qui suivent l'analyse... » (§ 3.14).

Un groupe de travail a été mis en place avec l'ensemble des techniciens du secteur de pharmacologie et moi-même pour réfléchir sur les différentes étapes du processus analytique. Un document de travail a été mis à la disposition des membres du groupe. Ce document décrivait succinctement les étapes principales du déroulement du dosage des médicaments. Ce document a été complété et finalisé sous forme d'un schéma au cours de deux réunions qui se sont déroulées le 15 et 22 février 2013.

#### 4-2 Matériel critique utilisé au laboratoire

Dans un premier temps nous avons identifié notre matériel critique par rapport à leur utilisation au cours du processus analytique et de leur impact sur le résultat.

Dans un second temps, nous avons évalué si ces équipements de mesure sont maîtrisés métrologiquement (vérifications ?, raccordement métrologique ? etc...).

Nous nous sommes appuyés sur les recommandations de Dumontet et al. (2009)<sup>3</sup> pour évaluer notre matériel critique.

Par la suite une réunion a été organisée le 04 juin 2013 avec le directeur du service biomédical, le cadre supérieur (réfèrent qualité), le chef de service du laboratoire (responsable de la cellule qualité) et moi-même pour faire un état des lieux sur le suivi métrologique de notre équipement critique.

### **4-3 Analyse de risque du processus analytique**

Deux réunions ont été organisées avec les techniciens du secteur de pharmacologie et moi-même.

Lors d'une première réunion (07/03/2013), j'ai exposé l'intérêt de ce travail. Chacun d'entre nous devait réfléchir aux différents facteurs ayant une influence sur le résultat.

Lors d'une seconde réunion (18/04/2013) nous avons listé les causes de risque pour chaque étape du processus analytique. Ces causes ont été classées selon la méthode des 5 M (**m**ilieu, **m**atières, **m**éthodes, **m**atériel, **m**ain d'œuvre).

Une fois les facteurs de risques identifiés, nous avons étudié les modalités de maîtrise de ces risques.

### **4-4 Rédaction du mode opératoire de validation de méthode en portée B**

La rédaction du document de validation des performances d'une méthode s'est déroulée en 3 étapes selon les recommandations décrites par le COFRAC dans le guide SH GTA 04 § 9 :

- l'étude de documents bibliographiques ;
- la détermination des critères de performance pertinents à établir et le choix des limites d'acceptabilité correspondantes pour la méthode ;
- la réalisation des vérifications expérimentales selon la procédure établie par le LBM.

Ce MO a été rédigé à partir des recommandations du COFRAC, de sociétés savantes comme la SFBC et la SFTA et d'organisme comme la FDA et la EMEA.

## 4-5 Validation du dosage de la clozapine sur le système CLHP Ultimate<sup>®</sup> 3000 (Dionex)

La clozapine est un neuroleptique atypique prescrit chez les patients schizophrènes résistants à au moins deux autres traitements antipsychotiques.

Le dosage plasmatique de la clozapine est indiqué dans le suivi thérapeutique des patients (suivi d'observance, détection des surdosages, des interférences médicamenteuses...). Les concentrations de référence se situent entre 350 et 600 ng/ml (Perry et al. 1991)<sup>4</sup>.

Le prélèvement doit être réalisé au résiduel (juste avant la prochaine prise du médicament) et à l'état d'équilibre (environ 5 à 7 jours après un début de traitement ou un changement de posologie). Le sang veineux est collecté dans un tube hépariné sans gel. Le prélèvement doit être centrifugé dans les 4 heures. Le plasma est conservé à -20 °C jusqu'à réalisation du dosage.

Les échantillons sont préparés suivant un protocole d'extraction liquide-liquide (NaOH 2N, isopropanol et hexane).

Les dosages sont réalisés avec un étalon interne (le chlorohaldol) sur le système de chromatographie liquide Ultimate 3000 (Dionex-Thermo Scientific), acquis en février 2012.

Ce système chromatographique est composé (figure 2) :

- d'un passeur d'échantillon thermostaté,
- d'un four à colonne à effet Peltier,
- d'une pompe à gradient quaternaire avec dégazeur intégré,
- d'un détecteur à barrette de diodes DAD3000 RS.

Ce système CLHP est couplé à un logiciel de pilotage et de retraitement des données chromatographiques : Chroméléon (version 6.8).

La colonne utilisée est une colonne X Terra MS C18 (Waters<sup>®</sup>) ; et la phase mobile est un mélange d'acétonitrile (38%) et d'un tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05M (62%) ajusté à un pH de 6.25.

L'évaluation a été réalisée à partir d'échantillons « faits maison » (concentrations 10, 50, 200 et 500 ng/ml) et de CIQ fournis par Chromsystem (level I (cible fournisseur 147 ng/ml) et level II (cible fournisseur 747 ng/ml)). La limite de linéarité a été étudiée à partir d'un échantillon ayant une concentration élevée en clozapine (4000 ng/ml).

Les échantillons « faits maison » sont obtenus à partir d'un blanc (matrice biologique = sérum humain ou animal) dopés avec de la clozapine base provenant d'un étalon authentique et tracé, commercialisé par Sigma Aldrich®. La matière première de clozapine est livrée avec un certificat d'analyse mentionnant entre autre le numéro de lot, la pureté du produit et la date d'expiration (annexe 2).

La validation de cette méthode de dosage a été réalisée entre avril 2012 et août 2013 suivant les critères de performances recommandés par le COFRAC.

**Figure 2** : système chromatographique Ultimate® 3000



## V- RESULTATS

### 5-1 Processus analytique

Le dosage des médicaments par CLHP se déroule en trois phases principales :

- phase I : réalisation de la droite de calibration ;
- phase II : extraction liquide-liquide des échantillons ;
- phase III : traitement des données chromatographiques.

Toutes les étapes du processus analytique sont décrites dans la figure 3.

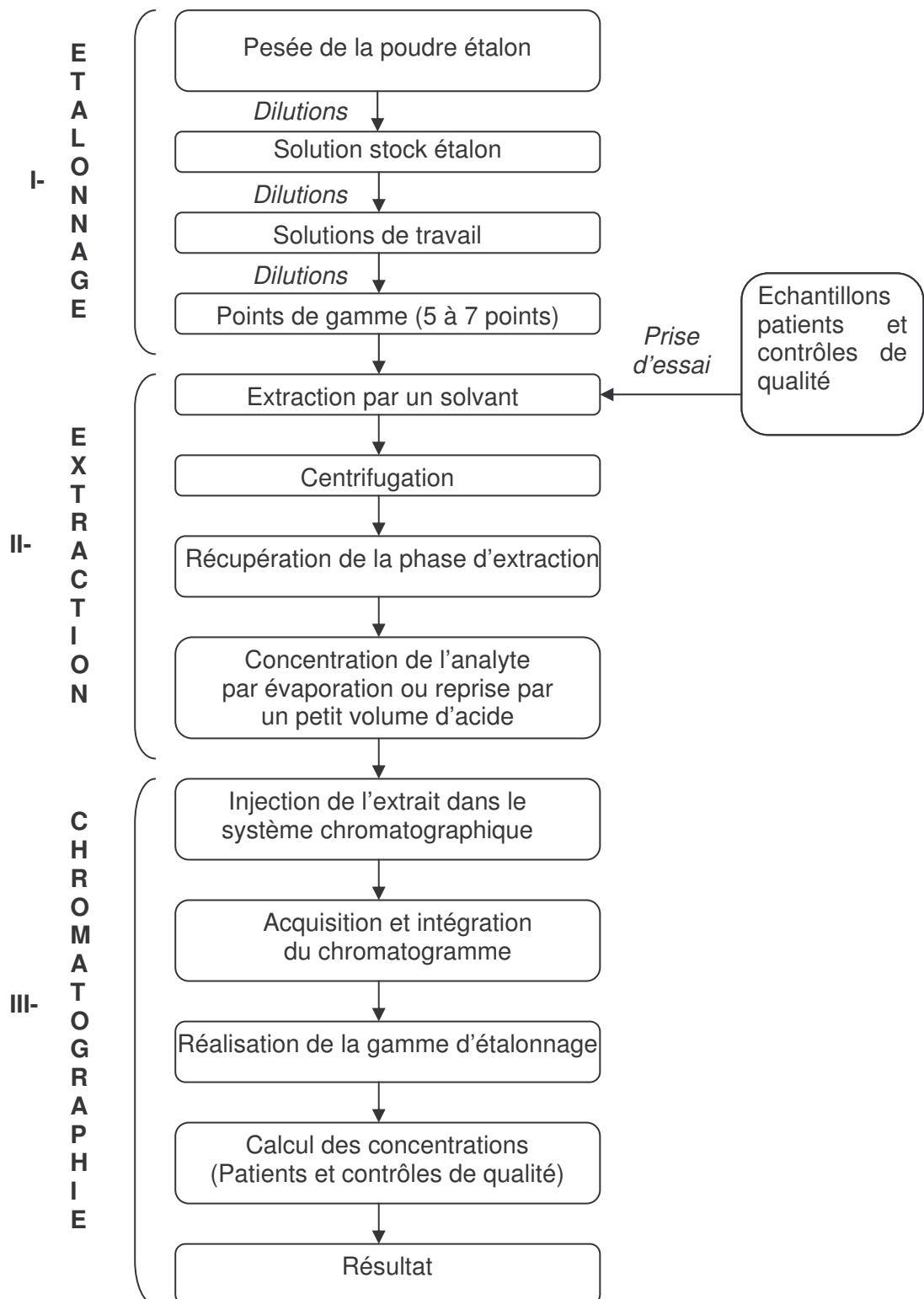
### 5-2 Matériel critique

Les équipements de mesure concernés sont les pipettes, la balance et la verrerie volumétrique. Nos équipements critiques sont listés dans le tableau II. Pour chaque type de matériel, nous avons détaillé leur utilisation (permettant d'argumenter leur criticité), leurs caractéristiques, et ce qui est réalisé en matière de suivi métrologique dans notre laboratoire.

**Tableau II : le matériel critique utilisé au laboratoire de pharmacologie**

MATERIEL CRITIQUE	UTILISATION	DESCRIPTION	SUIVI METROLOGIQUE
Pipettes fixes et réglables (Finnpipettes <sup>®</sup> , Socorex <sup>®</sup> )	- Préparation des solutions de travail ; - Préparation de la droite de calibration ; - Prises d'essai des échantillons patients et des CQ.	- Pipettes « Finnpipettes » ont été livrées neuves avec le certificat d'étalonnage ; - Pipettes « Socorex » récupérées d'un autre laboratoire (pas de certificat d'étalonnage)	- Contrôles en interne par le technicien référent en métrologie.
Balance (Ohaus Discovery)	- Pesée des poudres étalons ; - Vérification des pipettes en interne	- Balance de classe I classée en métrologie légale (étiquette verte) ; - Caractéristiques métrologiques répondant à la norme EN 45 501 ; - Balance livrée vérifiée - Poids de classe E2 pour les vérifications en interne (certificat d'étalonnage initial réalisé par un laboratoire d'étalonnage accrédité par le service d'accréditation Suisse (SAS))	- Contrôle réglementaire réalisé annuellement (apposition de l'étiquette verte) (société Biocordis) ; - Contrôle en interne de la balance avec un poids de classe E2 (doit être raccordé métrologiquement cette année (3 ans)).
Verrerie volumétrique : Pipettes jaugées à deux traits (Qualicolor <sup>®</sup> ) et fioles jaugées (Glassco <sup>®</sup> , Pyrex <sup>®</sup> )	- Préparation des solutions étalons stocks ; - Dilutions des solutions étalons ; - Reconstitution des CEQ, CIQ et standards	- Verrerie jaugée de classe A fournie avec un certificat de lot. - Gravure indélébile ; - Pipettes jaugées volume 2 ml (+/- 0.010) ; 5 ml (+/- 0.015 ml) ; - Fioles jaugées de 5 et 10 ml (+/- 0.025 ml) ; 20 et 25 ml (+/- 0.04 ml).	- Vérification visuelle (trait de jauge non effacé, absence d'ébréchure...)

**Figure 3 : description du processus analytique**



### 5-3 Analyse et maîtrise des risques identifiés

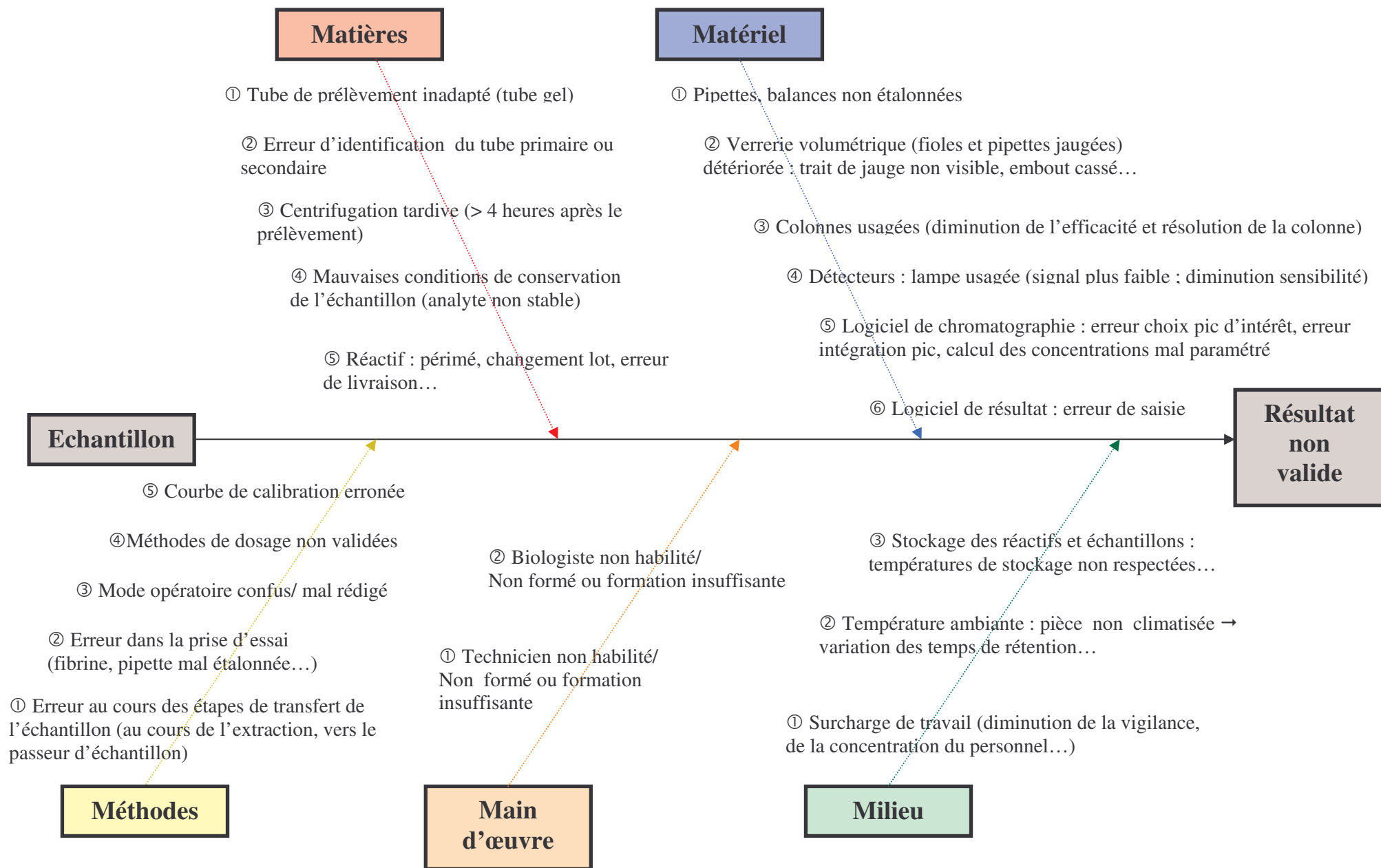
L'ensemble des risques identifiés apparaît dans le diagramme d'Ishikawa (figure 4).

Pour chaque défaillance du processus analytique, nous avons évalué les modalités de maîtrise de ces risques dans notre laboratoire et les actions préventives à améliorer pour être en conformité avec les exigences normatives (tableau III).

**Tableau III : maîtrise des risques au cours du processus analytique.**

Étape du processus analytique	Description des défaillances	Les Causes de défaillances	Actions de prévention (prévues)	Actions d'amélioration (à prévoir)
Construction de la courbe de calibration	Courbe de calibration erronée (erreur de pesée, erreur de dilution du matériel d'étalonnage)	Mauvaise utilisation de la balance	MO utilisation de la balance (OPC-LABO-MO 407) Guide utilisateur en français	/
		Balance non juste	Vérification en interne de la balance avec un poids de classe E2 avant chaque pesée (OPC-LABO-MO 407)	Faire un raccordement métrologique annuel + vérification de la balance par un prestataire accrédité sur site.
		Pipettes non justes	Contrôle volumétrique des pipettes par le technicien référent en métrologie (OPC-LABO-MO 246) + fiche de suivi (OPC-LABO-FE 18)	Faire un raccordement métrologique annuel + vérification des pipettes par un prestataire accrédité (contrat de location en discussion avec le service biomédical).
Dosage des échantillons	Protocole de dosage non respecté, confus; Méthode de dosage non validée, non adaptée	Formation insuffisante du personnel technique	Habilitation du personnel technique en pharmacologie (OPC-LABO-FE 50 tech.)	/
		Absence de mode opératoire ; Mode opératoire mal rédigé ; Pas de mise à jour.	MO pour chaque dosage. Mise à jour tous les deux ans des documents qualifiés (QPR-LABO-PRO 02)	/
		Absence de MO de validation de méthode	Le MO de validation des méthodes mises au point en pharmacologie OPC-LABO-MO 357 est en cours de rédaction	
		Absence d'EEQ	Programme d'EEQ pour 66% des molécules dosées par CLHP	Organiser des contrôles inter-laboratoires pour les autres molécules
Détection	Analyte mal ou non détecté	Dysfonctionnement du détecteur	Fiche de vie des détecteurs ; Changement de la lampe défectueuse.	Rédiger un MO pour le changement des lampes des détecteurs UV et fluorimétriques.
		Colonne usagée (diminution de l'efficacité et de la résolution)	Fiche de suivi des colonnes ; Changement de la colonne défectueuse.	Rédiger un mode opératoire expliquant la démarche à suivre pour changer une colonne.
Traitement des données chromatographiques	Calcul des concentrations erroné ;	Erreur paramétrage des logiciels d'acquisition et d'intégration des chromatogrammes	MO du paramétrage des logiciels : OPC-LABO-MO 252 (Empower) ; OPC-LABO-MO 254 (Chroméléon) ; OPC-LABO-MO 343 (AZUR).	Sécuriser le paramétrage par des codes d'accès ; Vérifier l'intégrité du paramétrage des logiciels de chromatographie.
		Interprétation du chromatogramme erronée (choix des pics d'intérêt, forme des pics...)	Habilitation du personnel médical en pharmacologie (OPC-LABO-FE 50 bio.) ; Document d'aide à la validation technique et biologique des dosages de médicaments (OPC-LABO-MO 380)	/
Validation technique	Validation à tort de la droite d'étalonnage	Absence de CIQ	Un CIQ est passé dans chaque série de dosage	/
		Interprétation du CIQ erronée	Suivi des CIQ sur fichier excel ; Fourchettes d'acceptation du CIQ (concentrations cibles du fournisseur)	Rédiger une procédure sur la conduite à tenir par rapport aux résultats des CIQ

**Figure 4 : Diagramme d'ISHIKAWA : analyse de risque pour le dosage des psychotropes**



## 5-4 Mode opératoire de la validation de méthode en portée B

Ce mode opératoire (annexe 3) explique comment sont évalués les différents critères de performances exigés par la norme ISO 15189 pour valider une méthode de dosage en portée B. Ce MO est codifié OPC-LABO-MO 357 et il est intitulé « Validation en portée B d'une méthode de dosage mise au point au laboratoire de pharmacologie ».

Les documents supports utilisés pour rédiger le MO:

- SH GTA 01 (Guide technique d'accréditation en biologie médicale)
- SH GTA 04 (Guide technique d'accréditation de vérification/validation des méthodes en biologie médicale) ; TABLEAU pour portée B
- SH GTA 14 (Incertitudes de mesures) ;
- SH GTA 06 (Contrôle de qualité) ;
- Les recommandations de la SFBC<sup>5, 6</sup> et de la SFTA<sup>7</sup> ;
- Les recommandations de la EMEA<sup>8</sup> et FDA<sup>9</sup>.

Les critères de performances que nous avons sélectionnés pour valider nos méthodes sont :

- La sélectivité (analyse d'un blanc du spécimen) ;
- La fidélité : la répétabilité et la fidélité intermédiaire ;
- La justesse ;
- L'exactitude de mesure ;
- L'incertitude de mesure ;
- L'intervalle de mesure : la limite de quantification et la limite supérieure de linéarité ;
- La contamination entre échantillon ;
- Les interférences (médicaments) ;
- La comparaison avec une méthode déjà utilisée au LBM.

Tous ces critères ont été définis dans le mode opératoire.

Parmi les paramètres à vérifier, nous n'avons pas choisi d'étudier la limite de détection. Celle-ci n'étant pas utilisée pour le rendu du résultat. Dans le cas où l'analyte n'est pas détecté, le résultat est rendu inférieur à la limite de quantification.

Les limites d'acceptabilité choisies sont celles recommandées par les sociétés savantes (SFTA) et les guides rédigés par la FDA et EMEA. Les CV% pour la fidélité, le biais (justesse et exactitude) sont satisfaisants s'ils sont :  $\leq 20\%$  pour la limite de quantification,  $\leq 15\%$  pour les autres concentrations.

La réalisation des vérifications expérimentales repose sur les recommandations de la FDA et EMEA.

## 5-5 Validation du dosage quantitatif de la clozapinémie

### 5-5-1 La sélectivité

Le chromatogramme d'un échantillon « blanc » (sérum humain « drug free ») ne montre pas de pic d'interférence au niveau des temps de rétention de la clozapine et de l'étalon interne (annexe 4).

### 5-5-2 La fidélité de mesure

- La répétabilité :

Dates	18/04/2012	29/04/2013	30/04/2013	29/10/2012
CLOZAPINE	<b>Point 10 ng/mL</b>	<b>Point 50 ng/ml</b>	<b>Point 200 ng/ml</b>	<b>Point 500 ng/ml</b>
	10,2	45,0	197	468
	10,1	43,1	186,4	449
	8,8	43,0	191,3	520
	9,3	47,3	184,3	485
	8,8	45,4	188,1	463
	9,4	42,4	200,3	456
	9,2	46,3	187,5	487
	9,3	44,0	195,7	462
	10,4	45,2	208,4	469
	9,6	41,6	188,5	427
<b>Moy (ng/mL)</b>	<b>9,51</b>	<b>44,33</b>	<b>192,75</b>	<b>468,60</b>
<b>ET (ng/mL)</b>	0,56	1,81	7,53	24,94
<b>CV (%)</b>	<b>5,90</b>	<b>4,09</b>	<b>3,90</b>	<b>5,32</b>

- La fidélité intermédiaire :

	<b>Point 10 ng/ml</b>	<b>Points 50 ng/ml</b>	<b>Level I</b>	<b>Level II</b>
	9,2	47,7	149	828
	10,0	42,5	176	714
	9,8	50,8	148	668
	9,5	49,2	152	670
	9,5	43,9	146	676
	9,5	41,9	135	640
	9,8	43,7	136	629
	9,2	45,4	122	733
	7,7	39,9	128	715
	7,9	41,2	130	781

<b>Moy (ng/mL)</b>	<b>9,21</b>	<b>44,62</b>	<b>143,56</b>	<b>705,40</b>
<b>ET (ng/mL)</b>	0,68	3,60	15,88	62,63
<b>CV (%)</b>	<b>7,35</b>	<b>8,06</b>	<b>11,06</b>	<b>8,88</b>

### 5-5-3 la justesse

	Level I	Level II
<b>Valeur cible</b>	147,00	747,00
<b>Moyenne</b>	143,56	705,40
<b>Biais (%)</b>	<b>-2,3%</b>	<b>-5,6%</b>

5-5-4 L'exactitude de mesure : résultats obtenus lors de l'évaluation externe de la qualité :

Date de l'EEQ	Nombre de participants	Valeur mesurée	Moyenne générale toute technique (CLHP/LC-MS-MS)	Biais en %/moyenne générale
03/2012	72	141.0	122.9	+14.7
04/2012	81	61.8	68.7	-10.0
05/2012	78	<10	/	/
06/2012	83	154.5	147.6	+4.7
07/2012	85	542.7	551.9	-1.7
08/2012	82	294.0	290.6	+1.2
09/2012	82	102.1	101.8	+0.3
10/2012	84	1213.8	1216.6	-0.2
11/2012	88	199.4	194.8	+2.4
12/2012	84	382.6	377.4	+1.4
01/2013	80	780.0	790.4	-1.3
02/2013	73	95.3	97.4	-2.2
03/2013	74	274.9	266.6	+3.1
04/2013	76	1194.9	1100.8	+8.5
05/2013	79	60.3	70.1	-13.9
06/2013	78	28.5	32.4	-12.0
07/2013	82	116.4	121.4	-4.4

### 5-5-5 L'incertitude de mesure

Elle a été évaluée pour 3 concentrations différentes de clozapinémie :

- un niveau bas : 44.6 +/- 7.0 ng/ml ;
- un niveau moyen : 143,6 +/- 16.0 ng/ml ;
- un niveau haut : 705,4 +/- 18.4 ng/ml.

### 5-5-6 Les interférences

Nous avons recherché, parmi les molécules médicamenteuses les plus fréquemment associées au traitement par la clozapine, celles qui sont susceptibles d'interférer avec le dosage de la clozapine. Dans le tableau ci-dessous nous avons indiqué la concentration et le temps de rétention pour chaque molécule testée.

<b>Molécules testées</b>	<b>Concentrations testées</b>	<b>Temps de rétention (minutes)</b>
cyamémazine	500 ng/ml	9.13
chlorpromazine	500 ng/ml	13.0
loxapine	500 ng/ml	10.4
halopéridol	100 ng/ml	6.7
olanzapine	98.2 ng/ml	ND
risperidone	500 ng/ml	3.7
9-OH risperidone	500 ng/ml	ND
aripiprazole	500 ng/ml	16.8
amisulpride	500 ng/ml	ND
quétiapine	500 ng/ml	7.2
norquétiapine	500 ng/ml	4.8
miansérine	500 ng/ml	8.5
paroxétine	500 ng/ml	7.3
fluoxétine	500 ng/ml	11.8
escitalopram	500 ng/ml	5.5
venlafaxine	500 ng/ml	ND
ODM venlafaxine	500 ng/ml	ND
duloxétine	500 ng/ml	9.0
diazépam	500 ng/ml	25.0
oxazépam	500 ng/ml	ND
lorazépam	500 ng/ml	ND
prazépam	500 ng/ml	ND
lamotrigine	20 µg/ml	4.9

Les temps de rétention des molécules ont été comparés à ceux de la clozapine et de l'étalon interne qui sont de 6.2 minutes et de 9.7 minutes respectivement.

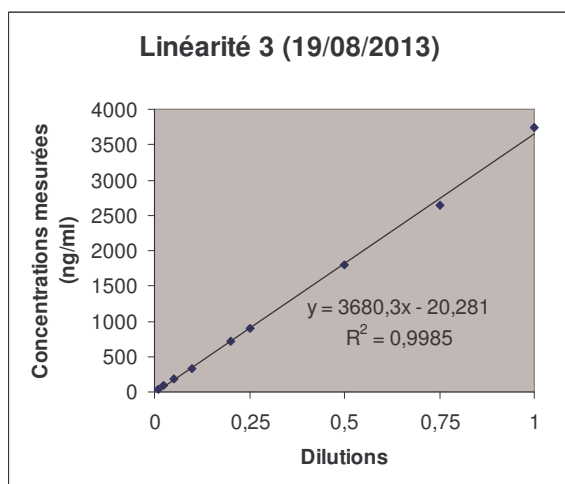
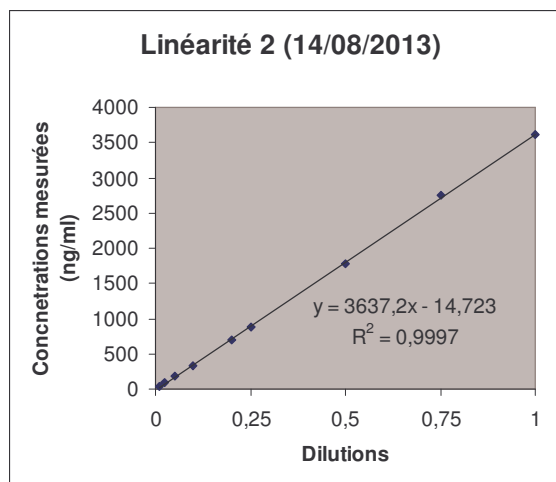
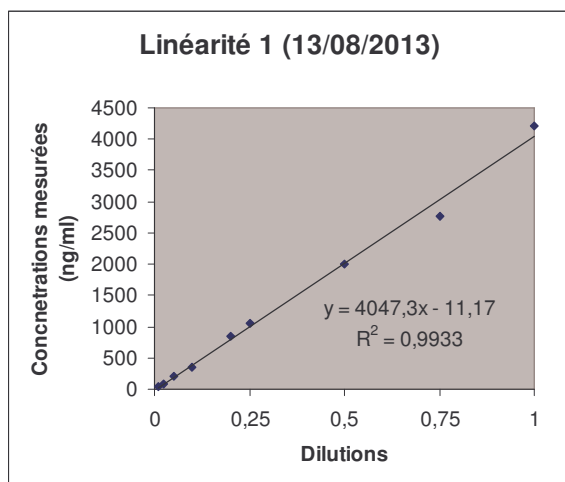
Aucune des molécules testées n'interfère avec le dosage de la clozapine.

#### 5-5-7 Le domaine de mesure

- La limite de quantification : 10 ng/ml.

Il s'agit de la plus petite concentration étudiée pour laquelle le CV de la fidélité intermédiaire est inférieur à 20% (CV = 7,35%).

- La limite de linéarité : elle a été évaluée sur trois jours différents avec des droites de calibrations différentes. La limite supérieure de linéarité se situe à 4000 ng/ml.



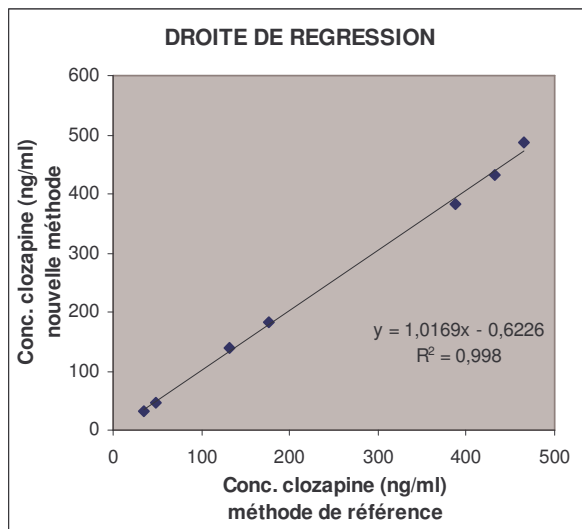
#### 5-5-8 La comparaison de méthode

Elle a été évaluée à partir d'un petit nombre d'échantillons de patients (n = 7).

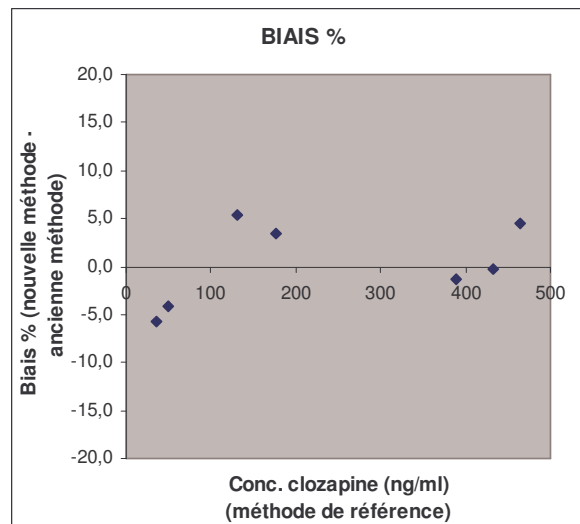
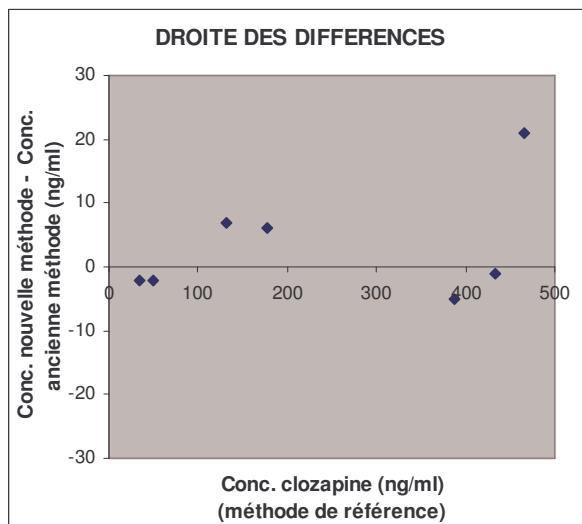
Nous avons analysé en simple les échantillons sur les deux systèmes chromatographiques en simultanément: ancienne méthode (chaîne couplée au détecteur UV Shimadzu SPD-6AV) versus nouvelle méthode (chaîne chromatographique Ultimate® 3000). Les résultats des concentrations plasmatiques de la clozapine obtenus avec la méthode de référence (X) et la méthode testée (Y) sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Valeurs X (ng/ml)	Valeurs Y (ng/ml)	Y-X (ng/ml)	Biais % (Y-X)/X * 100
Patient 1	35	33	-2	-5.7
Patient 2	388	383	-5	-1.3
Patient 3	177	183	6	3.4
Patient 4	131	138	7	5.3
Patient 5	433	432	-1	-0.2
Patient 6	49	47	-2	-4.1
Patient 7	465	486	21	4.5

Nous avons tracé la droite de régression suivante :



Et les droites des différences (ng/ml) et des biais exprimé en % :



Remarque : tous les résultats de la validation des performances du dosage quantitatif de la clozapine sont résumés et interprétés dans le formulaire SH FORM 43 (annexe 5) proposé par le COFRAC.

---

## VI- SYNTHÈSE ET CONCLUSION

---

Rappel sur les objectifs de ce mémoire :

- Description du processus analytique ;
- Analyse et maîtrise des risques ;
- Rédaction d'un document pour la validation de méthode en portée B ;
- Validation du dosage quantitatif de la clozapine.

Le planning des actions à mener a été relativement bien respecté et ceci grâce à une équipe de techniciens motivés et fortement impliqués dans la démarche qualité au sein du laboratoire de pharmacologie.

L'analyse de risque des différentes étapes de notre processus analytique, nous a permis d'établir la liste des défaillances susceptibles d'influencer le résultat et d'évaluer les modalités de maîtrise de ces défaillances. Cette étude de risque nous a conduits à lister toutes les actions à mener pour être en conformité avec la norme. L'action que nous devons mener en priorité est le suivi métrologique de notre matériel critique. Un réel travail doit être réalisé en collaboration avec le service biomédicale pour la mise en place d'un programme d'étalonnage et de vérification des pipettes et de la balance pour l'année 2014.

Le mode opératoire de validation de méthodes a été rédigé suivant les recommandations du COFRAC et des sociétés savantes. Il décrit les principaux critères de qualité que nous devons vérifier pour valider nos méthodes de dosages. La stabilité des réactifs et la robustesse, qui sont également des paramètres à évaluer lors d'une validation de méthode en portée B, n'ont pas pu être étudiés dans le cadre du D.U. faute de temps. L'évaluation de ces deux paramètres est prévue dans les mois à venir.

En conclusion, l'ensemble du travail réalisé dans le cadre de ce D.U. a été une réelle avancée pour notre démarche qualité au laboratoire. Il pourra être transposé aux autres méthodes de dosage développées au laboratoire de pharmacologie.

---

## VII- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 1- Lancelin F. et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatography method using diode array detection for the simultaneous quantification of aripiprazole and dehydro-aripiprazole in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 867: 15-19.
- 2- Lancelin F. et al. Therapeutic drug monitoring of levetiracetam by high-performance liquid chromatography with photodiode array ultraviolet detection: preliminary observations on correlation between plasma concentration and clinical response in patients with refractory epilepsy. *Ther Drug Monit* 2007 ; 29 (5) : 576-583.
- 3- Dumontet M. et al. Recommandations pour la maîtrise métrologique des équipements de mesure au laboratoire d'analyses de biologie médicale (Document D). *Ann Biol Clin* 2009 ; 67 (4) : 465-76.
- 4- Perry P.J. et al. Clozapine and norclozapine plasma concentrations and clinical response of treatment-refractory schizophrenic patients. *Am. J. Psychiatry* 1991; 148 : 231-235.
- 5- Vassault A. et al. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. *Ann Biol Clin* 1999 ; 57 (6) : 685-95.
- 6- Giroud C. et al. Recommandations relatives à l'expression de l'incertitude de mesure des résultats quantitatifs en biologie médicale (document F). *Ann Biol Clin* 2007 ; 65 (2) : 185-200.
- 7- Aide à la validation des méthodes en pharmacologie et suivi thérapeutique pharmacologique. Groupe de travail « accréditation » de la SFTA. *Annales de toxicologie analytique* 2005 ; 17 (3) suppl. 1 : 1-20.
- 8- Guideline on bioanalytical method validation. EMEA 21 July 2011.
- 9- Guidance for industry: bioanalytical method validation. U.S. department of health and human services. FDA May 2001.

---

## VIII- LISTE DES ANNEXES

---

- Annexe I** Liste des médicaments dosés au CHSA.
- Annexe II** Certificat d'analyse de la clozapine étalon.
- Annexe III** Mode opératoire sur la validation de méthode en portée B.
- Annexe IV** Chromatogrammes obtenus à partir d'un « blanc » et d'un point de gamme (50 ng/ml de clozapine).
- Annexe V** SH FORM 43 : dosage quantitatif de la clozapine plasmatique.

# **ANNEXE-I**

**Liste des molécules dosées au laboratoire du CH Sainte-Anne  
Neuro Psycho Pharmacologie**

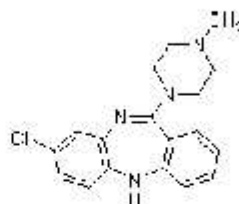
<b>DCI (+ métabolite)</b>	<b>Spécialité</b>	<b>Détection</b>
Amisulpride	SOLIAN*	Electrochimie
Amitriptyline + nortriptyline	LAROXYL*	UV
Amoxapine	DEFANYL*	UV
Aripiprazole + déhydro-aripiprazole	ABILIFY*	UV-barrette de diodes
Chlorpromazine	LARGACTIL*	Electrochimie
Citalopram	SEROPRAM*	Fluorimétrie
Clomipramine + desmethylclomipramine	ANAFRANIL*	UV
Clozapine + norclozapine	LEPONEX*	UV
Cyamémazine	TERCIAN*	Electrochimie
Desipramine	PERTOFRAN*	UV
Dosulépine	PROTHIADEN*	UV
Duloxétine	CYMBALTA*	UV-barrette de diodes
Escitalopram + desmethylescitalopram	SEROPLEX*	Fluorimétrie
Fluvoxamine	FLOXIFRAL*	UV
Fluoxétine + norfluoxétine	PROZAC*	UV
Flupentixol	FLUANXOL*	Electrochimie
Fluphénazine	MODITEN*	Electrochimie
Halopéridol + OH halopéridol	HALDOL*	UV-barrette de diodes
Imipramine + désipramine	TOFRANIL*	UV
Lamotrigine	LAMICTAL*	UV
Lévétiracétam	KEPPRA	UV-barrette de diodes
Lévomepromazine	NOZINAN*	Electrochimie
Loxapine + amoxapine	LOXAPAC*	UV
Maprotiline + desméthylmaprotiline	LUDIOMIL*	UV
Miansérine + desméthylmiansérine	ATHYMIL*	UV
Mirtazapine + desméthylmirtazapine	NORSET*	Fluorimétrie
Olanzapine	ZYPREXA*	UV-barrette de diodes
Olanzapine	ZYPADHERA	UV-barrette de diodes
Oxcarbapazine	TRILEPTAL	UV
Paroxétine	DEROXAT*	UV
Pipotiazine	PIPORTIL*	Electrochimie
Propériciazine	NEULEPTIL*	Electrochimie
Quetiapine + Norquétiapine	XEROQUEL	UV-barrette de diodes
Rispéridone + 9-OH risperidone	RISPERDAL*	UV-barrette de diodes
Sertraline	ZOLOFT*	UV
Trimipramine	SURMONTIL*	UV
Venlafaxine + O desméthylvenlafaxine	EFFEXOR*	Fluorimétrie
Zuclopenthixol	CLOPIXOL*	UV

# **ANNEXE-II**

**Certificate of Analysis**

Product Name:  
 Clozapine

Product Number: C6305  
 Batch Number: 010K1206  
 Brand: SIGMA  
 CAS Number: 5785-21-0  
 MDL Number: MFCD00153785  
 Formula: C18H19ClN4  
 Formula Weight: 326.82 g/mol  
 Quality Release Date: 25 JAN 2000  
 Date Retested: 17 JAN 2013  
 Recommended Retest Date: JAN 2015




Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Light Yellow to Very Dark Yellow and Light Brown to Very Dark Brown	Yellow
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Green-Yellow	Green-Yellow
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
10 mg/mL in MeOH		
Carbon (anhydrous)	65.6 - 66.7 %	66.1 %
Nitrogen (anhydrous)	16.6 - 17.7 %	17.2 %
Purity (TLC)	> 98 %	99 %
Water (by Karl Fischer)	< 5 %	0 %
Proton NMR Spectrum	Conforms to Structure	Conforms

Rodney Burbach, Manager  
 Analytical Services  
 St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

# **ANNEXE-III**

	MODE OPERATOIRE	OPC-LABO-MO 357
	<b>Validation en portée B d'une méthode de dosage mise au point au laboratoire de pharmacologie</b>	Secteur pharmacologie 1/4 Version 1 Date de diffusion : jj/mm/aaaa

Date de création : 06/08/2013	Date de mise à jour : 06/08/2013
Date de validation : jj/aa/aaaa	
Groupe de travail : BOYER Catherine (technicienne); OLIN Valérie (technicienne); TUIS Patrick (technicien); LANCELIN Frédérique (biologiste).	

<b>Rédaction</b>	<b>Validation</b>	<b>Vérification</b>
Dr Frédérique LANCELIN Biologiste	Dr Philippe NIEL Chef de service Laboratoire central de Biologie	Mme Edith MOUCHET Réfèrent qualité

<b>Personnel concerné</b>	<b>Lieux de diffusion</b>
• Personnel médical et médico technique	• Classeur Qualité secteur pharmacologie

### 1 Objet et domaine d'application

Ce document qualité est destiné à expliquer la validation analytique d'une méthode de dosage par chromatographie liquide mise au point au laboratoire de pharmacologie.

### 2 Définitions

Les termes utilisés sont définis dans la procédure QPR-QUAL-PRO 02 – Rédaction et gestion d'un document qualité.

### 3 Documents de référence

- Guide de validation des méthodes en biologie médicale (LAB GTA 04) ; COFRAC
- Guidance for industry: Bioanalytical methods validation. U.S. Department of health and human services. Food and Drug administration. May 2001.
- Guideline on bioanalytical method validation. Committee for medicinal products for human use. European Medicines Agency. July 2011.
- Aide à la validation des méthodes en toxicologie et suivi thérapeutique pharmacologique. Annales de toxicologie analytique, vol. XVII, n°3, suppl.1, 2005.

### 4 Description du mode opératoire

#### 4.1 Spécimens

La validation analytique est réalisée à partir de contrôles de qualité de concentration connue fournis par une société extérieure (Chromsystem, LGC Standard). Si l'analyte ou la concentration à tester n'existe pas sous forme de contrôle de qualité, des échantillons seront préparés au laboratoire en ajoutant une quantité connue de l'analyte (poudre étalon) à un blanc (sérum « drug free »). Les poudres étalons sont fournies gracieusement par le laboratoire commercialisant le médicament ou acheté auprès de la société Sigma-Aldrich. Chaque poudre étalon est accompagnée d'un certificat précisant : la pureté, la masse moléculaire, la date d'expiration, le numéro de lot et les conditions de conservation).

#### 4.2 La sélectivité (définition : capacité d'une méthode analytique à différencier et quantifier l'analyte en présence d'autres composés de l'échantillon)

Des blancs du spécimen seront analysés en l'absence de l'analyte et de l'étalon interne.

Deux blancs (matrice sérique) sont disponibles au laboratoire :

- Seronorm™ (drug-free) d'origine animal (fournisseur: Ingen) ;
- Lyphochek® human drug-free serum (fournisseur: Biorad).


Tester en priorité le Seronorm™ qui est le moins coûteux.

Vérifier sur le chromatogramme l'absence de pic interférant aux temps de rétention des molécules d'intérêt.

#### 4.3 La fidélité de mesure (définition : qualité de l'accord entre des mesures répétées du même spécimen dans des conditions précisées)

##### 4.3.1 La répétabilité

Elle est évaluée à partir d'au moins 3 concentrations différentes (basse, moyenne et haute), mesurées 10 fois dans une même série, par le même opérateur, à partir de la même courbe de calibration.

	MODE OPERATOIRE	OPC-LABO-MO 357
	<b>Validation en portée B d'une méthode de dosage mise au point au laboratoire de pharmacologie</b>	Secteur pharmacologie 2/4 Version 1 Date de diffusion : jj/mm/aaaa

#### 4.3.2 La fidélité intermédiaire

Elle est évaluée à partir d'au moins 3 concentrations différentes (basse, moyenne et haute), mesurées 10 fois dans au moins 5 séries différentes (soit sur au moins 5 jours différents), par des opérateurs différents, des courbes de calibration différentes, sur des systèmes chromatographiques différents (quand cela est possible).

La précision est estimée par le coefficient de variation : CV%

$$CV \% = \frac{\text{Ecart-type}}{\text{moyenne}} \times 100$$

La fidélité est satisfaisante lorsque le CV% est  $\leq 20\%$  pour la limite de quantification et  $\leq 15\%$  pour les autres concentrations.

#### 4.4 La justesse (définition : qualité de l'accord entre la moyenne d'une série de mesure et la valeur « vraie »)

Elle est évaluée à partir des CIQ.

La moyenne obtenue avec l'évaluation de la fidélité intermédiaire est comparée à la valeur « vraie ».

Dans la mesure où les CIQ ne sont pas externalisés, la valeur « vraie » sera la valeur cible du fournisseur.

La justesse est quantifiée par le biais :

$$\text{biais en \%} = \frac{m - v}{v} \times 100$$

m = moyenne de la fidélité intermédiaire

v = valeur cible

La justesse est satisfaisante lorsque le biais est  $\leq 20\%$  pour la limite de quantification et  $\leq 15\%$  pour les autres concentrations.

#### 4.5 L'exactitude de mesure (définition : qualité de l'accord entre la valeur observée et la valeur « vraie »)

Elle est évaluée à partir de l'EEQ.

La concentration mesurée par le laboratoire (x) est comparée à la moyenne obtenue par l'ensemble des participants (v).

$$\text{inexactitude en \%} = \frac{x - v}{v} \times 100$$

Le résultat du laboratoire sera considéré comme satisfaisant lorsque l'inexactitude sera  $\leq 20\%$  pour la limite de quantification et  $\leq 15\%$  pour les autres concentrations.

#### 4.6 L'incertitude de mesure (définition : paramètre qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande, à partir des informations utilisées)

Le mode de calcul de l'incertitude de mesure utilise les résultats des CIQ et de l'EEQ :


$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2}$$

$u_1 = S_{\text{repro}}$  (écart type de la fidélité intermédiaire)

$u_2 = \text{biais}/\sqrt{3}$  (écart moyen entre la valeur laboratoire et la moyenne générale de l'EEQ)

L'incertitude élargie U est calculée selon la formule suivante :  $U = 2 \cdot u_c$

Le résultat sera exprimé par la valeur mesurée +/- U (unité)

	MODE OPERATOIRE	OPC-LABO-MO 357
	<b>Validation en portée B d'une méthode de dosage mise au point au laboratoire de pharmacologie</b>	Secteur pharmacologie 3/4 Version 1 Date de diffusion : jj/mm/aaaa

#### 4.7 Evaluation du domaine de mesure

##### 4.7.1 La limite de quantification (définition : c'est la plus petite concentration mesurée rendue avec un niveau de confiance acceptable et d'incertitude connue)

À partir d'un échantillon de faible concentration (des blancs (serum drug-free) surchargés avec une faible quantité d'analyte ou dilution d'un CIQ), évaluer la fidélité intermédiaire (voir § 4.3.2).

**La limite de quantification sera la plus petite concentration pour laquelle le CV% est ≤ 20%.**

##### 4.7.2 La limite de linéarité (définition : limite de validité de la relation linéaire existant entre les concentrations observées et les concentrations théoriques des dilutions d'un spécimen)

La limite supérieure de linéarité sera déterminée à partir de la dilution d'un échantillon de concentration très élevée. Les dilutions suivantes seront réalisées à partir de cet échantillon :

Dilution de l'échantillon	Volume en µl de l'échantillon	Volume en µl de sérum « drug-free »
Pur	1000	0
3/4	750	250
1/2	500	500
1/4	250	750
1/5	200	800
1/10	100	900
1/20	50	950
1/40	25	975
1/100	10	990

Puis tracer le graphe : les concentrations mesurées en fonction de la dilution.

À partir du graphe, on pourra déterminer la limite supérieure de linéarité.

Cette étude devra être répétée 3 fois dans 3 séries différentes.

#### 4.8 La contamination inter-échantillon

Elle est évaluée à partir de deux échantillons, l'un d'une concentration basse (B) et l'autre d'une concentration élevée (H). L'échantillon de concentration forte est analysé 3 fois consécutivement (H1, H2, H3 → moyenne H) suivi de l'échantillon bas passé également 3 fois de suite (B1, B2, B3).

Le pourcentage de contamination entre les échantillons est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de contamination} = \frac{B1 - B3}{H} \times 100$$

**Le pourcentage de contamination doit être proche de zéro.**


#### 4.9 Les interférences (médicaments)

Il s'agit de vérifier que les médicaments prescrits en association avec les médicaments à doser n'interfèrent pas avec la méthode de dosage.

On préparera des échantillons de sérum « drug-free » dopés avec une concentration élevée des molécules médicamenteuses susceptibles d'interférer.

Les échantillons seront ensuite traités de la même façon qu'un échantillon de patient.

Pour chaque molécule étudiée, on comparera leur temps de rétention à celui des molécules à doser.

	MODE OPERATOIRE	OPC-LABO-MO 357
	<b>Validation en portée B d'une méthode de dosage mise au point au laboratoire de pharmacologie</b>	Secteur pharmacologie 4/4 Version 1 Date de diffusion : jj/mm/aaaa

#### 4.10 La comparaison de méthode

Il s'agit de comparer la nouvelle méthode (Y) avec l'ancienne méthode (X) à partir de plusieurs échantillons biologiques de patients frais ou congelés (si possible >10).

L'analyse des échantillons se fera en simple et en simultanée par les deux méthodes.

Les valeurs obtenues seront reportées dans le tableau suivant :

	Méthode référence (X)	Méthode testée (Y)	Les différences	Les biais %
Valeurs mesurées (Unité)	$x_i$	$y_i$	$x_i - y_i$	$((y_i - x_i) / x_i) * 100$
Moyenne	$M_x$	$M_y$	/	/
Ecart type	$S_x$	$S_y$	/	/

Tracer la droite de régression  $y_i$  en fonction de  $x_i$  ;

Tracer le graphique des différences  $(x_i - y_i)$  en fonction de  $x_i$  ;

Tracer le graphique des biais  $((x_i - y_i) / x_i) * 100$  en fonction de  $x_i$ .

Méthode des moindres rectangles :

Calculer l'intercept  $a = M_y - b * M_x$

La pente  $b = S_y / S_x$

La droite des moindres rectangles est :  $y = bx + a$

Interprétation :  $b$  doit être le plus proche de 1 ;  $a$  doit être le plus proche de 0.

#### 5 Responsabilités

Ce mode opératoire est sous la responsabilité du chef de service, du cadre référent du secteur.

#### 6 Enregistrement/Archivage

Le présent mode opératoire est archivé dans le classeur du secteur de pharmacologie.

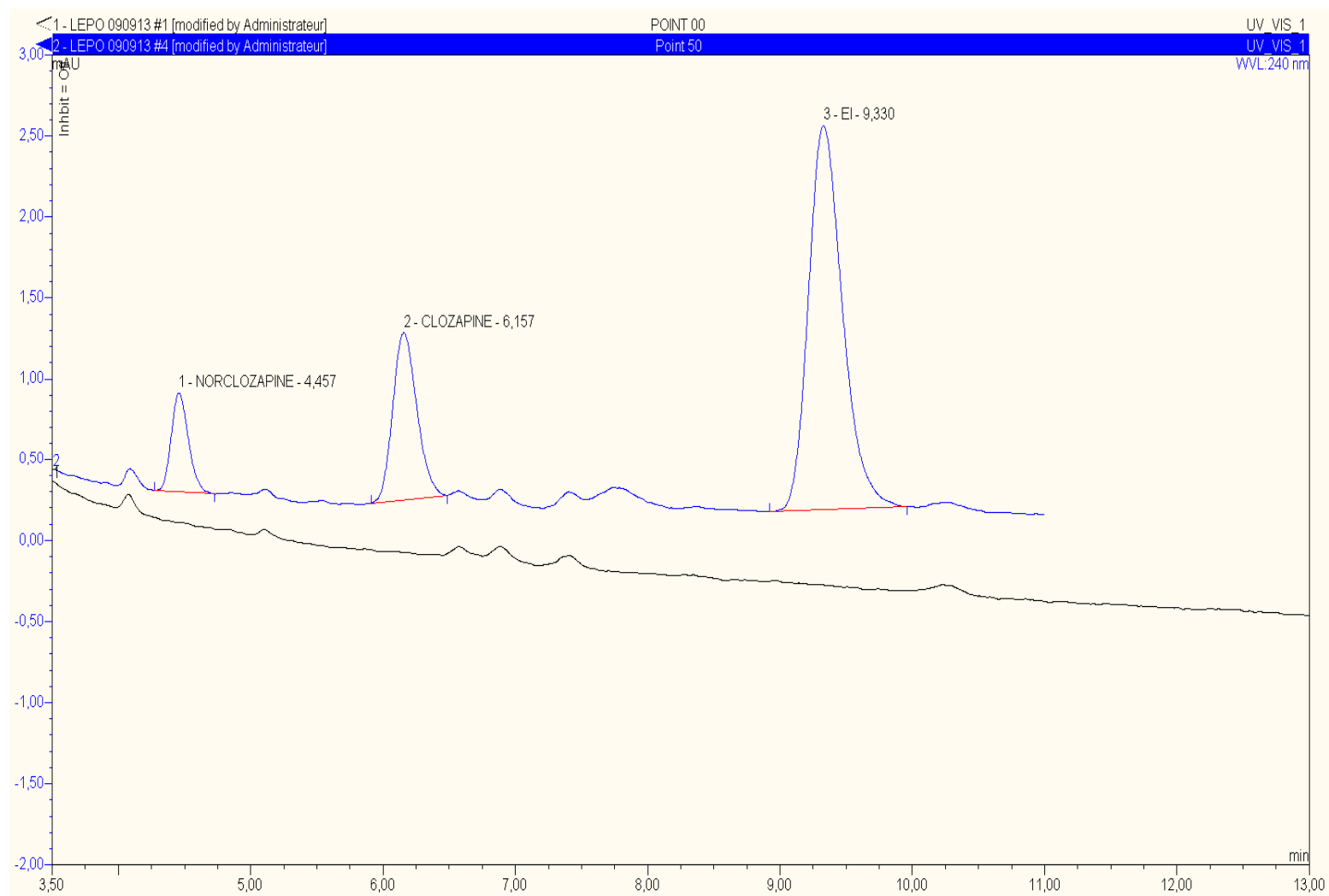
De plus, il est disponible sur informatique en suivant le chemin d'accès suivant : Poste de travail → Labo-central sur « srdragon » (S :) → Documents qualité → DOCUMENTS QUALITE VALIDES → ANALYTIQUE → Secteur pharmacologie.

*Pour tout commentaire (cohérence, compréhension, ...) de ce document, vous pouvez vous adresser au rédacteur*

**FIN DU MODE OPERATOIRE**

---

# **ANNEXE-IV**



Chromatogramme en noir : échantillon « blanc » ;  
Chromatogramme en bleu : échantillon point de gamme 50 ng/ml de clozapine

# **ANNEXE-V**



## FICHE TYPE QUANTITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION  
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE  
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 43

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

*Note : le laboratoire se référera au tableau du § 9.1.1 du Document Cofrac SH GTA 04 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B) et complètera une fiche par examen de biologie médicale*

### EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE :

Dosage quantitatif de la CLOZAPINE plasmatique

### DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte/Mesurande :	Clozapine
Principe de la Mesure :	Dosage par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes
Méthode de mesure :	Mesure de l'absorbance dans l'ultra-violet
Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...) :	Plasma/sérum
Type de récipient, Additifs (tubes, ...) :	Tubes héparinés ou tube sec (sans gel)
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Centrifugation Puis extraction liquide-liquide
Unités :	ng/ml
Intervalles de référence <sup>1</sup> :	350 à 600 ng/ml
Marquage CE (Oui/Non) :	non
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	/
Instrument (analyseur automatique, etc.) :	Système chromatographique Ultimate 3000 (Dionex)
Référence du réactif (référence fournisseur, version notice) :	Isopropanol (VWR, réf. 20880320) Hexane (VWR, réf. 24575320) Acétonitril (VWR, réf. 20060320) Méthanol (VWR, réf. 20864320) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (MERCK, réf. 1.05 108.0500) NaOH (VWR, réf. 1.06 495.1000) HCl (VWR, réf. 29673294)
Matériau d'étalonnage (références)/ Raccordement métrologique :	Matière première pure de clozapine base (pureté ≥ 98%) fournie par Sigma-Aldrich.
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Construction d'une droite d'étalonnage à partir de 6 concentrations : 50, 100, 200, 400, 600 et 800 ng/ml (+ un blanc)

### MISE EN ŒUVRE

Opérateur(s) habilité(s) ayant réalisé la vérification de méthode :	Valérie OLIN (technicienne habilitée) et Catherine BOYER (technicienne habilitée)
Procédure de validation :	OPC-LABO-MO 357
Procédure de gestion de la portée flexible :	OPC-LABO-PRO 46
Période d'évaluation :	18/04/2012 au 23/08/2013
Date de mise en service :	Mars 2012
Autorisation de mise en service par :	Dr Frédérique LANCELIN

<sup>1</sup> Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...



## FICHE TYPE QUANTITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION  
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE  
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 43

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs :	Sérum ou plasma ; tube avec gel sont à proscrire	Vérification du tube lors de la réception. Se référer au guide des analyses.
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Centrifugation < 4 heures	Vérification de la date et heure de prélèvement ET date et heure d'arrivée au laboratoire
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Fiche d'habilitation du personnel en pharmacologie OPC-LABO-FE 50	Habilitation du personnel
Conditions ambiantes requises (ex : Température, organisation des locaux, éclairage,...) :	Température ambiante stable (20 à 25 °C)	Vérification de la température ambiante
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	Conservation des réactifs	Vérification des dates de péremption, et des dates limites après ouverture
Matériau de référence :	Matière première étalon	Certificat d'analyse (description du produit, pureté du produit, date de péremption...)
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	Pipettes et balance	Vérification et étalonnage du matériel critique

\* item à renseigner si nécessaire



## FICHE TYPE QUANTITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION  
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE  
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 43

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

### EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...):

**Répétabilité:** Echantillons niveau 1 et 2 : sérums « drug-free » surchargés en clozapine ; Echantillons niveau 3 et 4 : contrôle interne de qualité.

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne <sup>2</sup>	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite (hors fournisseurs <sup>3</sup> )*	Conclusion <sup>4</sup>
Echantillon niveau 1	10	9.5	0.56	5.9%	/	20%	Conforme
Echantillon niveau 2	10	44.4	1.83	4.1%	/	15%	Conforme
Echantillon niveau 3	10	192.8	7.53	3.9%	/	15%	Conforme
Echantillon niveau 4	10	468.6	24.9	5.3%	/	15%	Conforme

\* Guidance for industry: bioanalytical method validation, Food and Drug Administration (May 2001);  
Guideline on bioanalytical method validation, European Medicines Agency (July 2011).

**Conclusions : conforme**

**Fidélité intermédiaire :** Echantillons niveau 1 et 2 : sérums « drug-free » surchargés en clozapine ; Echantillons niveau 3 et 4 : contrôle interne de qualité.

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne <sup>2</sup>	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite (hors fournisseurs <sup>3</sup> )*	Conclusion <sup>4</sup>
Echantillon niveau 1	10	9.2	0.68	7.4%	/	20%	Conforme
Echantillon niveau 2	10	44.6	3.60	8.1%	/	15%	Conforme
Echantillon niveau 3	10	143.6	15.9	11.1%	/	15%	Conforme
Echantillon niveau 4	10	705.4	62.6	8.9%	/	15%	Conforme

\* Guidance for industry: bioanalytical method validation, Food and Drug Administration (May 2001);  
Guideline on bioanalytical method validation, European Medicines Agency (July 2011).

**Conclusions : conforme**

<sup>2</sup> Nombre de chiffres significatifs

<sup>3</sup> Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

<sup>4</sup> Conforme/non conforme



## FICHE TYPE QUANTITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION  
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE  
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 43

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

**Justesse (approche de la) :** évaluée à partir de CIQ non externalisés.

### Cas des contrôles internes externalisés

Echantillons	Nombre (N)	Valeurs Labo <sup>2</sup>	Cible <sup>①</sup> (groupe de pairs)	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) <sup>②</sup> /groupe de pairs	Biais (%) /moyenne générale	Biais* (%) limite <sup>3</sup>	Conclusion <sup>4</sup>
Echantillon CIQ niveau 1	10	143.6	147.0	/	-2.3%	/	15%	Conforme
Echantillon CIQ niveau 2	10	705.4	747.0	/	-5.6%	/	15%	Conforme

①Cible fournisseur ; ②Biais (%)cible fournisseur.

\* Guidance for industry: bioanalytical method validation, Food and Drug Administration (May 2001);  
Guideline on bioanalytical method validation, European Medicines Agency (July 2011).

**Conclusions : Conforme**

### Exactitude :

#### Cas des contrôles externes ponctuels (année 2012 et 2013)

Echantillons	Nombre* (N)	Valeur Labo <sup>5</sup>	Cible fournisseur	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) /cible	Biais (%) /moyenne générale	Biais (%) limite <sup>6</sup>	Conclusion
Mars 2012	72	141.0	121.2	122.9	+16.3	+14.7	+/-15%	Conforme
Avril 2012	81	61.8	66.9	68.7	-7.6	-10.0	+/-15%	Conforme
Mai 2012	78	<10	0	/	/	/	+/-15%	Conforme
Juin 2012	83	154.5	150.3	147.6	+2.8	+4.7	+/-15%	Conforme
Juillet 2012	85	542.7	556.4	551.9	-2.5	-1.7	+/-15%	Conforme
Août 2012	82	294.0	290.1	290.6	+1.3	+1.2	+/-15%	Conforme
Septembre 2012	82	102.1	100.2	101.8	+1.9	+0.3	+/-15%	Conforme
Octobre 2012	84	1213.8	1225.0	1216.6	-0.9	-0.2	+/-15%	Conforme
Novembre 2012	88	199.4	196.1	194.8	+1.7	+2.4	+/-15%	Conforme
Décembre 2012	84	382.6	378.3	377.4	+1.1	+1.4	+/-15%	Conforme
Janvier 2013	80	780.0	788.2	790.4	-1.0	-1.3	+/-15%	Conforme
Février 2013	73	95.3	97.1	97.4	-1.8	-2.2	+/-15%	Conforme
Mars 2013	74	274.9	266.6	266.6	+3.1	+3.1	+/-15%	Conforme
Avril 2013	76	1194.9	1120.9	1100.8	+6.6	+8.5	+/-15%	Conforme
Mai 2013	79	60.3	68.4	70.1	-11.8	-13.9	+/-15%	Conforme
Juin 2013	78	28.5	30.3	32.4	-5.9	-12.0	+/-15%	Conforme
Juillet 2013	82	116.4	121.0	121.4	-3.8	-4.4	+/-15%	Conforme

\* nombre total de participants

**Conclusions : Conforme**

<sup>5</sup> Nombre de chiffres significatifs

<sup>6</sup> Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.



## FICHE TYPE QUANTITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION  
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE  
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 43

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

### INCERTITUDES (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :


Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	Méthode Cofrac CIQ + EEQ $U_1 = S_{\text{repro}} \text{ (CIQ)}$ $U_2 = \text{biases} / \sqrt{3} \text{ (EEQ)}$ (Biais calculé à partir de la moyenne des écarts entre la valeur laboratoire et la valeur cible) $u_c = \sqrt{U_1^2 + U_2^2}$ $U = 2 \times u_c$
Quantification de l'incertitude (niveau bas) :	44.6 +/- 7.0 ng/ml
Quantification de l'incertitude (niveau moyen) :	143.6 +/- 16.0 ng/ml
Quantification de l'incertitude (niveau haut) :	705.4 +/- 18.4 ng/ml
Interprétation :	/

Conclusions :

### COMPARAISON DE METHODES :

Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	NA
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou EBMD :	Détecteur UV monochromatique (Shimadzu SPD-6AV)
Nombre de mesures :	7
Intervalle de comparaison adaptée à l'activité du laboratoire :	30 à 500 ng/ml
Méthode d'exploitation des résultats :	Droite des moindres rectangles
Equation de la droite de régression :	$Y = 1.017 X - 0.864$
Diagramme des différences et/ou des rapports :	Nombre de déviants = 0
Conclusions et dispositions <sup>7</sup> :	Conforme

<sup>7</sup> Le laboratoire précise les dispositions mises en œuvre (par exemple : utilisation transitoire et documentée d'un facteur de correction).

	<b>FICHE TYPE QUANTITATIF</b> VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE	RÉFÉRENCE : SH FORM 43
		INDICE DE RÉVISION : 00
		DATE D'APPLICATION : 15/04/11

<b>INTERVALLE DE MESURE (indispensable en portée B)</b> (si possible et pertinent, ex : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH) :	
Mode de détermination :	Tests de dilution ; CV inter-essais
Limite inférieure de linéarité (de quantification)/ Profil de fidélité :	10 ng/ml (CV inter-essais < 20%)
Limite supérieure de linéarité :	4000 ng/ml

<b>INTERFERENCES</b> (ex : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) :	
Vérification bibliographique :	/
Vérification :	Les molécules médicamenteuses suivantes n'interfèrent pas avec le dosage de la clozapine : cyamémazine, chlorpromazine, loxapine, halopéridol, olanzapine, risperidone, 9-OH risperidone, aripiprazole, amisulpride, quétiapine, norquétiapine, miansérine, paroxétine, fluoxétine, escitalopram, venlafaxine, ODM venlafaxine, duloxétine, diazépam, oxazépam, lorazépam, prazépam, lamotrigine.

<b>CONTAMINATION</b> (indispensable en portée B et pour les paramètres sensibles en portée A)	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles	Séquence H1H2H3B1B2B3 %de recouvrement = - 0.03% Contamination non significative
Inter réactif si nécessaire	NA

<b>Commentaires éventuels :</b>  Vérification de l'absence de pics interférents aux temps de rétention de la clozapine et de l'étalon interne dans les matrices biologiques utilisées pour réalisés les points de gamme de la droite de calibration.
--

## Résumé

Au laboratoire de pharmacologie du CHSA, nous réalisons le dosage quantitatif des médicaments psychotropes par des méthodes chromatographiques développées sur place. Selon la norme 15189, les méthodes mises au point au laboratoire doivent être validées en portée de type B. Le laboratoire doit démontrer qu'il maîtrise parfaitement son processus analytique et il doit établir l'ensemble des critères de qualité qui doivent être évalués pour la validation d'une méthode. Afin de répondre à ces exigences, nous avons suivi les recommandations du COFRAC et de sociétés savantes pour élaborer un document sur la validation de nos méthodes de dosages.

Le travail réalisé au cours du D.U. s'est déroulé en 3 étapes principales : 1)- description du processus analytique ; 2)- analyse et maîtrise des risques ; 3)- rédaction d'un mode opératoire de validation de méthode en portée B. Nous avons finalisé ce travail par une validation de méthode : le dosage quantitatif par CLHP de la clozapine.

Afin de mieux maîtriser notre processus analytique, plusieurs actions devront être menées dont : 1) la vérification et l'étalonnage de nos pipettes et balance ; 2) compléter le M.O. de validation de méthode par une étude de la stabilité des réactifs et de la robustesse.

Une fois finalisé, ce travail pourra être transposé aux autres méthodes de dosages développées dans notre laboratoire.