



VALIDER UNE MÉTHODE ANALYTIQUE, ... POURQUOI ET COMMENT?

CHAIRE FRANQUI 2017-2018

Philippe HUBERT

Laboratoire de Chimie Analytique Pharmaceutique

CENTER FOR INTERDISCIPLINARY
RESEARCH ON MEDICINES

Présentation

- **Pourquoi**
 - Point de vue de l'analyste / Cadre réglementaire
- **Objectifs**
 - Objectif d'une méthode / Objectif de la validation
- **Comment**
 - Démarche / Harmonisation
 - Interprétation / Profil exactitude
 - Exemples
- **Conclusion**

Valider une méthode analytique, ...

Pourquoi ?

Pourquoi

Analyste

- Pour savoir « **où l'on va** »... avec la méthode...
- Pour savoir si l'on est apte à passer à **l'étape ultérieure ... utilisation en routine** (cf. cycle de vie de la procédure analytique).

Obligation réglementaire

- Normes relatives à la **QUALITE**
- Dossiers d'enregistrement des médicaments (**AMM**)

Normes et recommandations



ICH, Washington
Eurachem, EN, ISO,
EMA, FDA, etc.

Pourquoi

Qualité (AQ)

- **Dire** ce que l'on va faire
- **Justifier** ce que l'on fait
- **Faire** ce que l'on a dit
- **Enregistrer** ce que l'on a fait (traçabilité)

Normes

GMP, GLP, ISO, etc



Pourquoi



ISO 17025



- **Validation** des méthodes est requise lorsque le laboratoire utilise des **méthodes non normalisées**
- La **validation** des résultats constitue un volet important d'un **système qualité**.
- Tout laboratoire doit instaurer en son sein un **contrôle de qualité interne** qui lui permet de juger de la **qualité des résultats** qu'il produit (via des SOPs).

Pourquoi



AMM (EMA)



- La **validation analytique** d'une méthode est un **caractère très important** de n'importe quel **jeu de données** soumis à l'examen des agences de réglementation internationale dans l'optique de la mise sur le marché (AMM) de nouveaux produits ou des applications de tests cliniques.

Pourquoi



AMM (EMA)



Les directives européennes indiquent que la validation est applicable aux sections suivantes:

- le développement pharmaceutique,
- le contrôle en cours de process pendant la phase de production,
- le contrôle des matières premières (API et autres ingrédients),
- le contrôle sur les produits intermédiaires,
- le contrôle sur les produits finis,
- la stabilité des produits ...

Pourquoi



Cadre réglementaire

- United States Pharmacopeia (**USP** - XXI :1989 and XXII :1990)
- Food Drug Administration (**FDA** - *Validation of chromatographic methods* – 1994)
- Note explicative CEE : III-844-87 (1989) > Pharmacopée Européenne (**EP**)
- **ICH** (International Conference on Harmonisation) : ICH Q2R1 (1995 - 2005)
- **SFSTP** (2003)...



Pourquoi



Cadre réglementaire

- **ICH (International Conference on Harmonisation) :**
 - *"It is **the responsibility of the applicant to choose the validation procedure and protocol most suitable for their product**"*
 - *"Due to their complex nature, analytical procedures for biological and biotechnological products in some cases may be **approached differently than in this document**"*



Questions récurrentes

- Quelles sont **les limites acceptables** de mes données de validation?
- Quelles sont **les conséquences** si je considère, malgré tout, que ma méthode est valide ?
- Pourquoi a-t-on **des approches différentes** en fonction de la nature de la méthode, de l'équipement ou de la matrice ?
- Comment **démontrer que ma méthode est validée** ?
- Je sens bien que les **exigences** de validation ne doivent pas être les mêmes **en fonction des applications** mais comment décider ?
- ...

Comment faire en pratique...???

Valider une méthode analytique, ...

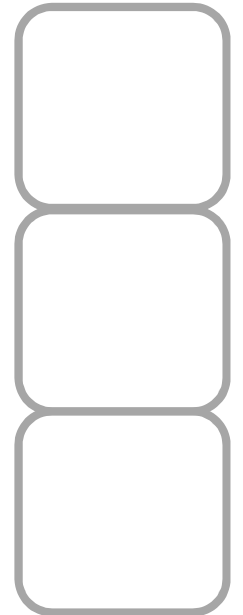
Objectifs ?

Objectifs - Questions

Quel est l'objectif d'une méthode analytique ?

...

- Démontrer qu'en moyenne la réponse évolue linéairement avec la concentration introduite ?
- Démontrer que le biais moyen de la méthode est inférieur à $x\%$?
- Démontrer que la fidélité observée sur un grand nombre de mesures est meilleure que $x\%$?

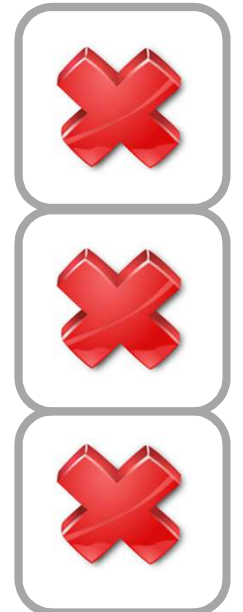


Objectifs - Questions

Quel est l'objectif d'une méthode analytique ?

...

- Démontrer qu'en moyenne la réponse évolue linéairement avec la concentration introduite ?
- Démontrer que le biais moyen de la méthode est inférieur à $x\%$?
- Démontrer que la fidélité observée sur un grand nombre de mesures est meilleure que $x\%$?

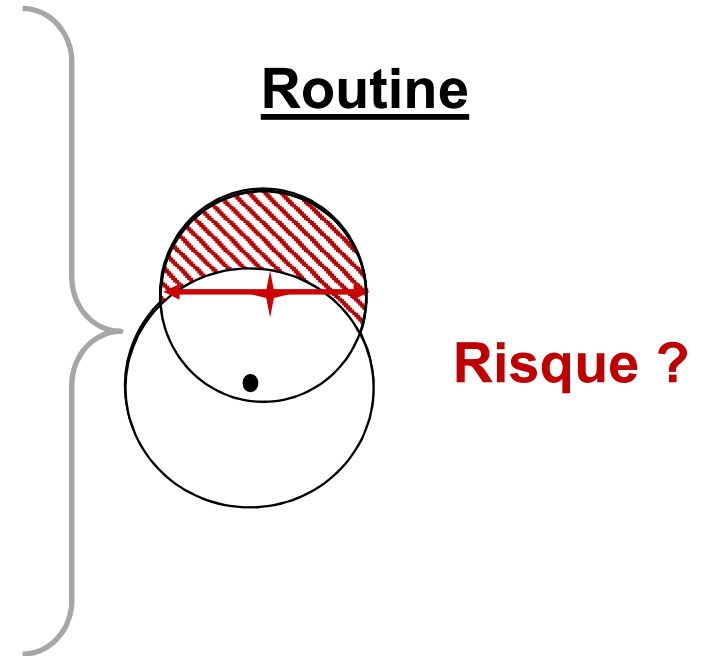
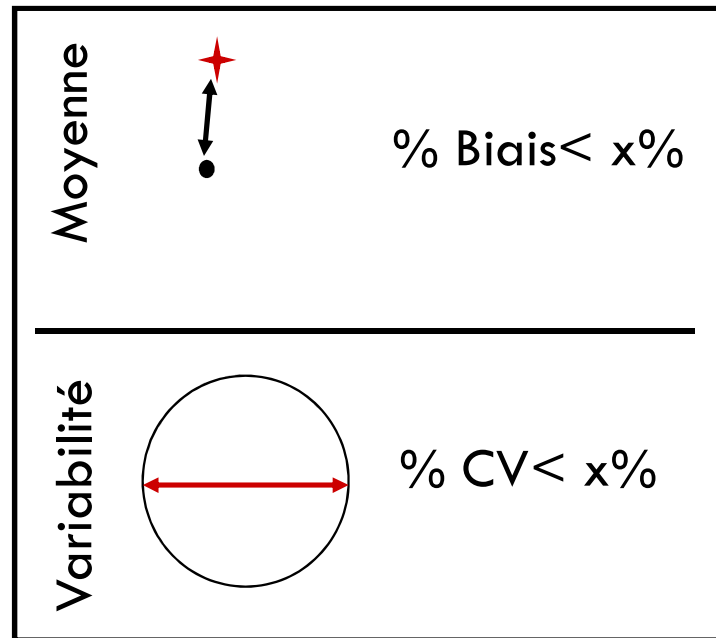


Objectifs

Quel est l'objectif d'une méthode analytique ?

Pourquoi?

Validation



Objectifs - Questions

Quel est l'objectif d'une méthode analytique ?

- ... doser le **plus exactement possible** chacune des **quantités inconnues** que le laboratoire aura à évaluer **en routine**



Quel est l'objectif de la validation d'une méthode analytique ?

...

Objectifs - Questions

Quel est l'objectif d'une méthode analytique ?

- ... doser le **plus exactement possible** chacune des **quantités inconnues** que le laboratoire aura à évaluer **en routine**



Quel est l'objectif de la validation d'une méthode analytique ?

- ... **donner** au laboratoire et aux autorités **des garanties suffisantes** que **chacune de ces mesures** qui seront réalisées **en routine** avec cette méthode sera **suffisamment proche de la "vérité"**.



Objectifs

Quel est l'objectif d'une méthode analytique ?

- ... doser le **plus exactement possible** chacune des **quantités inconnues** que le laboratoire aura à évaluer **en routine**

$$x_i \leftrightarrow \mu_T$$

Quel est l'objectif de la validation d'une méthode analytique ?

- ... **donner** au laboratoire et aux autorités **des garanties suffisantes** que **chacune de ces mesures** qui seront réalisées **en routine** avec cette méthode sera **suffisamment proche de la "vérité"**.

$$|x_i - \mu_T| < \lambda$$

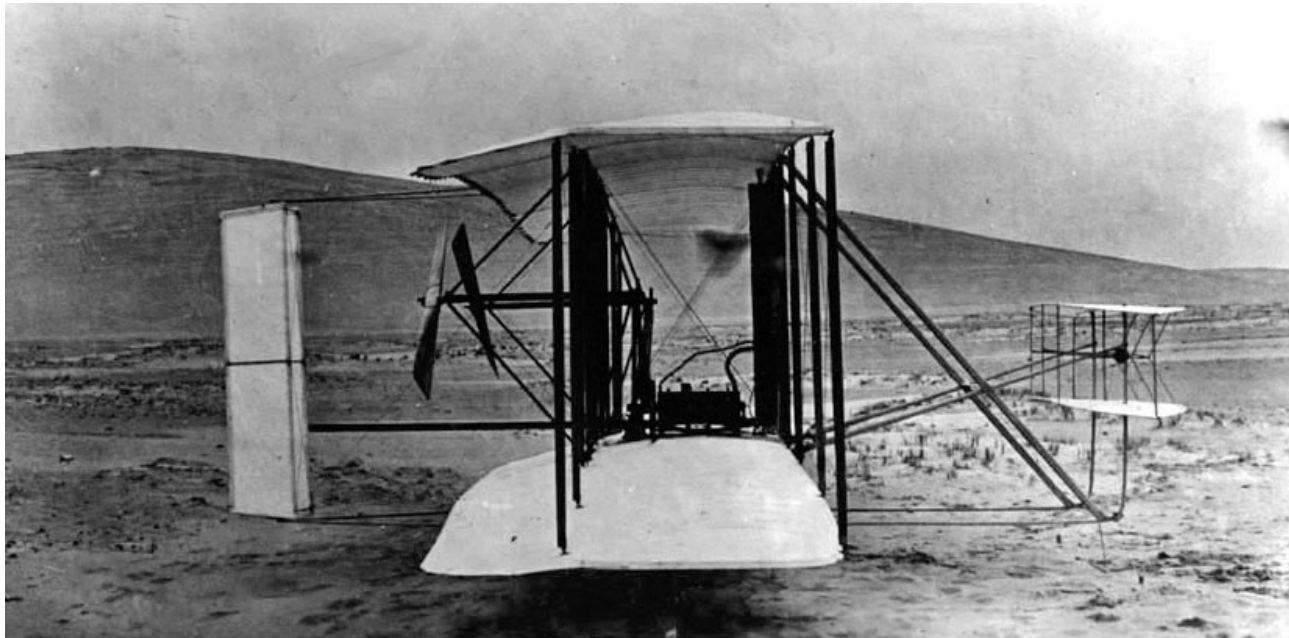
λ = limite d'acceptation

Valider une méthode analytique, ...

Comment ?

Comment

Comment faire pour répondre à ces objectifs?



Comment

Comment faire pour répondre à ces objectifs?

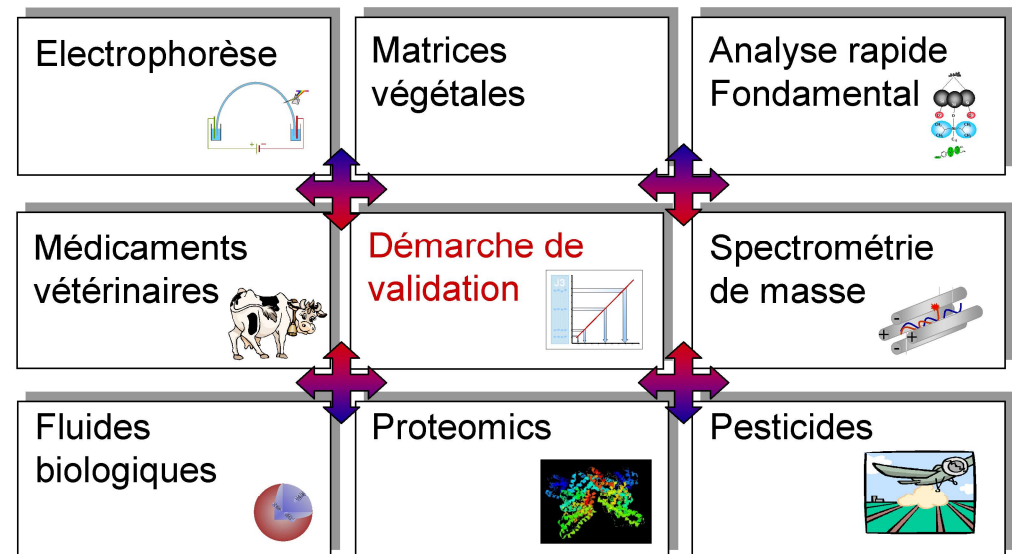
- Proposer une démarche en accord avec les textes normatifs et réglementaires (**harmonisation** / ISO).
- Simplifier l'**approche** de la validation ainsi que l'interprétation des données (Décision / Diagnostic).
- Évaluer et contrôler les **risques** liés à l'application de la méthode en routine.

Harmonisation - Pourquoi

→ Souhaitable

- Qualité (procédure unique)

→ Généralisation de la démarche



Harmonisation - Pourquoi

→ Souhaitable

- Qualité (procédure unique)

→ Généralisation de la démarche

- indépendante du secteur d'activité
- indépendante de la procédure
- indépendante de la matrice

Harmonisation - Pourquoi

→ Souhaitable

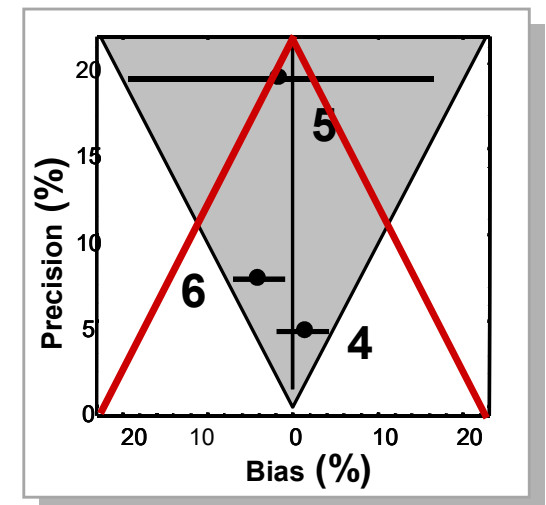
- Qualité (procédure unique)

→ Généralisation de la démarche

- indépendante du secteur d'activité
- indépendante de la procédure
- indépendante de la matrice

→ Simplification de la démarche

- outil statistique
- outil de décision



Harmonisation des critères

Critères de Validation

- spécificité
- **fonction de réponse**
- **linéarité**
- **Justesse**
- **exactitude**
- fidélité
- limite de détection
- limite de quantification
- autres ...

Critères de validation (ICH)

Type de tests Caractéristiques	Dosage	Impuretés		Identification	Dosage bioanalyse
		Quantitatif	Essais limites		
Exactitude	✓	✓			✓
Fidélité répétabilité	✓	✓			✓
Fidélité fidélité intermédiaire	✓	✓			✓
Spécificité Sélectivité	✓	✓	✓	✓	✓
Limite de détection		✓	✓		✓
Limite de quantification		✓			✓
Linéarité	✓	✓			Fonction de réponse
Intervalle de mesure	✓	✓			✓
Robustesse	✓	✓	✓		

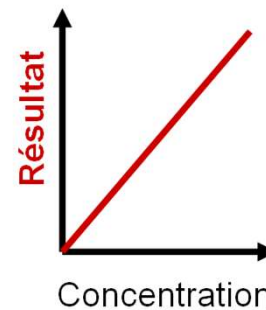
Harmonisation des critères

Critères de Validation

- spécificité
- **fonction de réponse**
- **linéarité**
- **Justesse**
- **exactitude**
- fidélité
- limite de détection
- limite de quantification
- autres ...

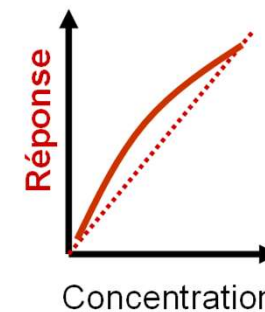
Linéarité / Fonction de réponse

Linéarité requise



Linéarité

Linéarité non requise



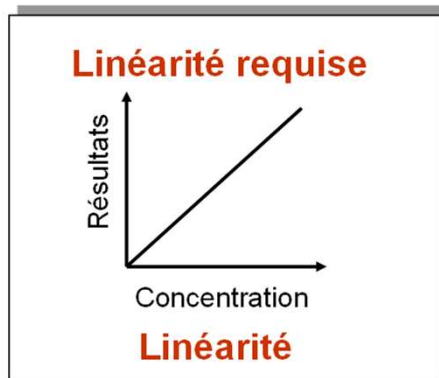
Fonction de réponse

Harmonisation des critères

Linéarité

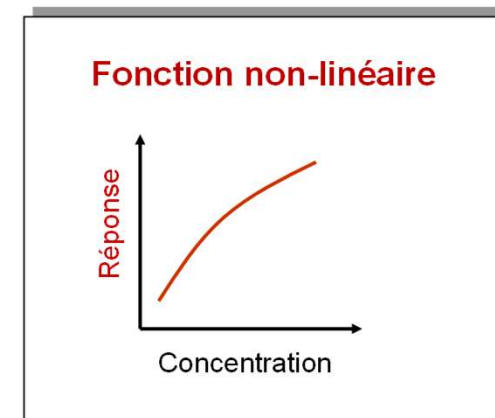
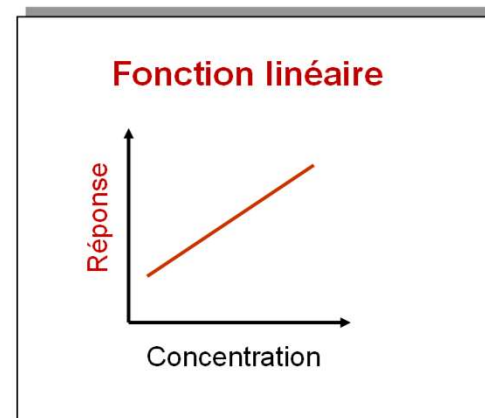
Linéarité (ICH - PE)

La linéarité d'une procédure analytique est la relation existant entre la réponse et la concentration de la substance présente dans l'échantillon, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, à directement proportionnels à la **concentration**.



Fonction de réponse

La fonction de réponse traduit à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existant entre la **réponse** et la **concentration** en substance à examiner dans l'échantillon.



Harmonisation des critères

Critères de Validation

- spécificité
- fonction de réponse
- linéarité
- **Justesse**
- **exactitude**
- fidélité
- limite de détection
- limite de quantification
- autres ...

Exactitude - Fidélité - Justesse

STAT. Erreur Totale = Biais + Ecart-Type
Erreur Totale = E. systématique + E. aléatoire

ISO Exactitude = Justesse + Fidélité

ICH **Exactitude ?** = Exactitude + Fidélité

Harmonisation des critères

Exactitude

Exactitude (ICH - PE)

- L'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur acceptée ou conventionnellement vraie, ou comme valeur de référence, et la valeur trouvée (= valeur moyenne obtenue en appliquant la procédure d'analyse certain nombre de fois).

→ Indication sur les **erreurs systématiques**

ISO : JUSTESSE

Laboratoire d'Analyse des
Université de Liège

Exactitude - Fidélité - Justesse ?

STAT.

Erreur Totale = Biais + Ecart-Type
Erreur Totale = Erreur systématique + Erreur aléatoire

ISO

Exactitude = Justesse + Fidélité

ICH

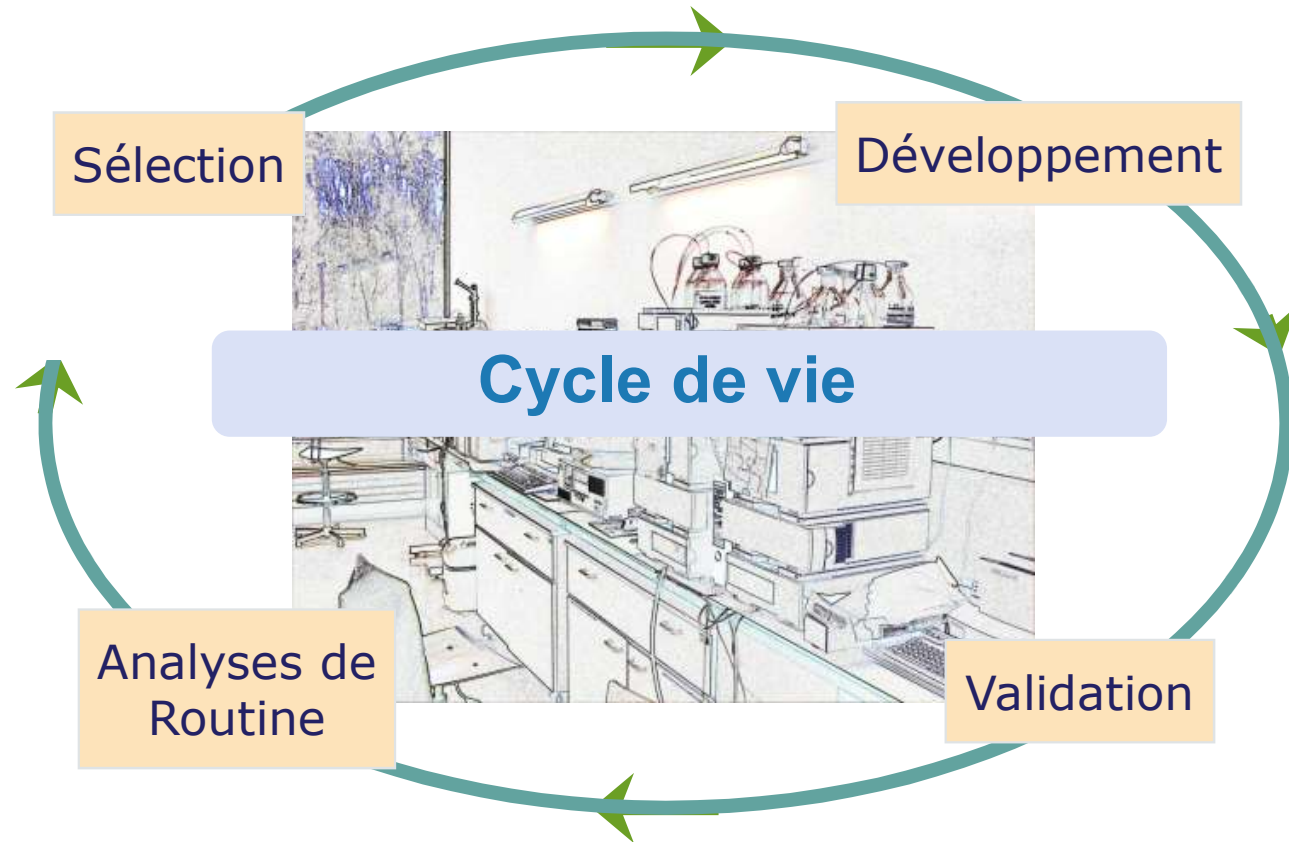
Exactitude ? = Exactitude + Fidélité



Laboratoire d'Analyse des Médicaments
Université de Liège

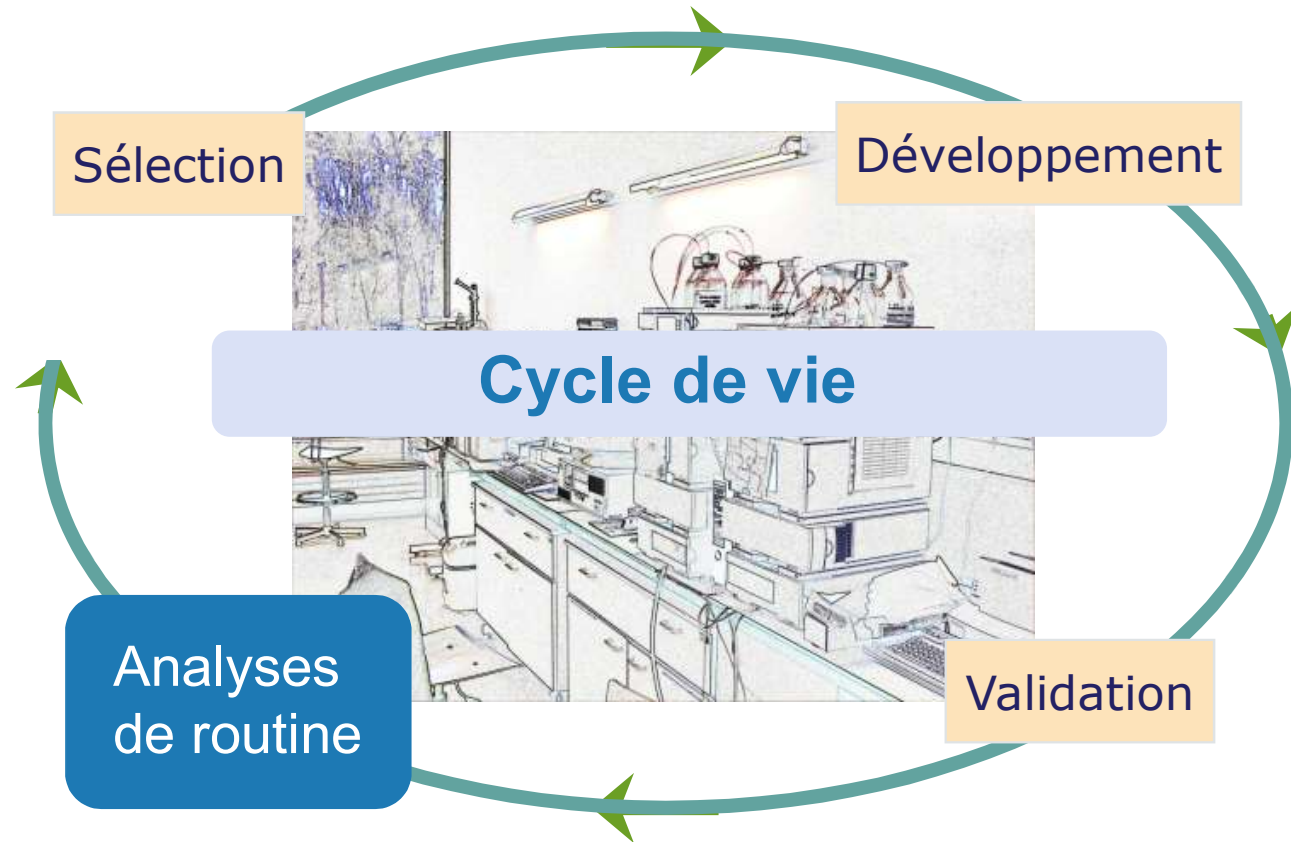
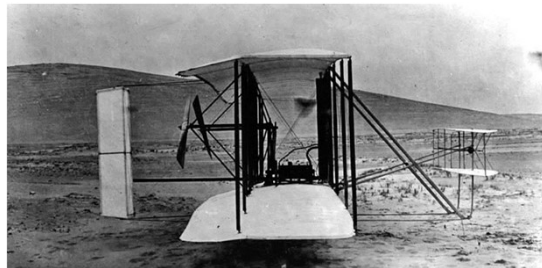
Approche de validation

Cycle de vie des méthodes



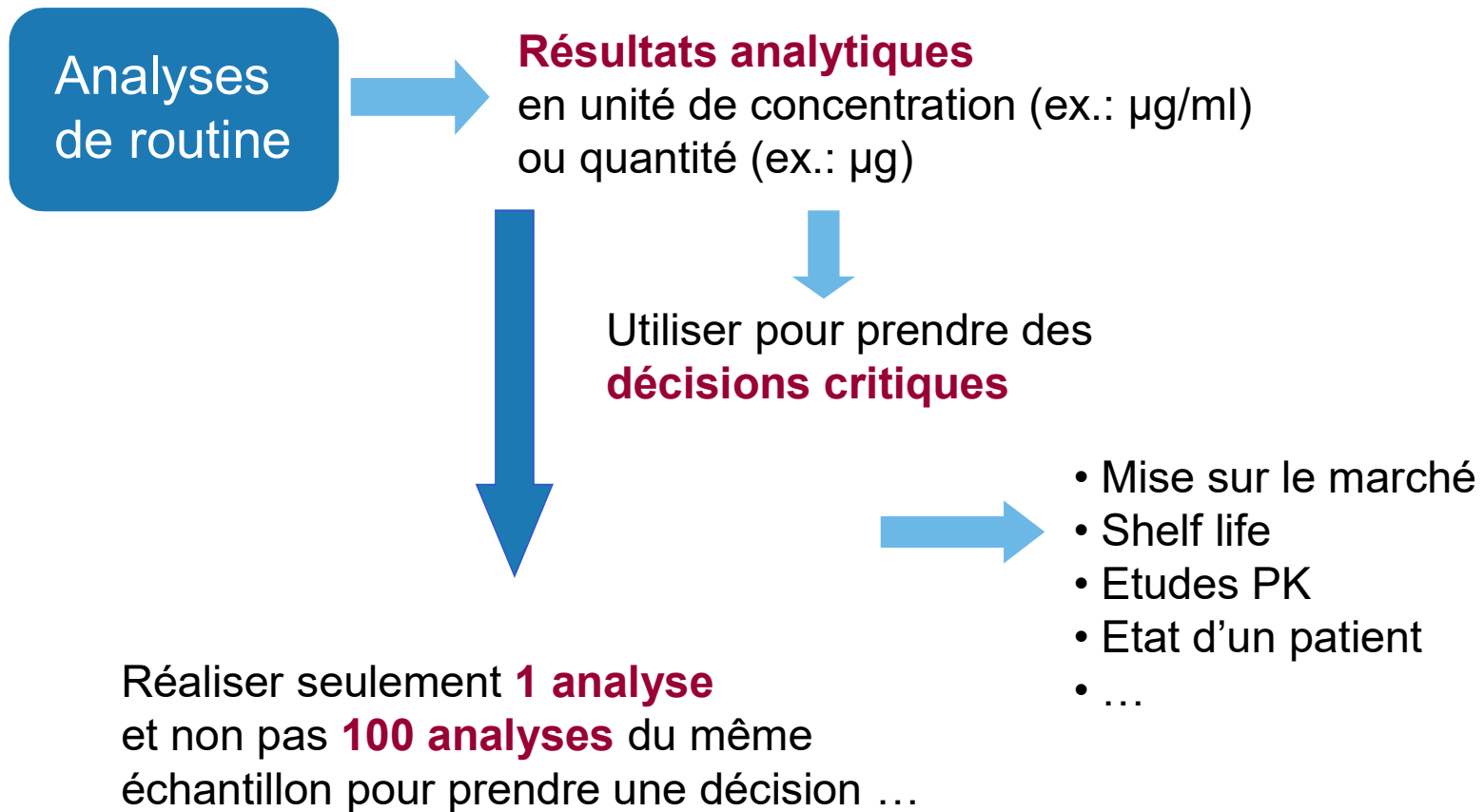
Approche de validation

Cycle de vie des méthodes



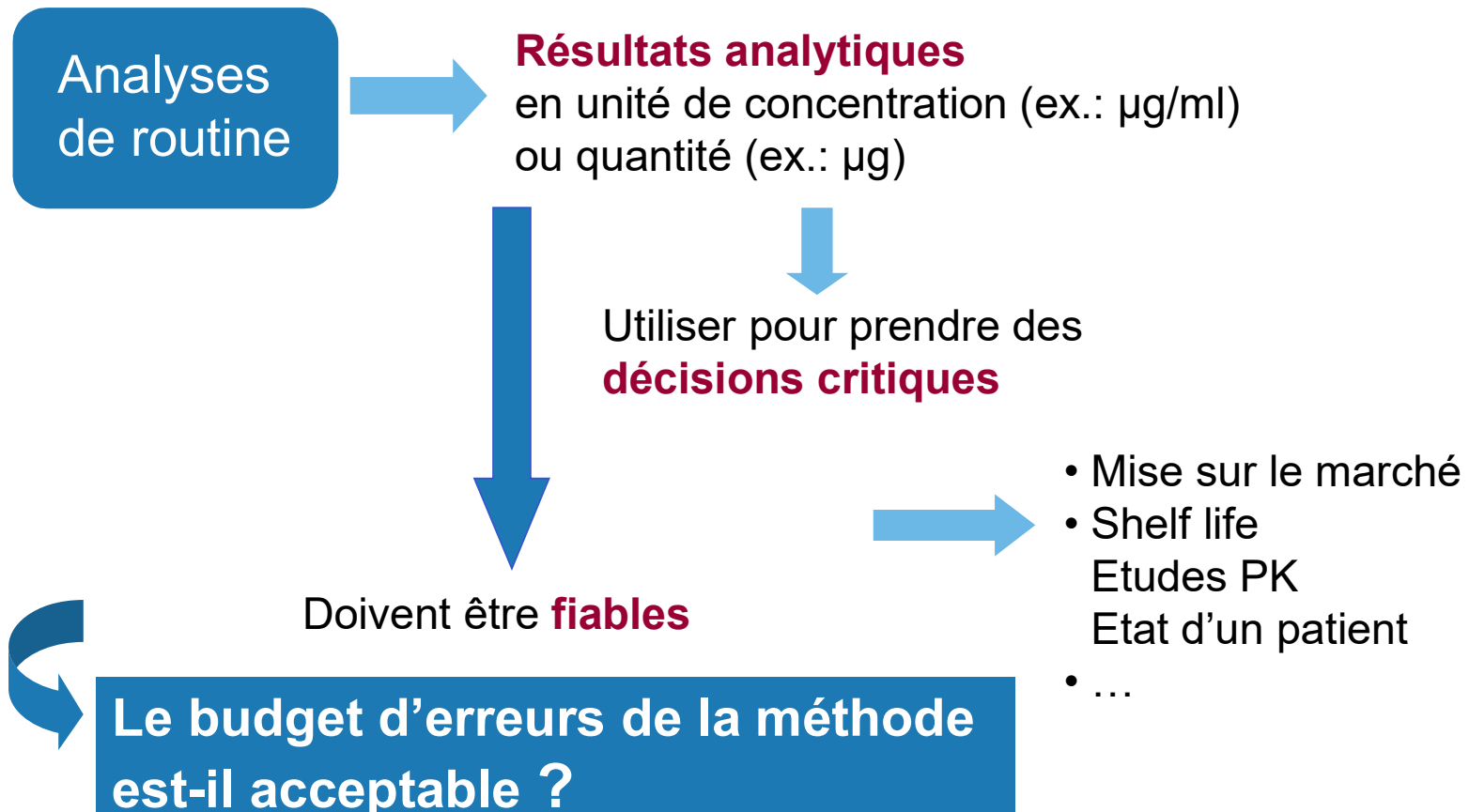
Approche de validation

Cycle de vie des méthodes



Approche de validation

Cycle de vie des méthodes

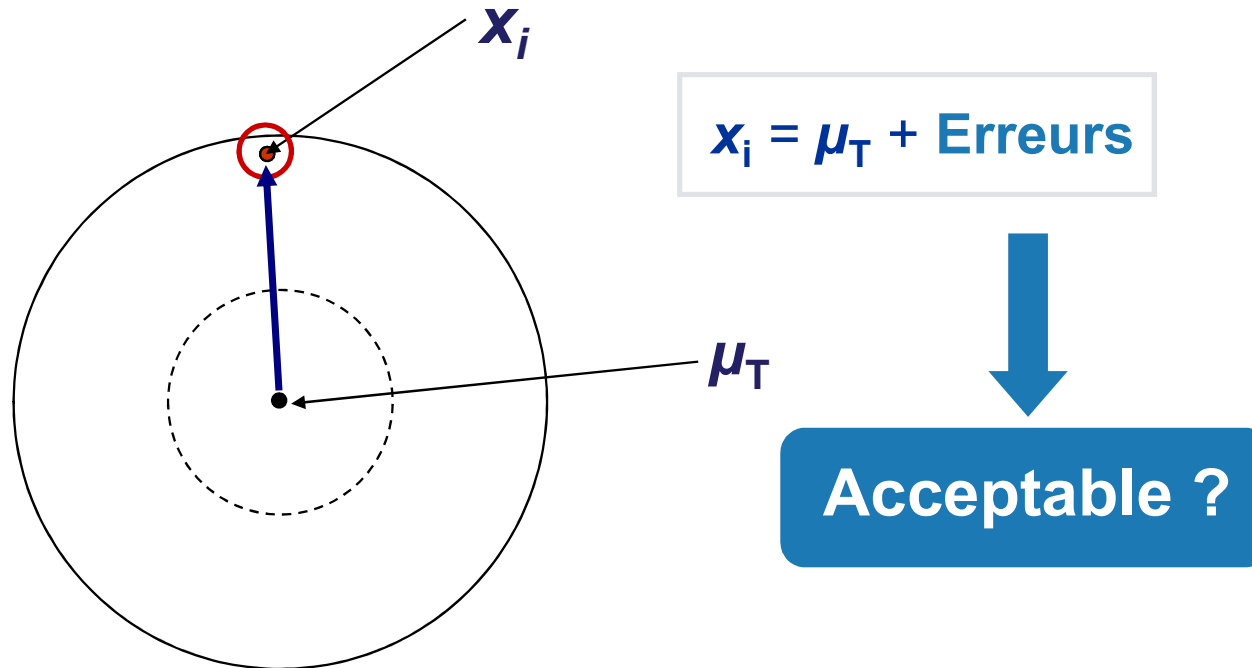


Approche de validation

Résultat en routine

x_i = résultat observé

μ_T = vraie valeur inconnue

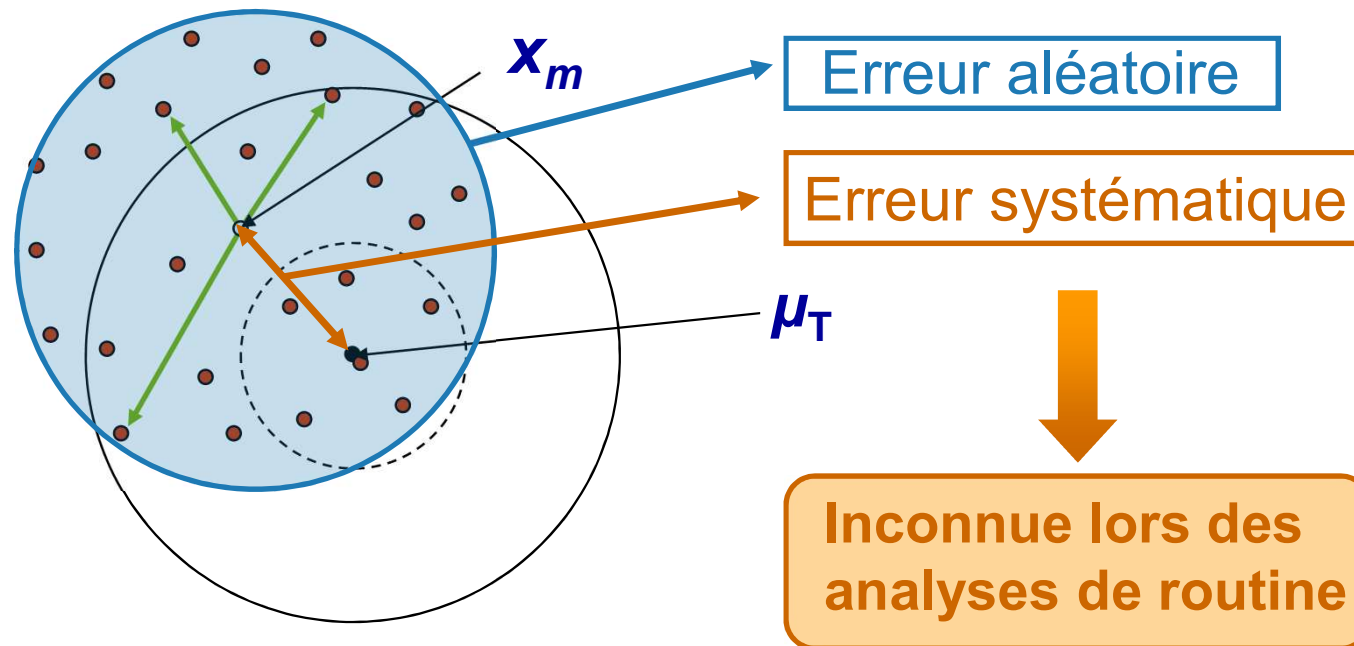


Approche de validation

Erreurs analytiques

X_m = moyenne des résultats observés

μ_T = vraie valeur inconnue



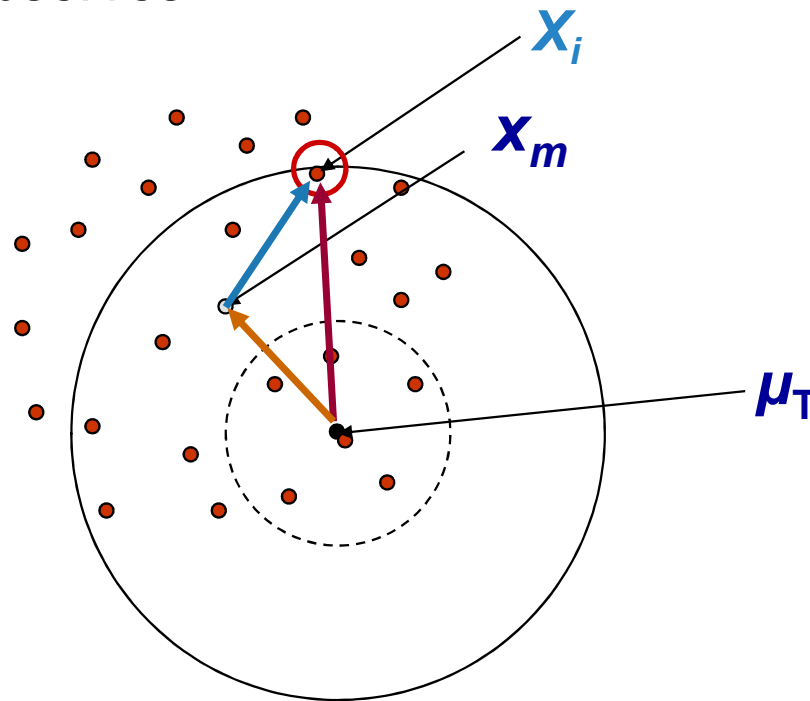
Approche de validation

Erreurs analytiques

X_m = moyenne des résultats observés

μ_T = vraie valeur inconnue

X_i = résultat observé



$$x_i = \mu_T + \text{Erreurs}$$

Erreur totale

Erreur systématique

Erreur aléatoire

Approche de validation

Erreur totale

Exactitude (ICH Q2R1 – ISO 5725 – SFSTP)

L'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre **la valeur conventionnellement vraie**, ou comme valeur de référence, et **la valeur trouvée**.

- **L'erreur totale** est en parfait accord avec la définition de **l'exactitude**.
- **L'erreur totale** est donc le **bon critère de décision** pour accepter la **validité** d'une méthode analytique **avant son utilisation en routine**.

Approche de validation

Rappel des objectifs de la routine

- Chaque futur résultat individuel / pas les résultats antérieurs.
 - Futurs résultats / pas les performances de la méthode.
 - Performances passées de la méthode sont sans intérêt pour prendre une décision même s'il s'agit d'une source d'informations utiles sur la méthode.
- Important de clarifier la façon dont la décision sera prise sur la base des résultats disponibles (validation).**

Approche de validation

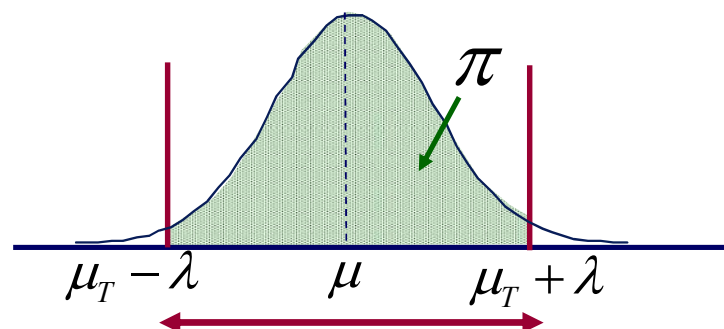
Objectif de la validation

est de donner au laboratoire ainsi qu'aux instances réglementaires des **garanties** que chaque résultat qui sera obtenu en routine sera **suffisamment proche** de la vraie valeur inconnue de l'analyte dans l'échantillon.

$$\pi = P[|X_i - \mu_T| < \lambda] \geq \pi_{\min}$$

λ = limites d'acceptation prédéfinies

π_{\min} = probabilité minimum qu'un résultat sera inclus dans $\pm \lambda$



Approche de validation

Objectif de la validation

L'objectif de la **validation** est l'évaluation de la **probabilité que chaque futur résultat** soit inclus dans les limites d'acceptations.

→ Sur la base des **estimations du biais et de la fidélité**.

$$E_{\hat{\delta}, \hat{\sigma}} \left\{ P \left[|X_i - \mu_T| < \lambda \right] \middle| \hat{\delta}, \hat{\sigma} \right\} \geq \pi_{\min}$$

Approche de validation

Objectif de la validation

L'objectif de la **validation** est l'évaluation de la **probabilité** **que chaque futur résultat** soit inclus dans les limites d'acceptations.

→ Sur la base des **estimations du biais et de la fidélité**.

$$E_{\hat{\delta}, \hat{\sigma}} \left\{ P \left[|X_i - \mu_T| < \lambda \right] \middle| \hat{\delta}, \hat{\sigma} \right\} \geq \pi_{\min}$$

Exactitude (erreur totale) **attendue** de chaque futur résultat

Approche de validation

Objectif de la validation

L'objectif de la **validation** est l'évaluation de la **probabilité** que chaque futur résultat soit inclus dans les limites d'acceptations.

→ Sur la base des **estimations du biais et de la fidélité**.

$$E_{\hat{\delta}, \hat{\sigma}} \left\{ P \left[|X_i - \mu_T| < \lambda \right] \right\}_{\hat{\delta}, \hat{\sigma}} \geq \pi_{\min}$$

Exactitude (erreur totale) **attendue** de chaque futur résultat



Estimateurs des **performances** de la **méthode** obtenus en phase de **validation**

Lien manquant

Approche de validation

Objectif de la validation

Lien : Intervalles

→ Intéressants car englobent les **erreurs systématique** et **aléatoire** (= **erreur total**).

→ Intervalle de confiance

- Descriptif des résultats passés
- Centré sur la moyenne

$$IC = \mu \pm k.\sigma$$

→ Intervalle de tolérance

- Prédicatif des futurs résultats
- Considère l'incertitude sur la moyenne

$$IT = \mu \pm k.(\sigma + \sigma_{\mu})$$

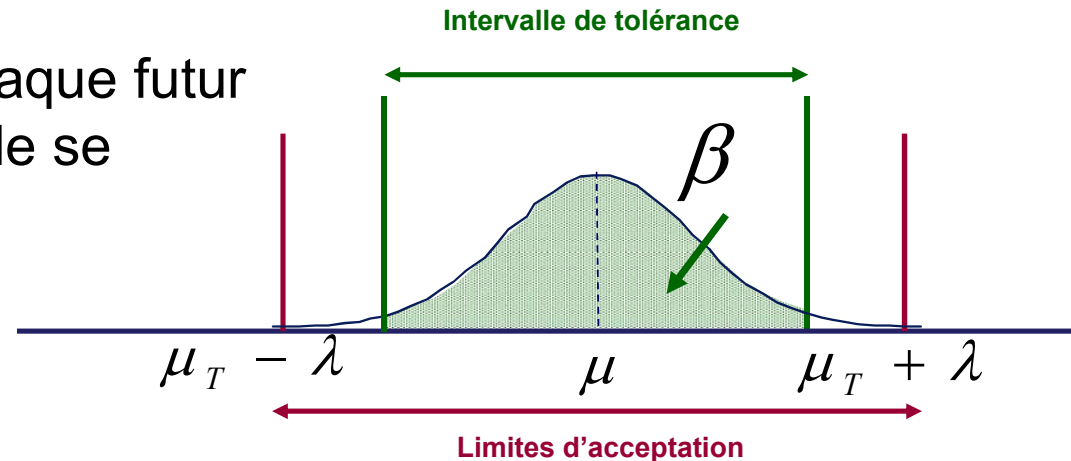


Approche de validation

Objectif de la validation

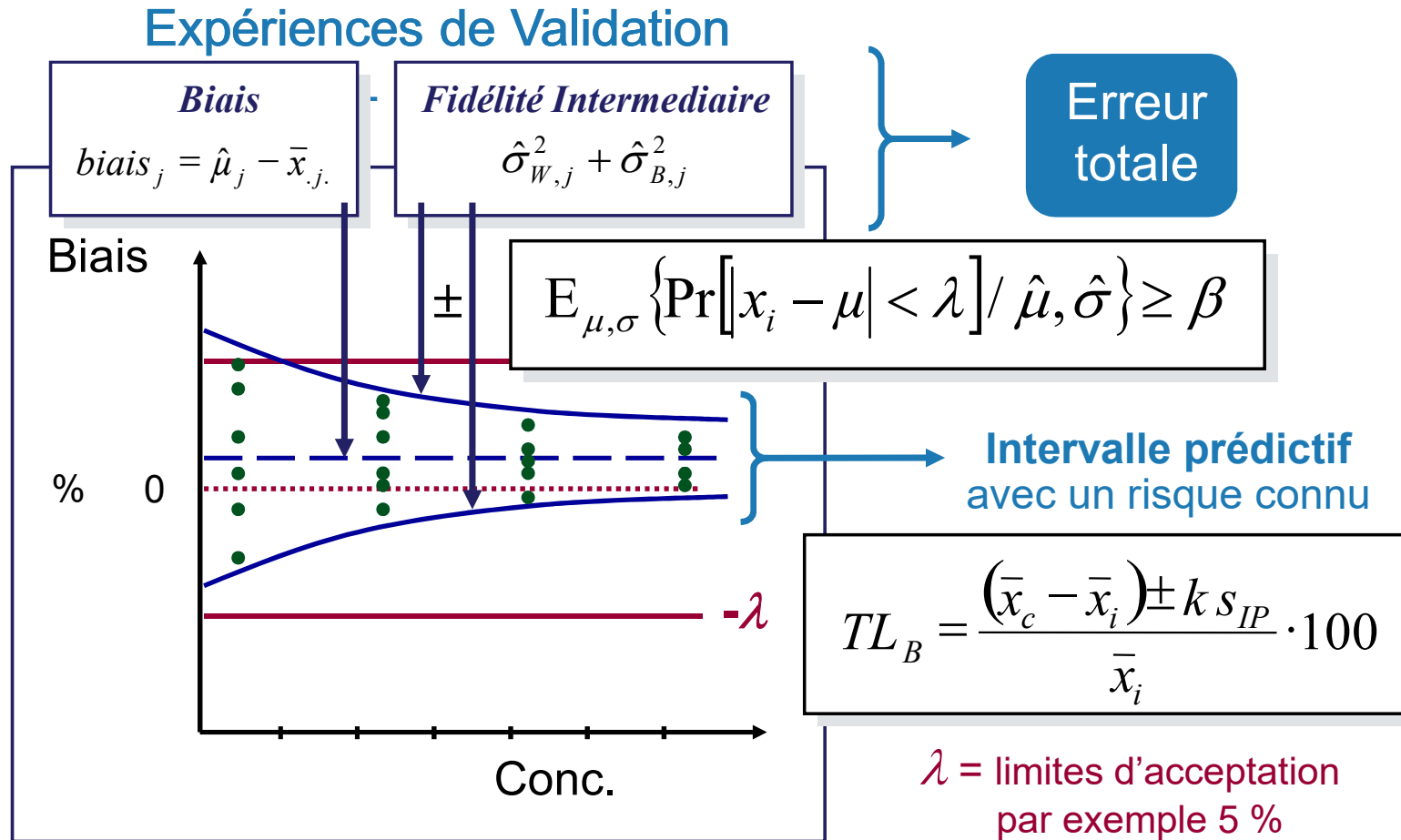
β -Expectation Tolerance Interval (β TI)

permet de prédire où chaque futur résultat a des chances de se trouver (*Wald, 1942*).

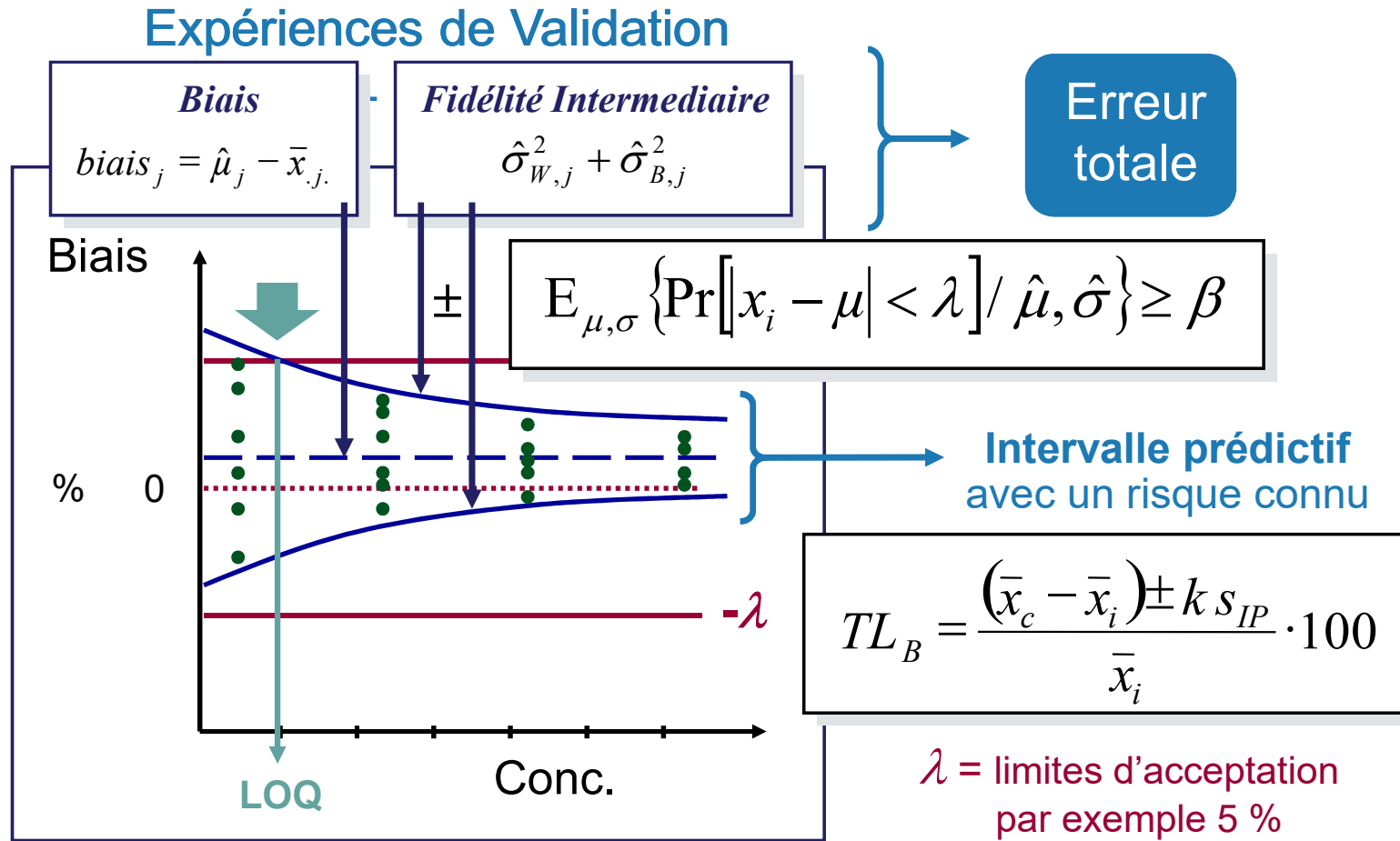


→ Si le β -expectation tolerance interval est inclus dans les limites d'acceptation, alors la **probabilité que chaque futur résultat soit dans les limites d'acceptation est au moins de β** (ex. 80%).

Approche de validation – Profil d’exactitude



Approche de validation – Profil d’exactitude



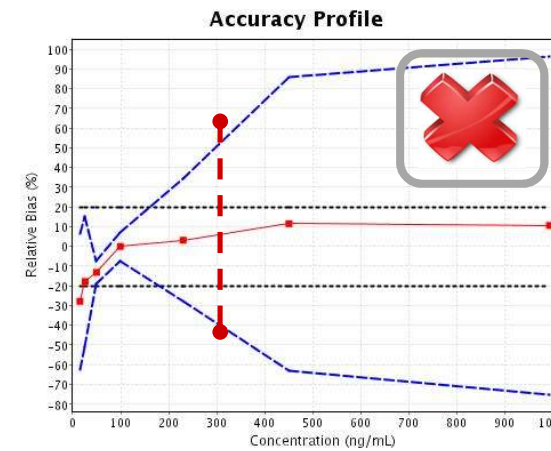
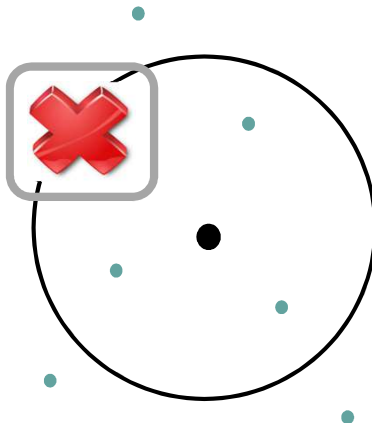
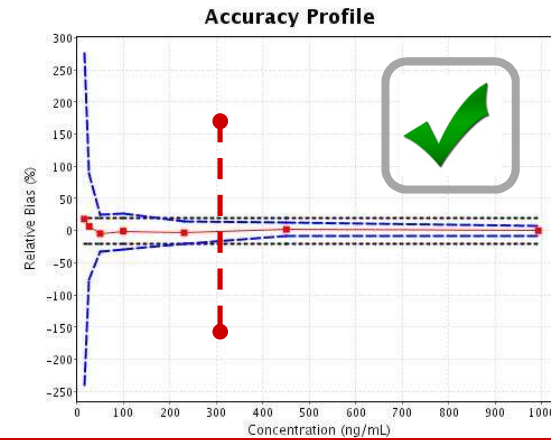
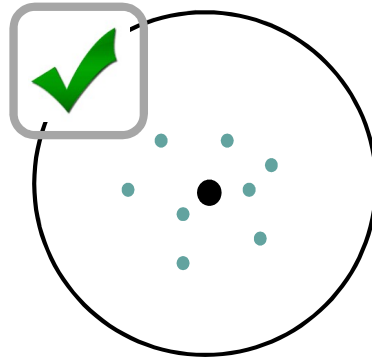
Pourquoi

Objectifs

Comment

Approche de validation – Profil d'exactitude

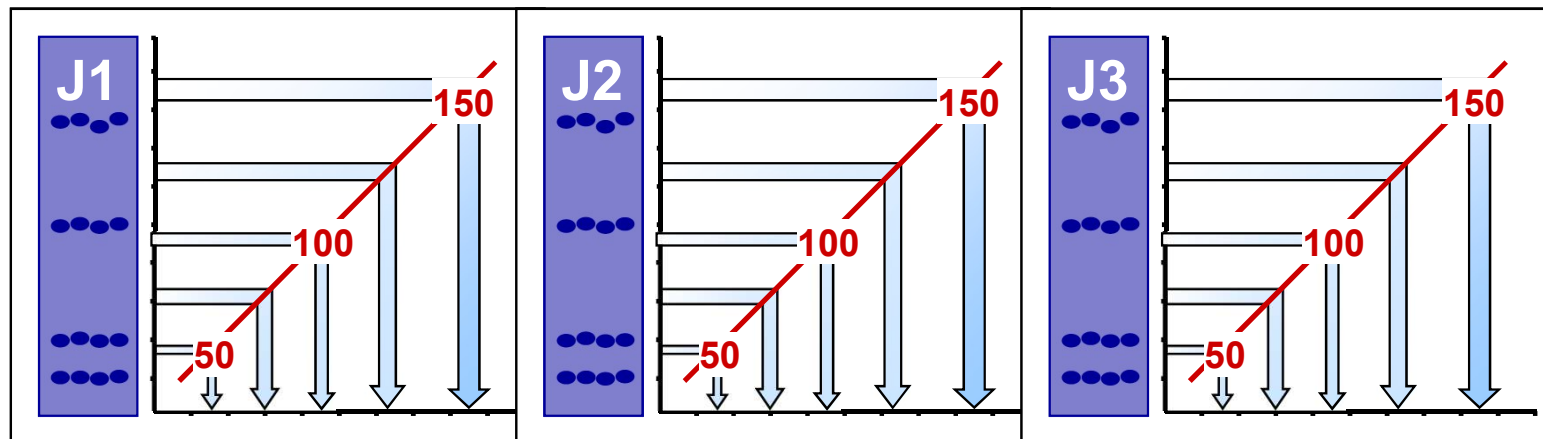
Décision



Exemples

Exemple 1

Détermination du cinéole dans une pommade par CPG après extraction liquide-liquide

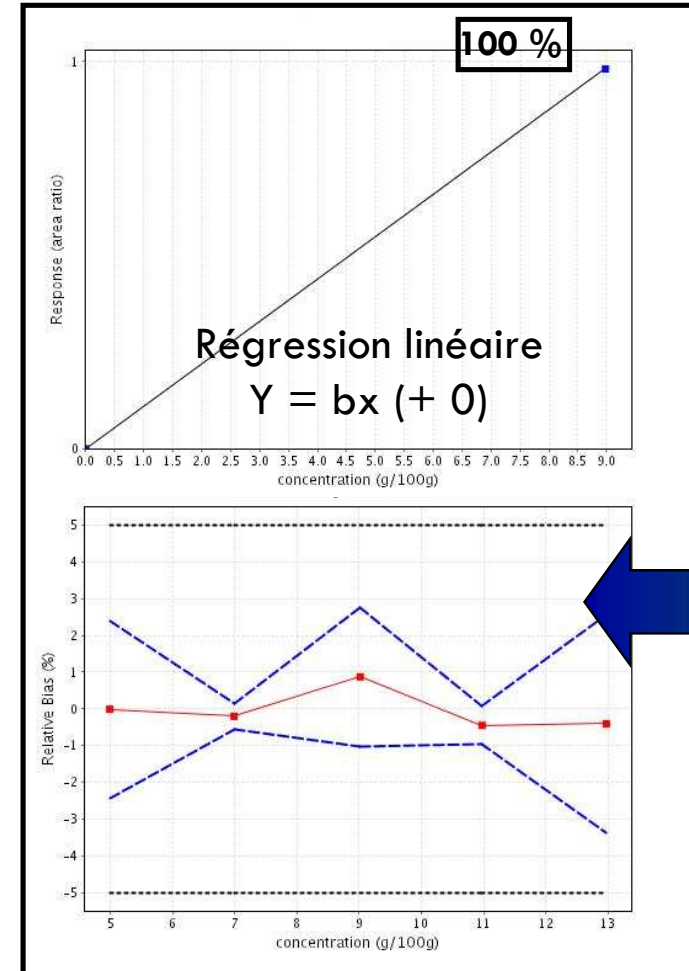
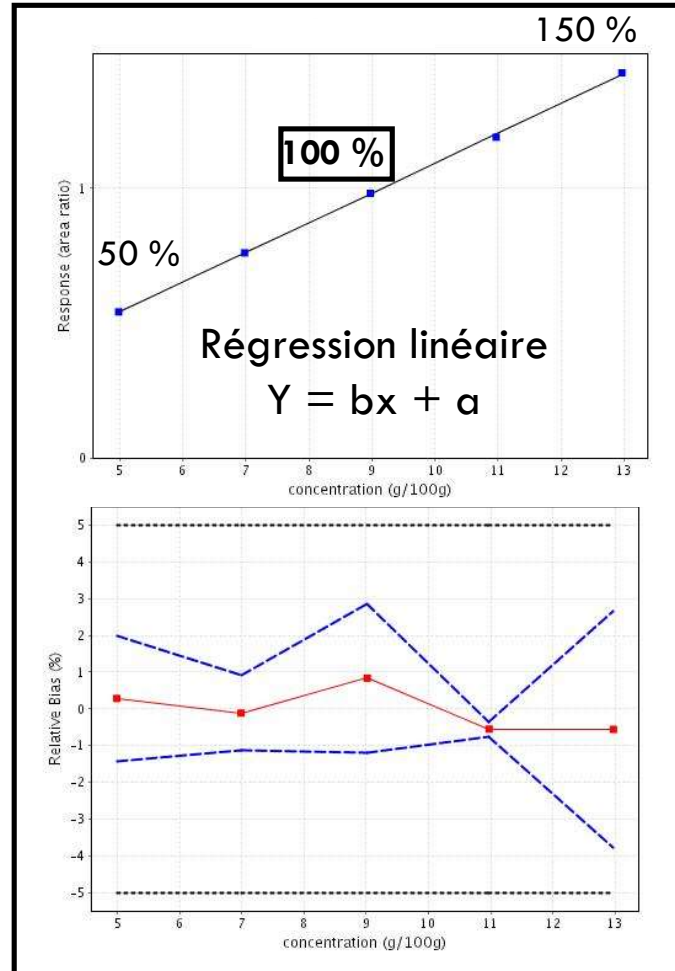


50 Standards de Calibration

● Standards de Validation

Exemples

Exemple 1



Exemples

Exemple 1

Justesse

concentration level	Mean introduced concentration (g/100g)	Mean back-calculated concentration (g/100g)	Absolute bias (g/100g)	Relative bias (%)	Recovery (%)
1.0	4.989	4.989	-5.171E-04	-1.036E-02	99.99
2.0	6.986	6.972	-1.395E-02	-0.1997	99.80
3.0	9.015	9.094	7.823E-02	0.8678	100.9
4.0	10.98	10.93	-4.918E-02	-0.4480	99.55
5.0	12.97	12.92	-5.267E-02	-0.4060	99.59

Exemples

Exemple 1

Fidélité

concentration level	Mean introduced concentration (g/100g)	Repeatability (SD)	Intermediate precision (SD)	Repeatability (RSD%)	Intermediate precision (RSD%)
1.0	4.989	2.419E-02	2.420E-02	0.4848	0.4850
2.0	6.986	3.898E-06	4.785E-03	5.580E-05	0.6852
3.0	9.015	5.778E-02	7.044E-02	0.6409	0.7813
4.0	10.98	1.158E-06	1.153E-02	1.055E-05	0.1510
5.0	12.97	1.461E-06	7.706E-02	1.126E-05	0.5940

Exemples

Exemple 1

Exactitude

concentration Level	Mean introduced concentration* (g/100g)	beta-expectation confidence limit	Relative Beta-expectation confidence limit (%)
1.0	4.989	[4.869 , 5.109]	[-2.420 , 2.399]
2.0	6.986	[6.948 , 6.995]	[-0.5400 , 0.1407]
3.0	9.015	[8.924 , 9.263]	[-1.013 , 2.748]
4.0	10.98	[10.87 , 10.99]	[-0.9699 , 7.393E-02]
5.0	12.97	[12.54 , 13.30]	[-3.357 , 2.545]

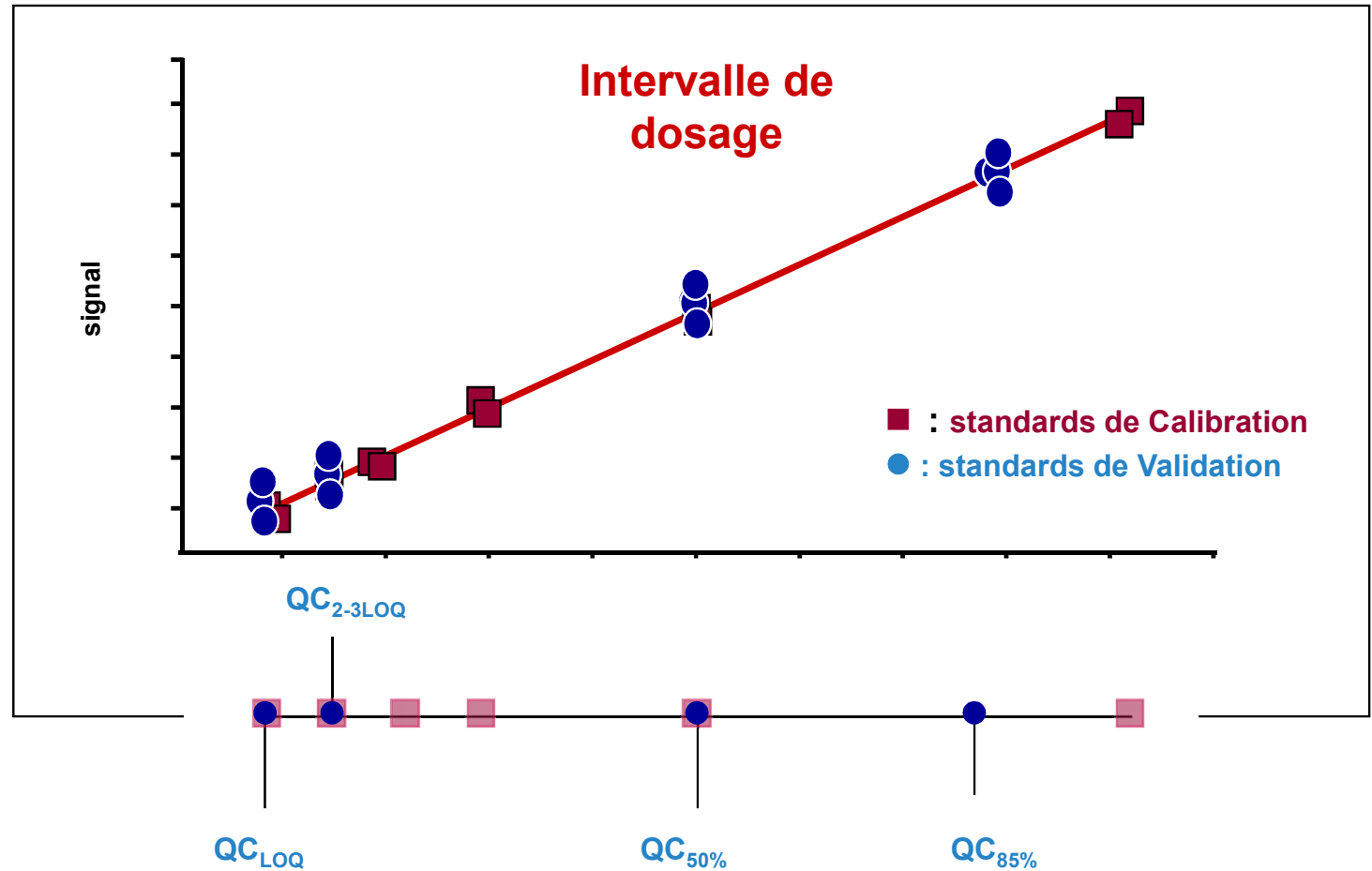
Exemples

Exemple 2

**Determination de la lopéramide dans le plasma
par CLHP / MS-MS**

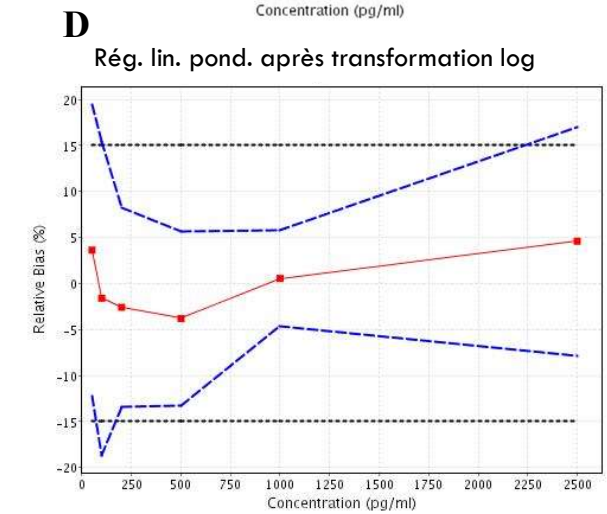
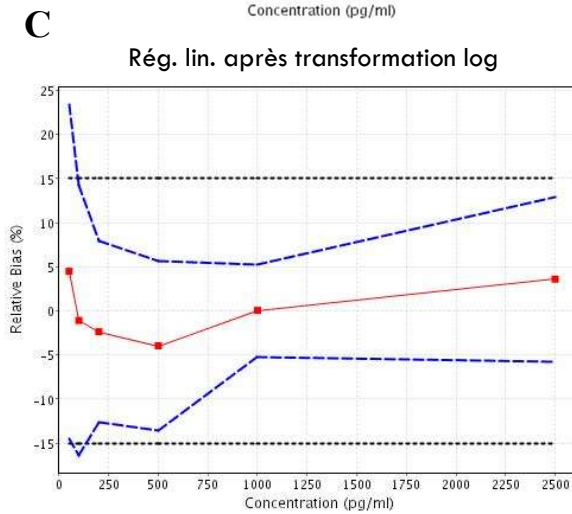
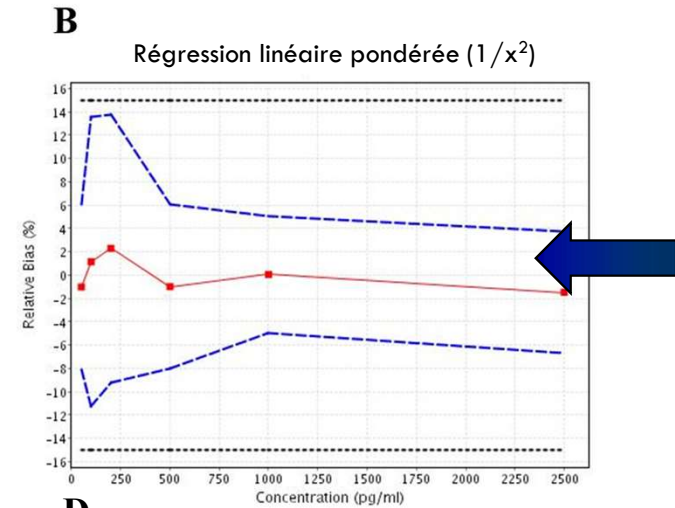
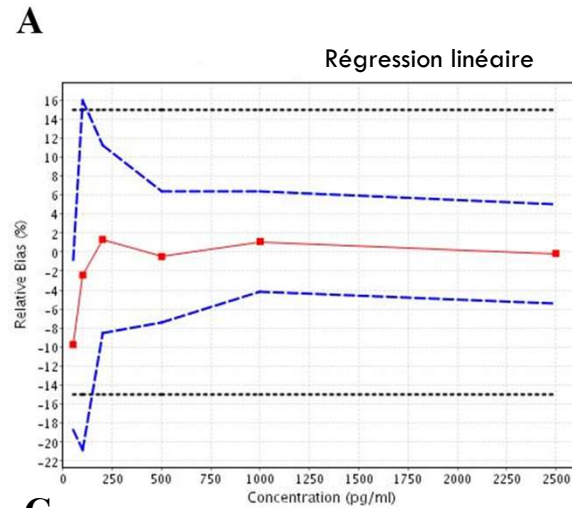
Exemples

Exemple 2



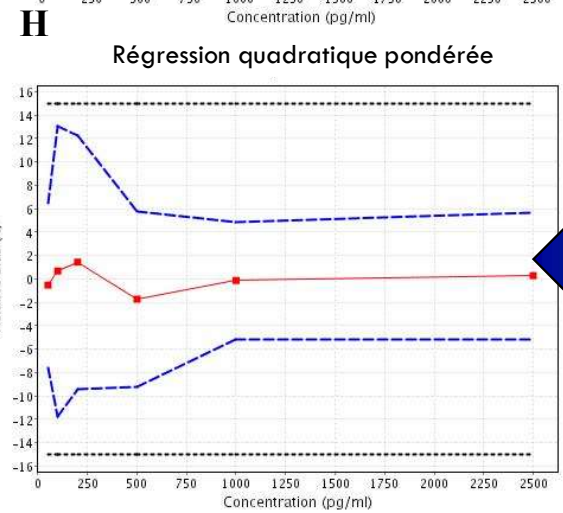
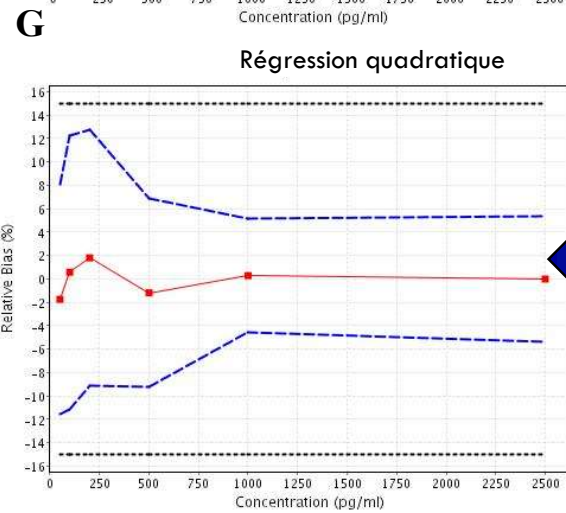
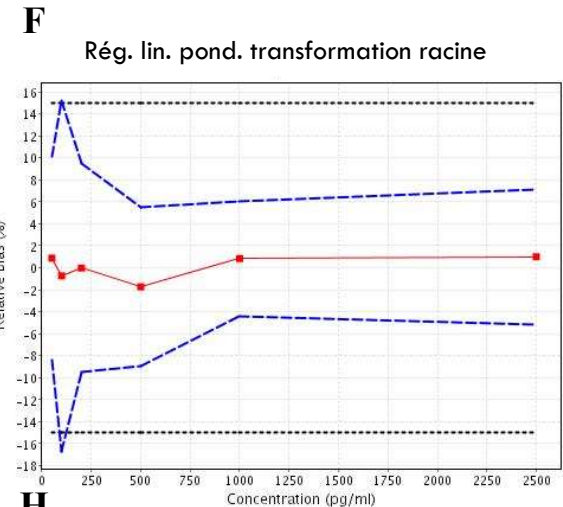
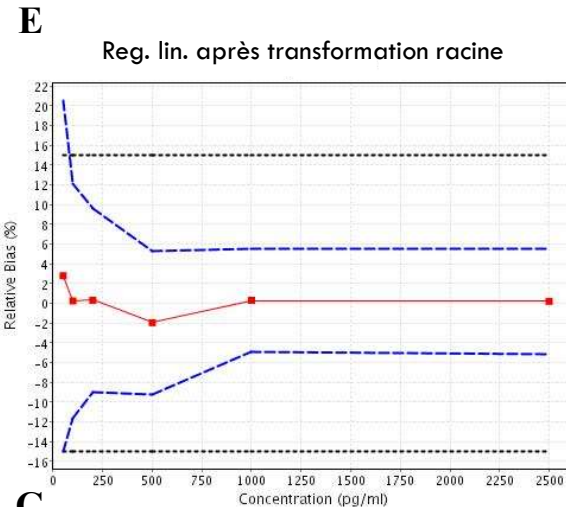
Exemples

Exemple 2



Exemples

Exemple 2



Exemples

Exemple 2

Régression linéaire pondérée ($1/x^2$)

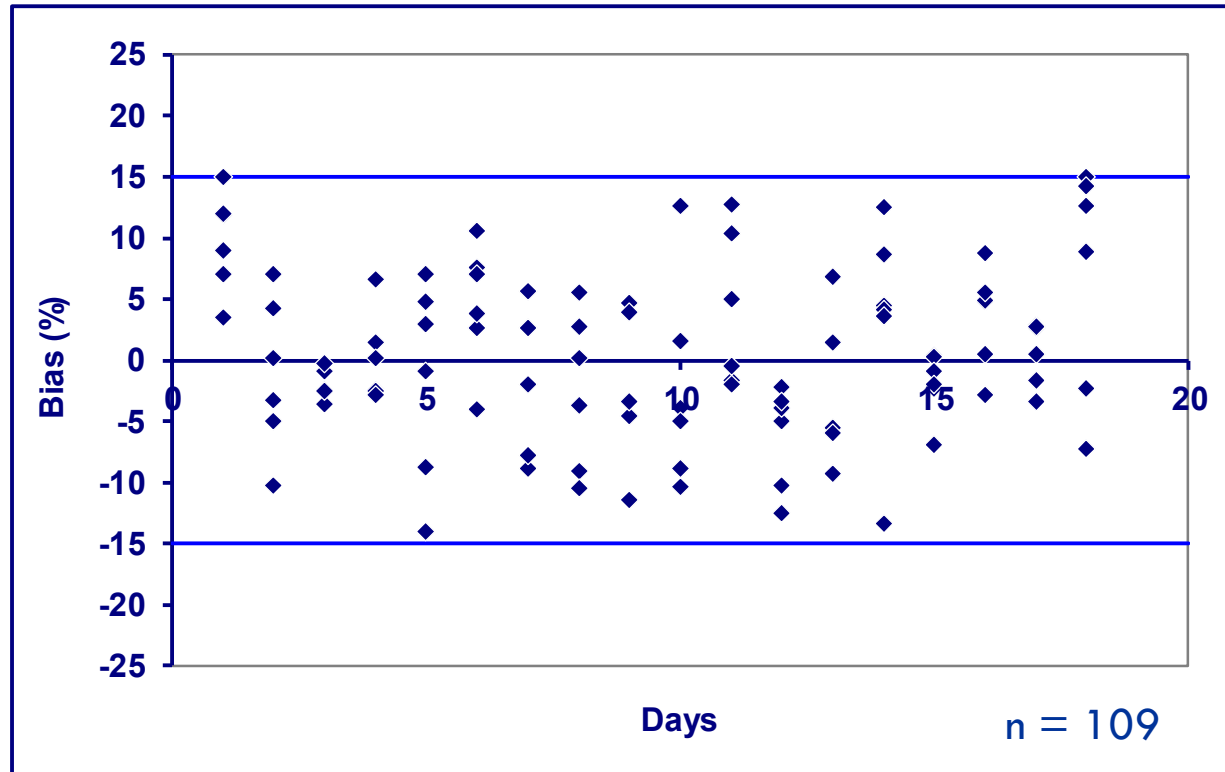
Justesse (k=3; n=6)		<u>Biais : µg/ml (Biais relatif: %)</u>	
0.05 ng/ml		-1.86	(-3.7) 96.3
0.10 ng/ml		0.23	(0.2) 100.2
0.50 ng/ml		14.68	(2.9)... 102.9
2.50 ng/ml		73.73	(2.9) 102.9

Fidélité (k=3; n=6)		
	<u>Répétabilité</u> (RSD, %)	<u>Fidélité intermédiaire</u> (RSD, %)
0.05 ng/ml	5.2	5.5
0.10 ng/ml	5.2	8.6
0.50 ng/ml	3.6	4.1
2.50 ng/ml	4.1	5.1

Exactitude (k=3; n=6)		
	<u>β-expectation confidence limit in ng/ml (%)</u>	
0.05 ng/ml	0.044 – 0.053	(-13.1 – 5.7)
0.10 ng/ml	0.080 – 0.120	(-19.8 – 19.2)
0.50 ng/ml	0.477 – 0.552	(-4.6 – 10.5)
2.50 ng/ml	2.316 – 2.832	(-7.4 – 13.3)

Exemples

Exemple 2

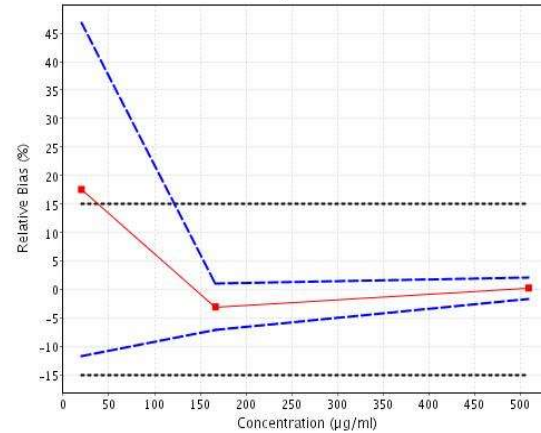


QC Chart

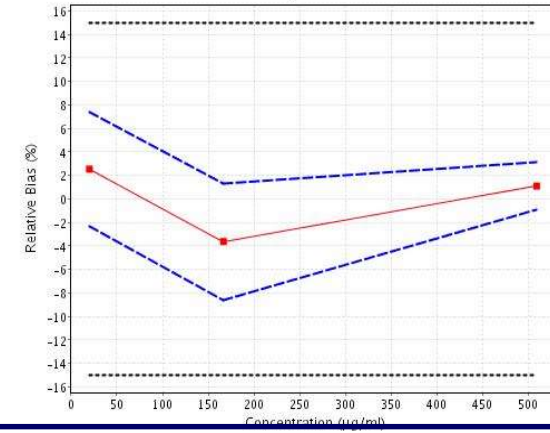
Exemples

Exemple 3

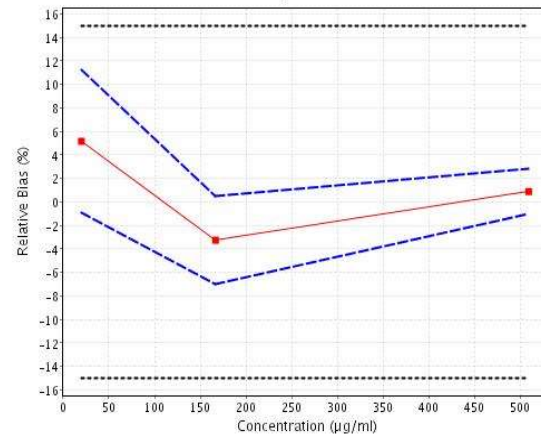
Régression linéaire



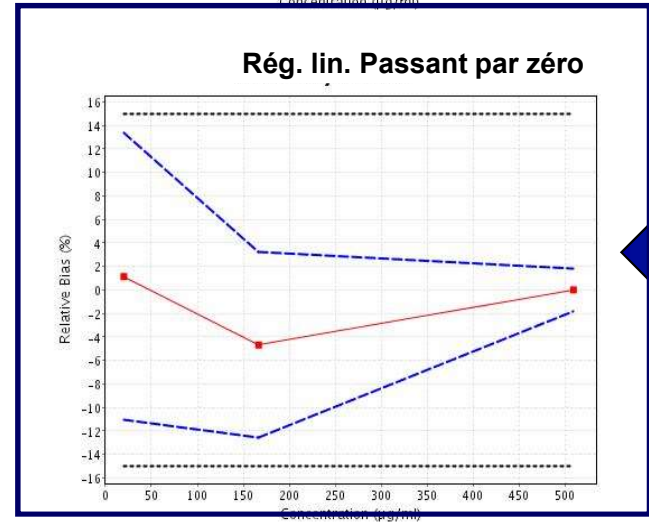
Régression linéaire pondérée (1/x)



Rég. lin. après transformation log

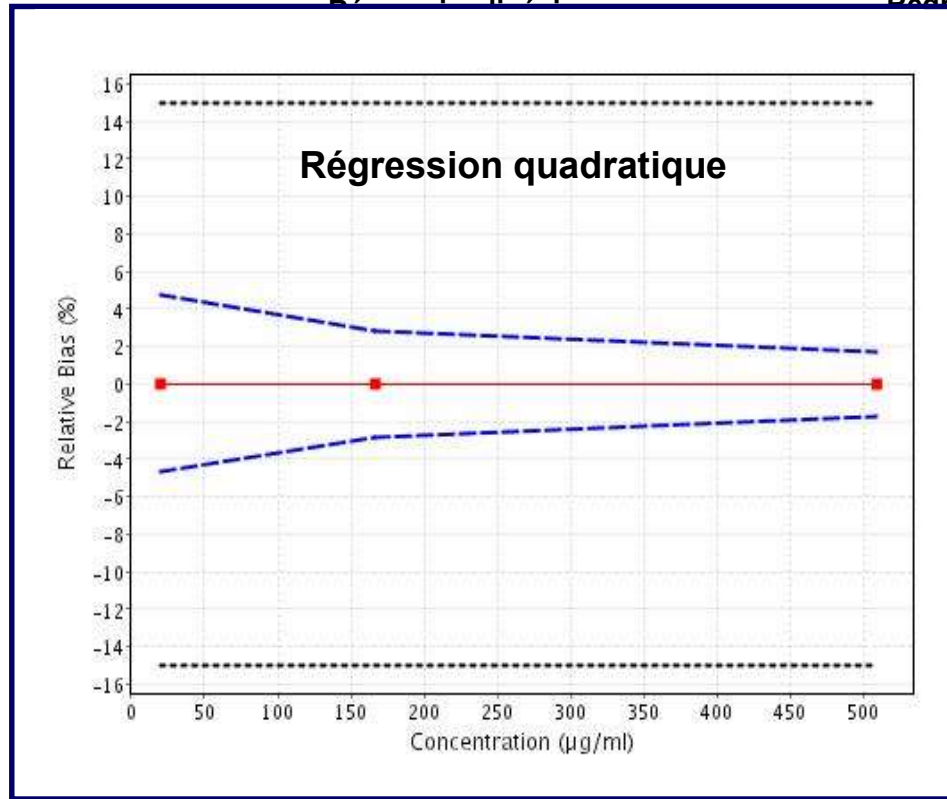


Rég. lin. Passant par zéro

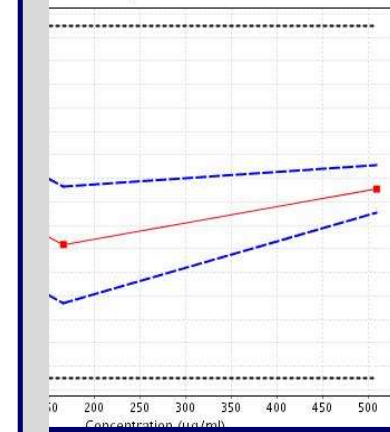


Exemples

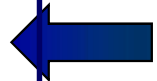
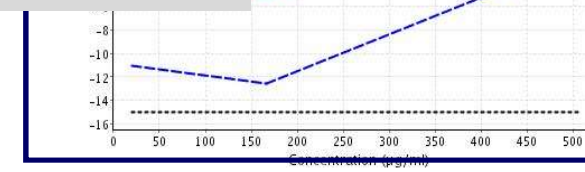
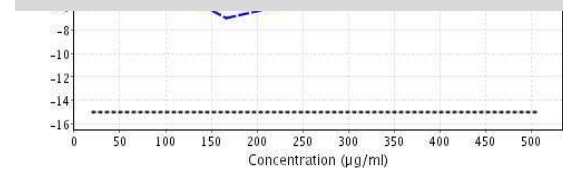
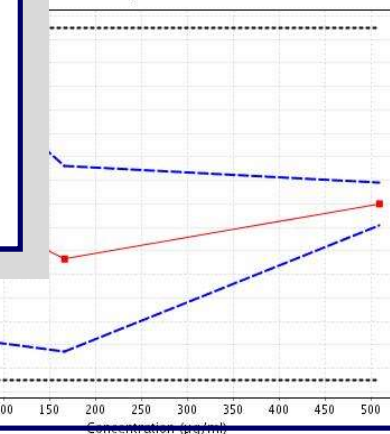
Exemple 3



Régression linéaire pondérée (1/x)

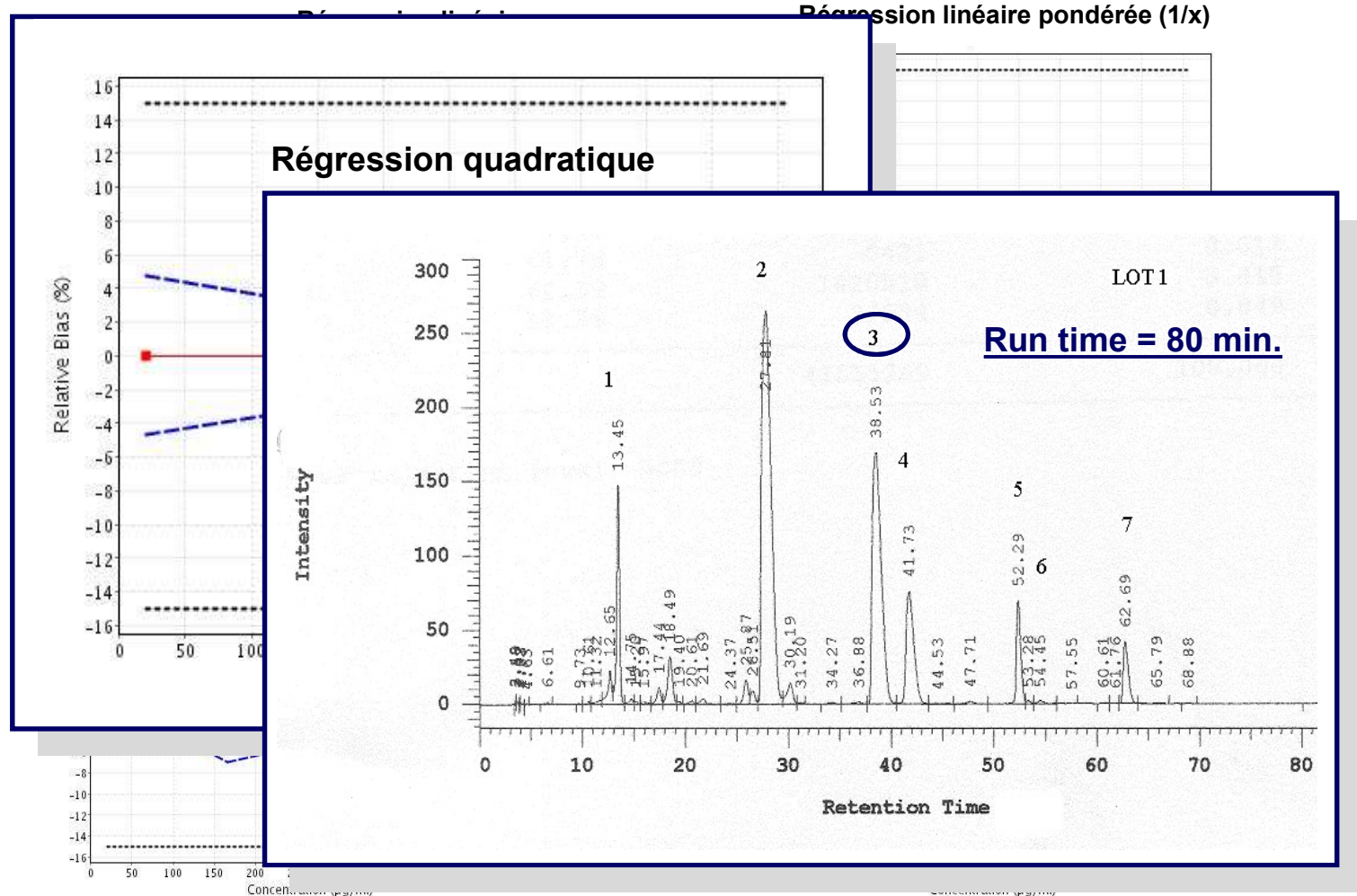


Rég. lin. Passant par zéro



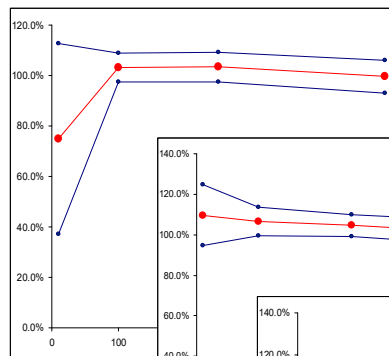
Exemples

Exemple 3



Exemples

Exemple 3



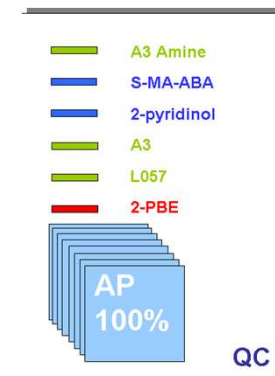
1. Linear regression (OLS)

2. External standard (1-Level)

3. Weighted linear regression $1/x$ (WLS)

4. Weighted linear regression $1/x^2$ (WLS)

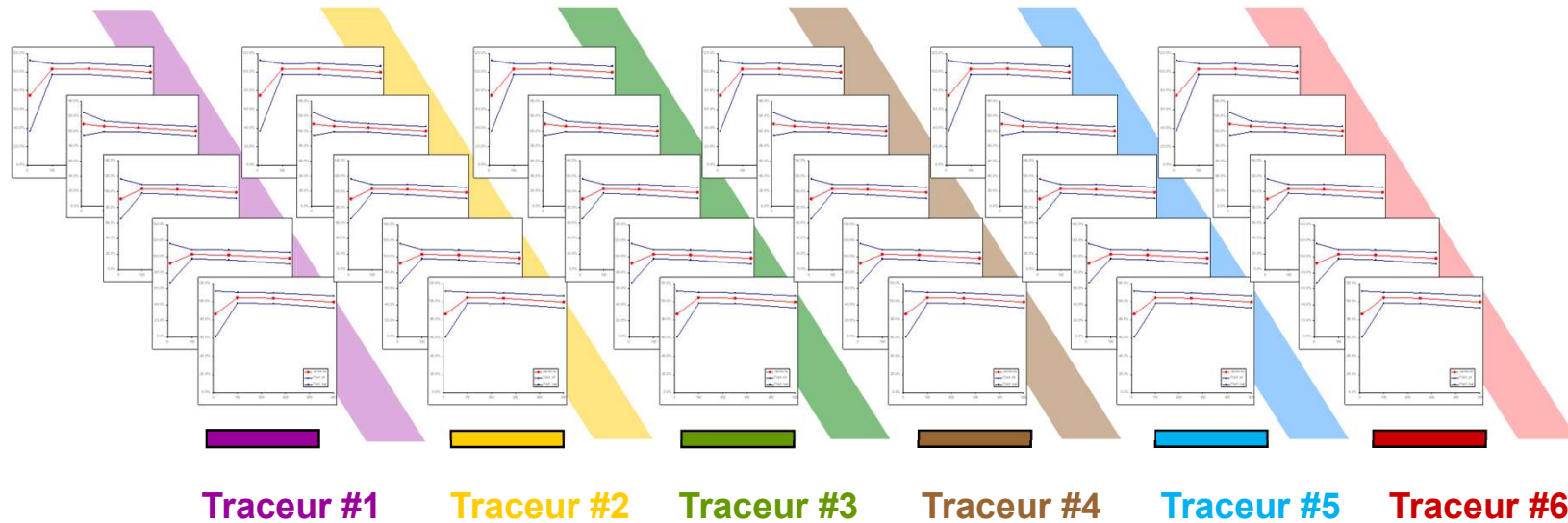
5. OLS forced through (0,0)



Traceur #1

Exemples

Exemple 3



Evaluation des résultats

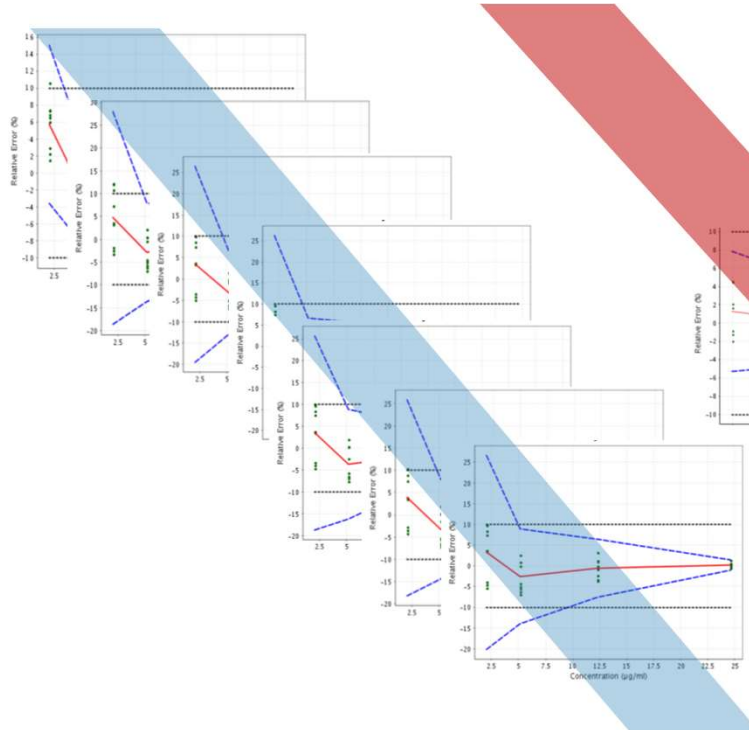
1. Chaque composé
2. Chaque modèle de calibration
3. Complexité mathématique
4. Complexité de la méthode

Pourquoi

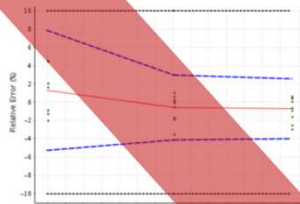
Objectifs

Comment

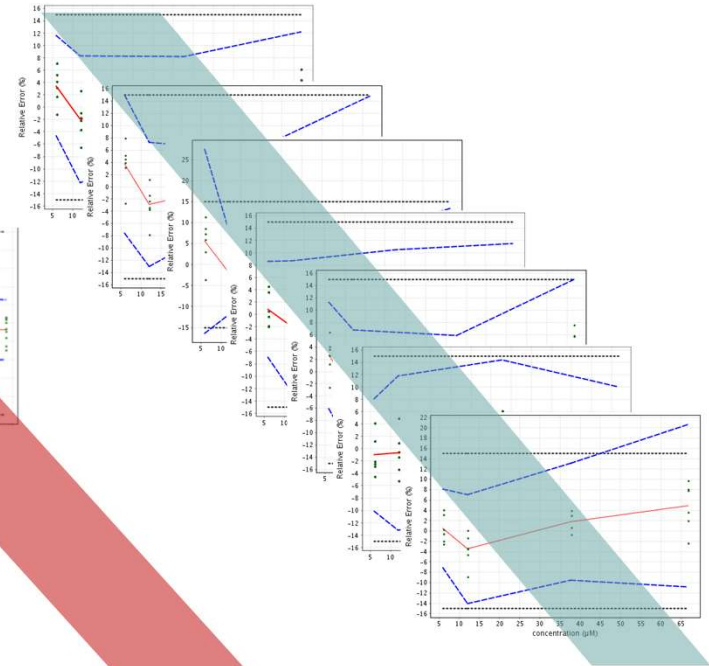
Exemples



Capillary Electrophoresis



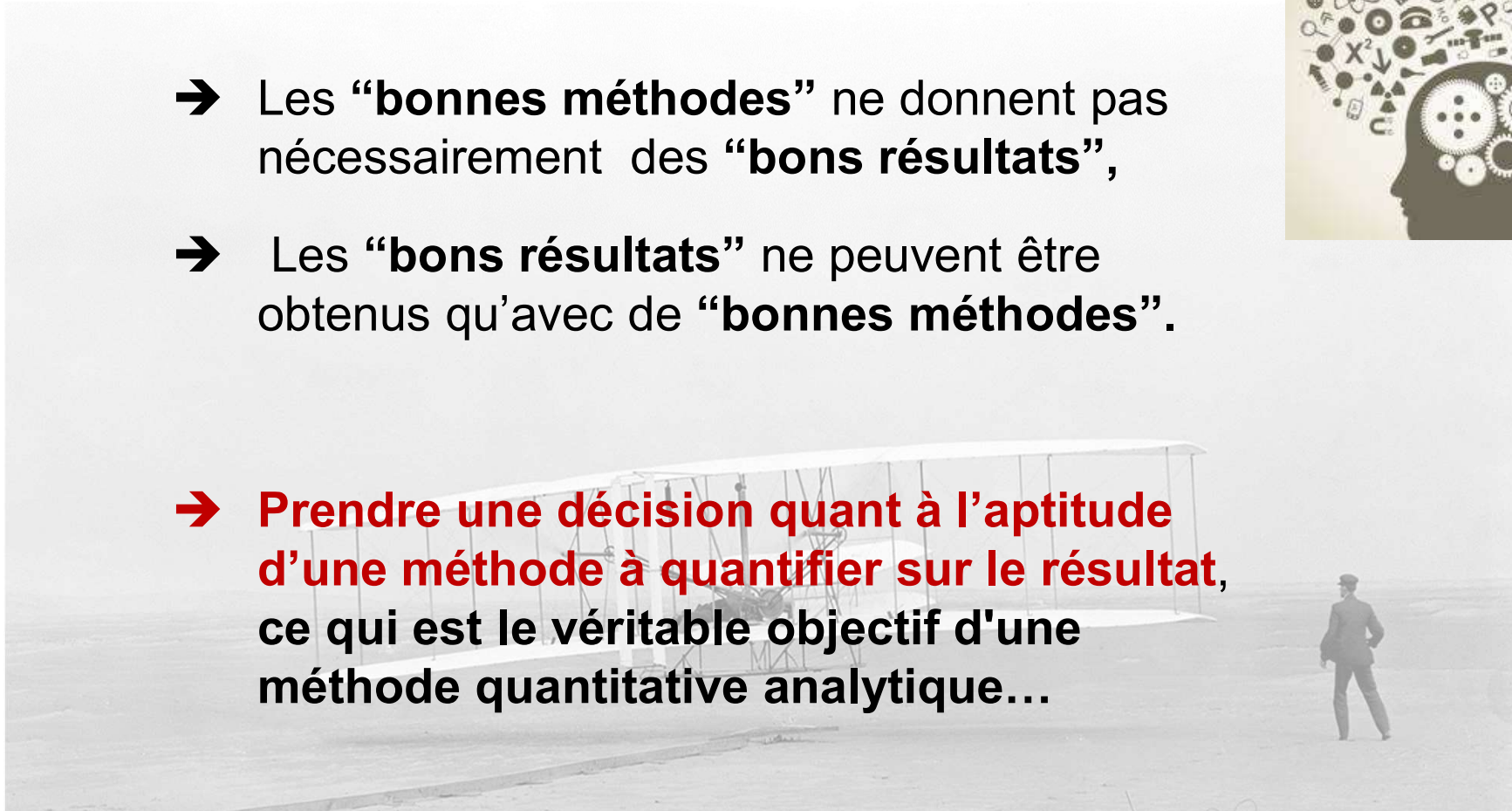
Near Infrared



Colorimetric (UV/Vis)

Conclusion

- Les “**bonnes méthodes**” ne donnent pas nécessairement des “**bons résultats**”,
- Les “**bons résultats**” ne peuvent être obtenus qu’avec de “**bonnes méthodes**”.
- **Prendre une décision quant à l’aptitude d’une méthode à quantifier sur le résultat, ce qui est le véritable objectif d’une méthode quantitative analytique...**



Conclusion

- **Identifier l'usage de la procédure** pour définir a priori **les limites d'acceptation**.
- **Ne pas confondre décision et diagnostique** dans l'usage des statistiques.
- Décider de la validité de la procédure en fonction de **son aptitude à quantifier avec exactitude**.
- Les décisions quant au modèle, à l'effet de matrice, etc. doivent donc être prises sur cette aptitude à quantifier.
- Dans ces conditions, **les risques** (et donc les coûts) **sont connus au terme de la validation**.

Remerciements

Laboratoire de Chimie Analytique Pharmaceutique

- H. Avohou, A. Dispas, H. Jambo, C. Hubert, R. Marini, P.-Y. Sacré, E. Ziemons

Arlenda

- B. Boulanger, P. Lebrun, E. Rozet

