



# 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, ...

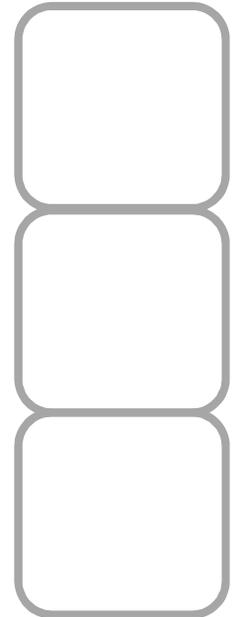
## Objectifs ?

# 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  $x\%$  ?

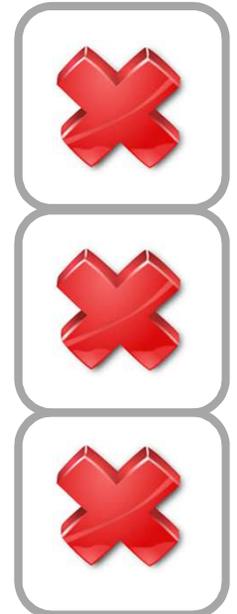


# Objectifs - Questions

## 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  $x\%$  ?

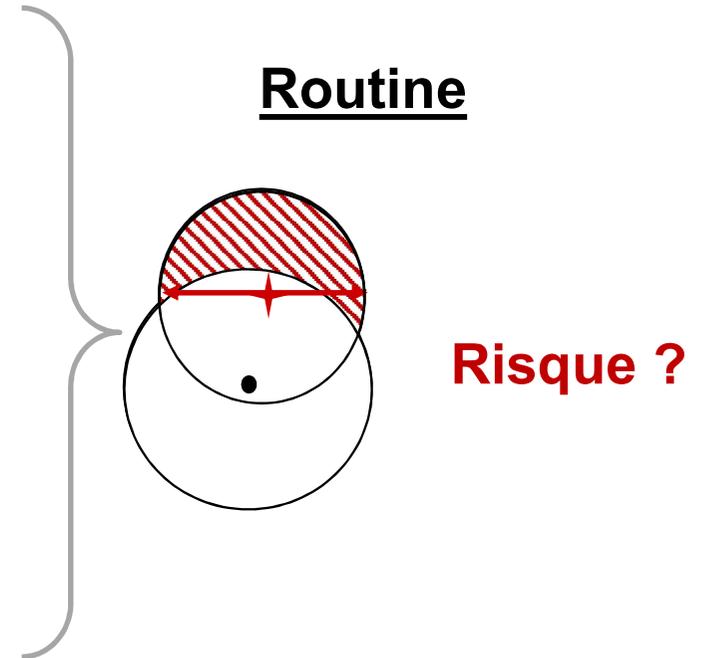
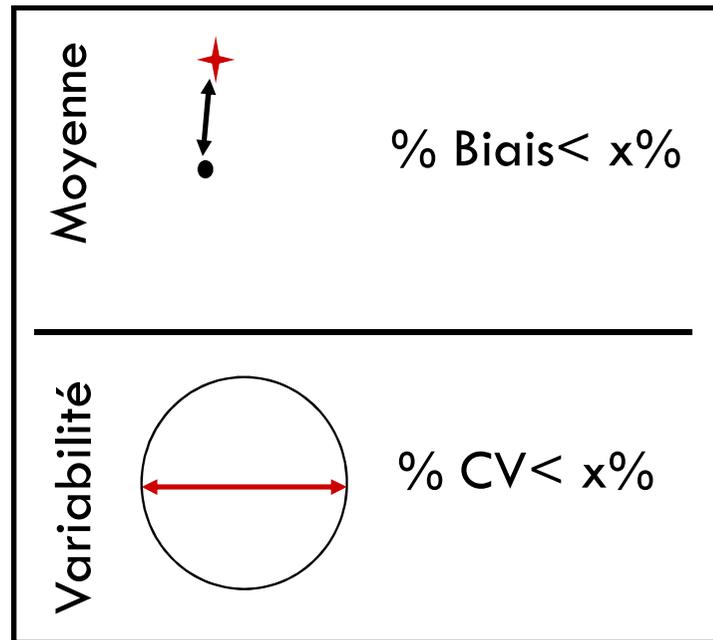


# Objectifs

## 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"**.

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

$\lambda$  = limite d'acceptation

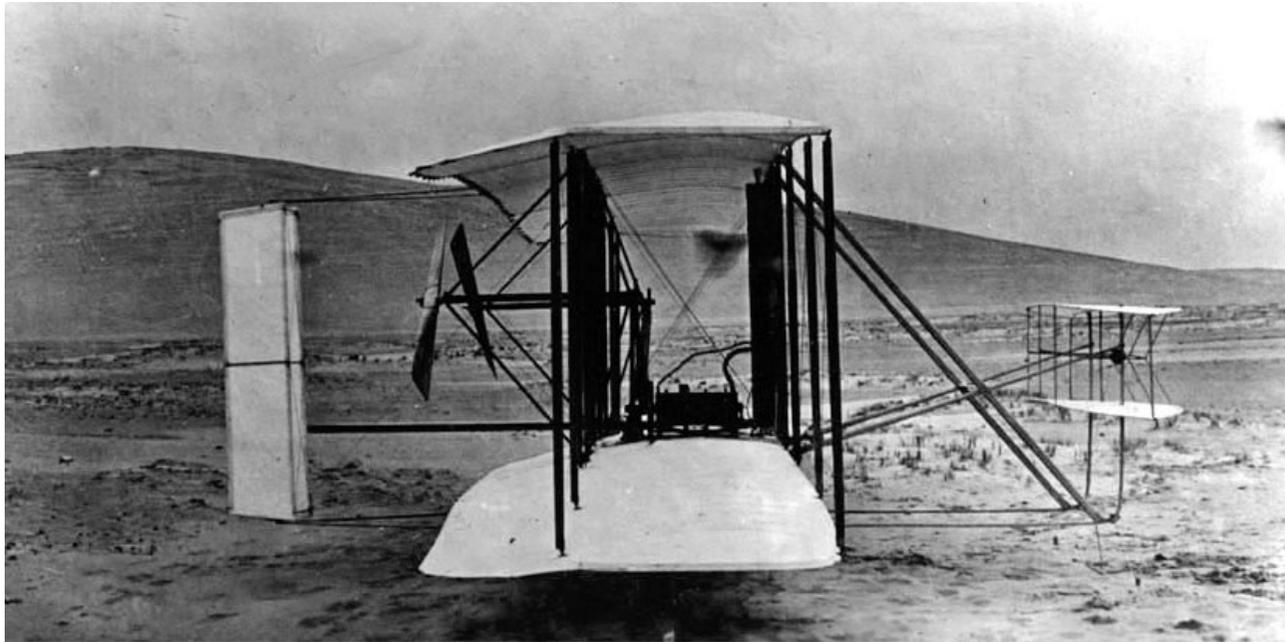
---

# Valider une méthode analytique, ...

## Comment ?

# Comment

**Comment faire pour répondre à ces objectifs?**



# Comment

---

## Comment faire pour répondre à ces objectifs?

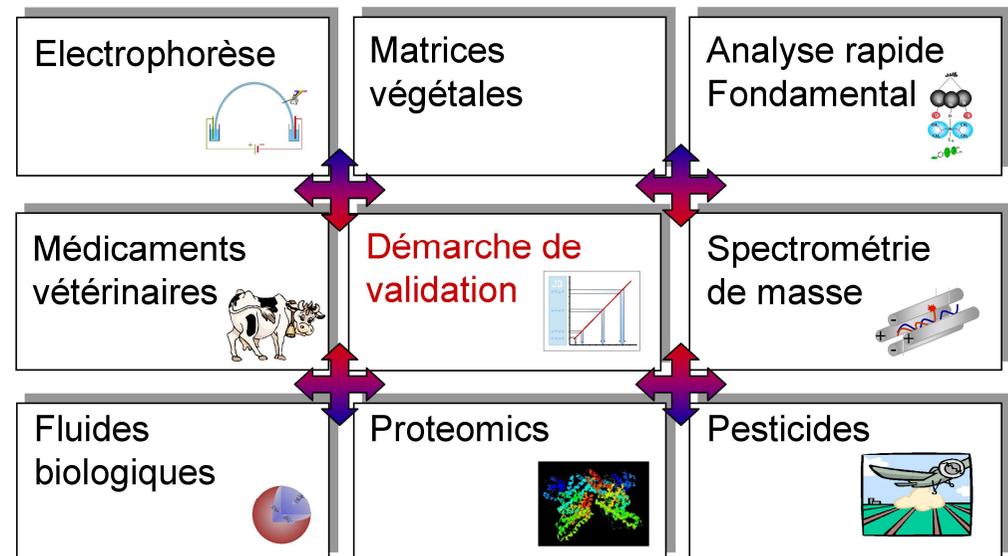
- Proposer une démarche en accord avec les textes normatifs et réglementaires (**harmonisation** / ISO).
- Simplifier l'**approche** de la validation ainsi que l'interprétation des données (Décision / Diagnostic).
- Évaluer et contrôler les **risques** liés à l'application de la méthode en routine.

# 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

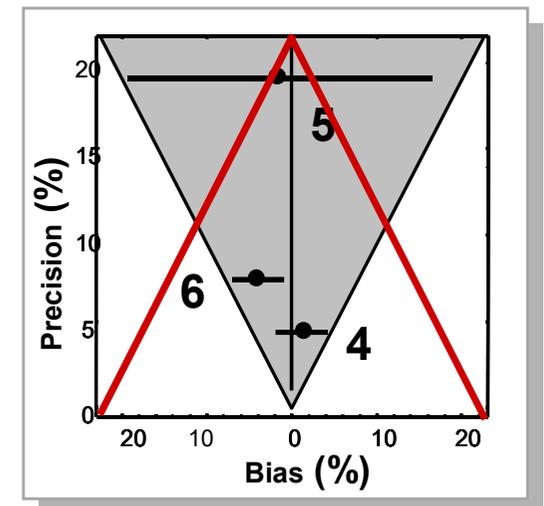
- Qualité (procédure unique)

## → 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	✓	✓			<b>Fonction de réponse</b>
Intervalle de mesure	✓	✓			✓
Robustesse	✓	✓	✓		

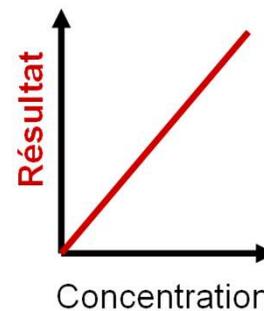
# Harmonisation des critères

## Critères de Validation

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

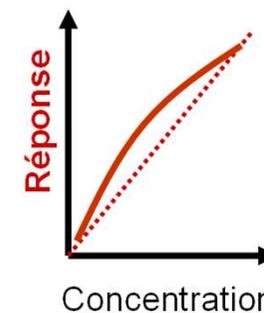
## Linéarité / Fonction de réponse

### Linéarité requise



Linéarité

### Linéarité non requise



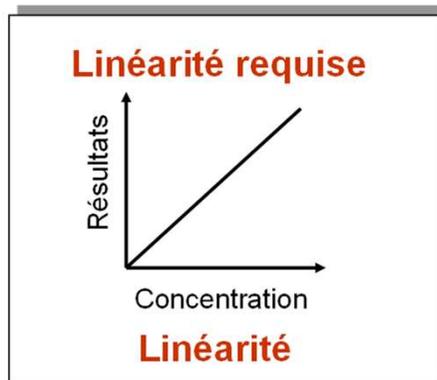
Fonction de réponse

# Harmonisation des critères

## Linéarité

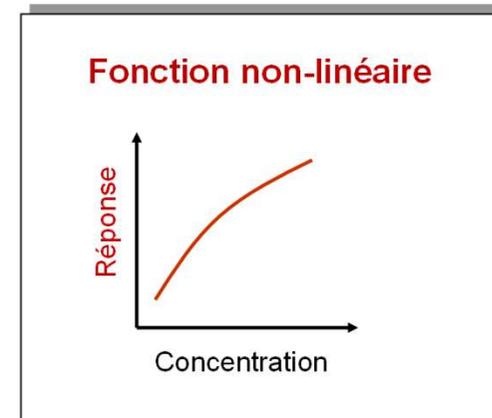
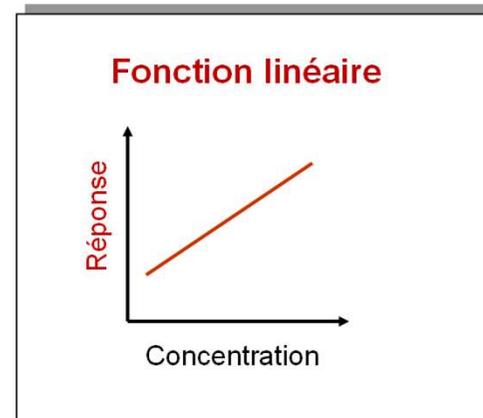
### Linéarité (ICH - PE)

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**

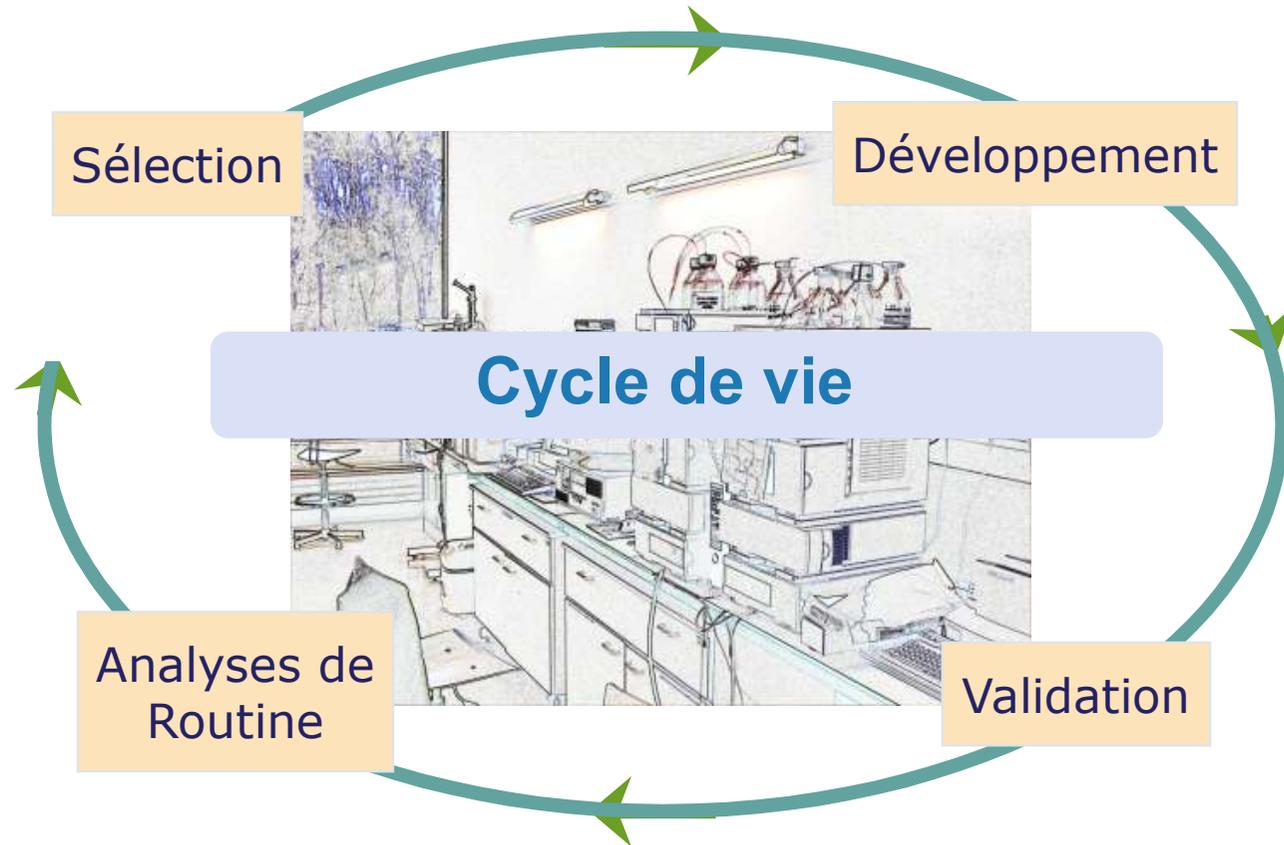
Exactitude ? = Exactitude + Fidélité



Laboratoire d'Analyse des Médicaments  
Université de Liège

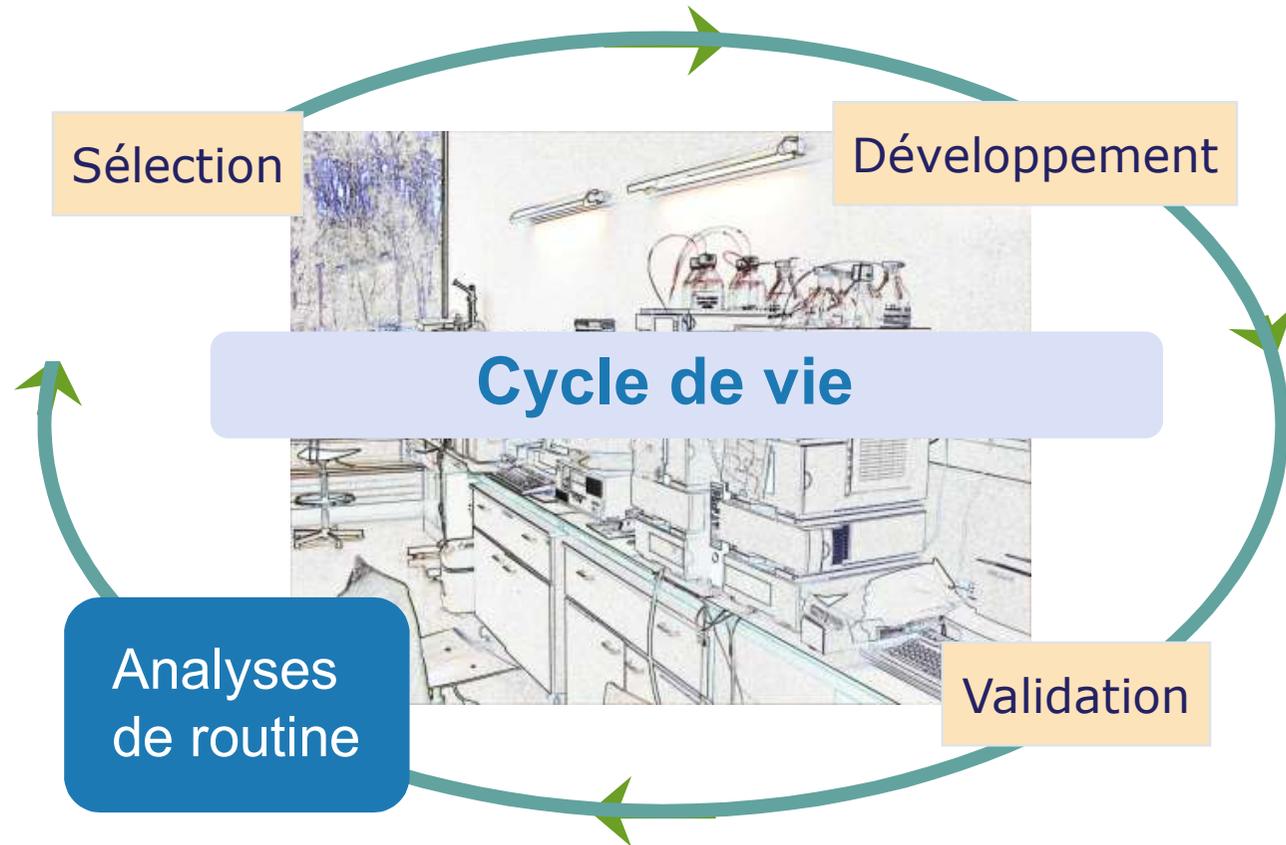
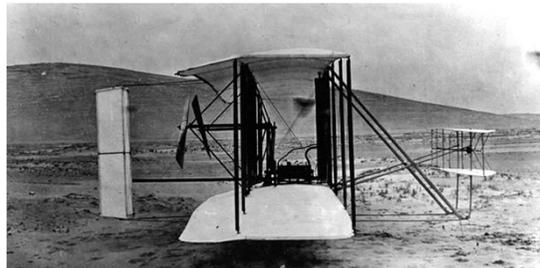
# Approche de validation

## Cycle de vie des méthodes



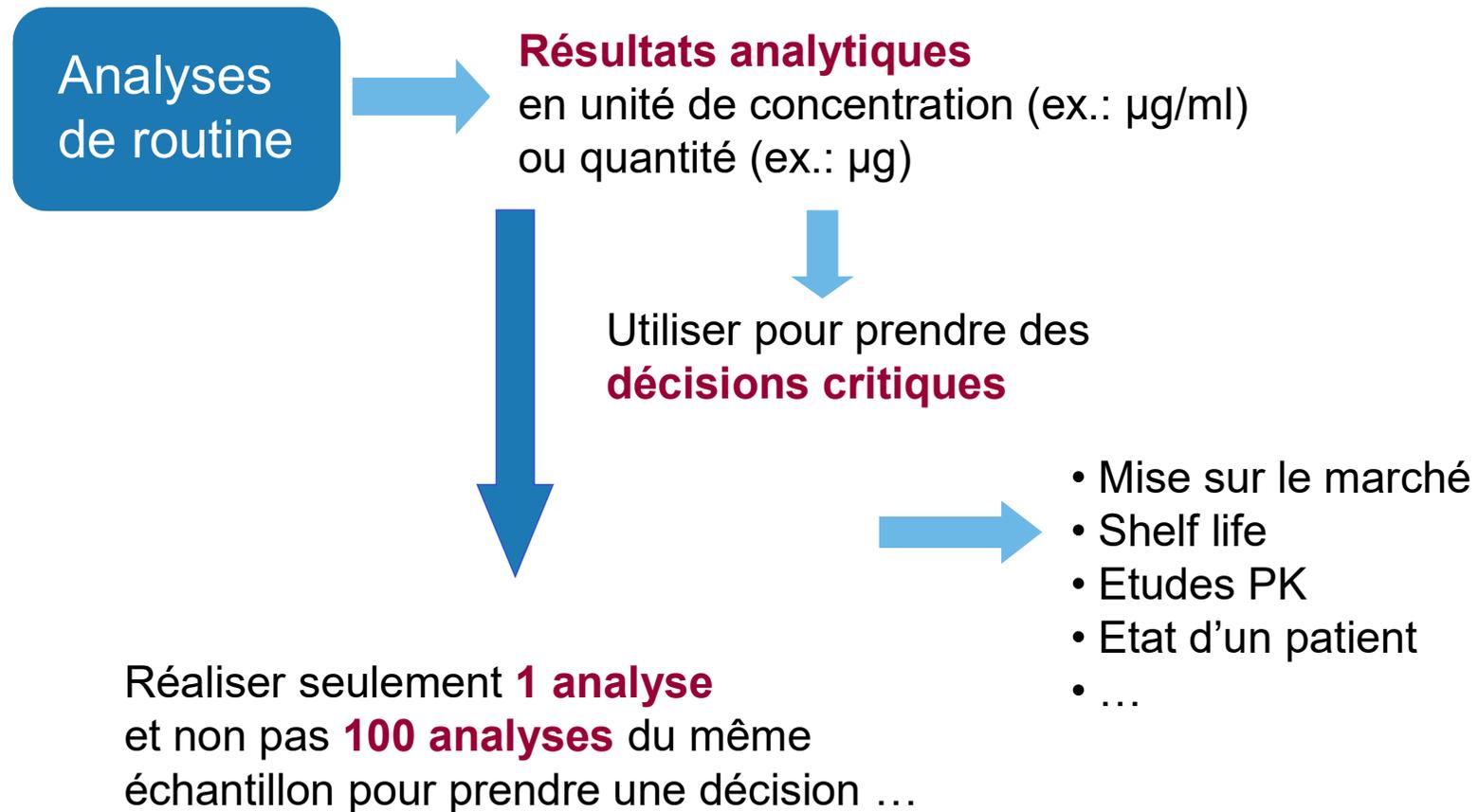
# Approche de validation

## Cycle de vie des méthodes



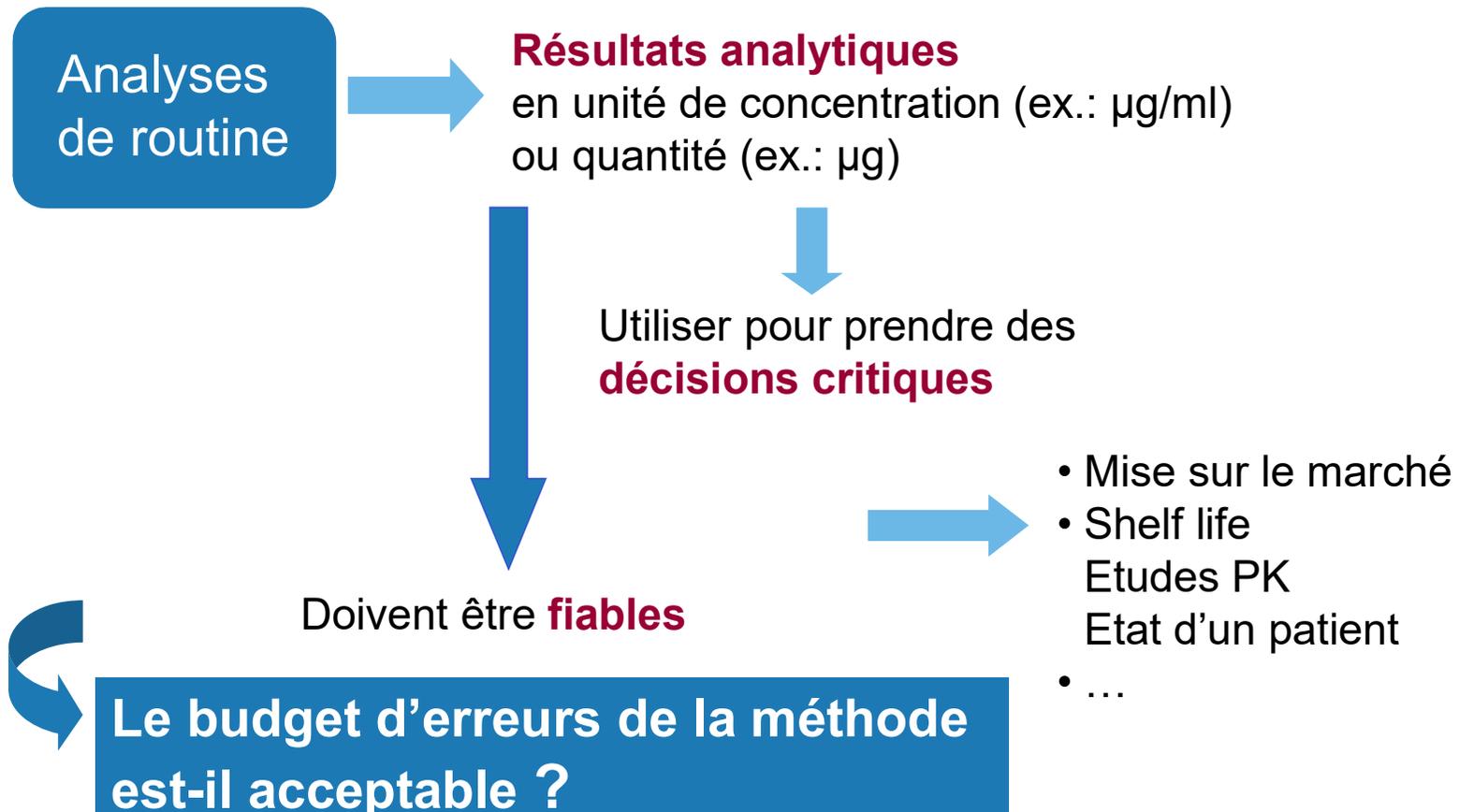
# Approche de validation

## Cycle de vie des méthodes



# Approche de validation

## Cycle de vie des méthodes

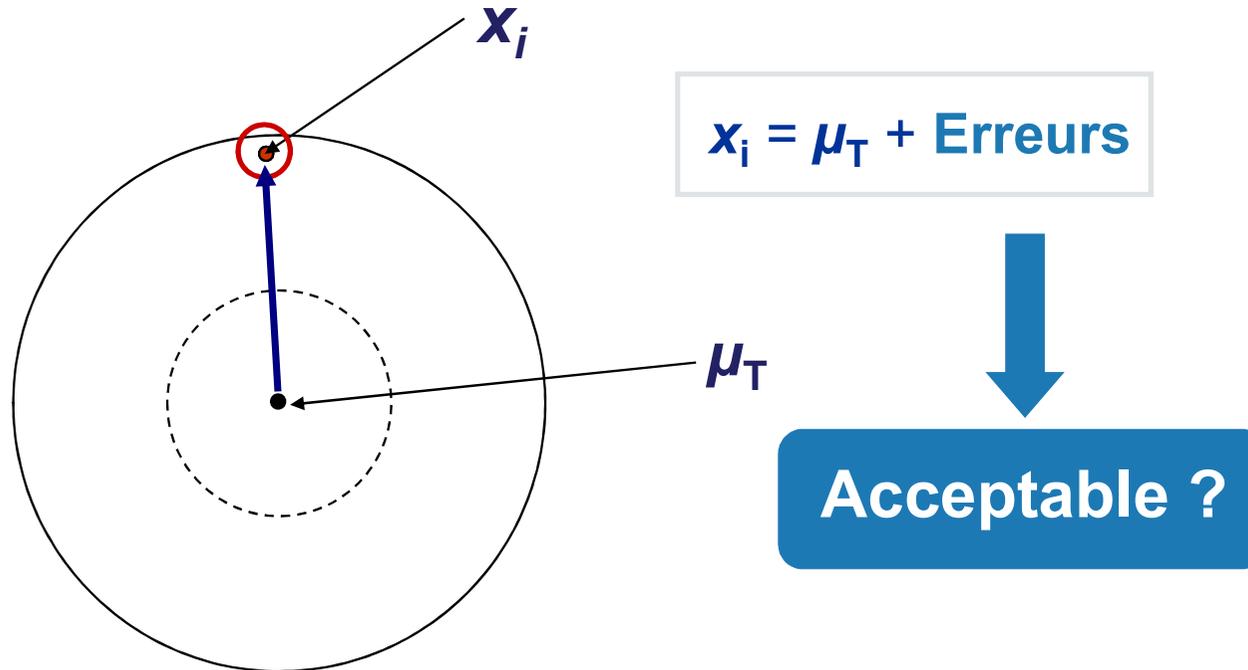


# Approche de validation

## Résultat en routine

$x_i$  = résultat observé

$\mu_T$  = vraie valeur inconnue

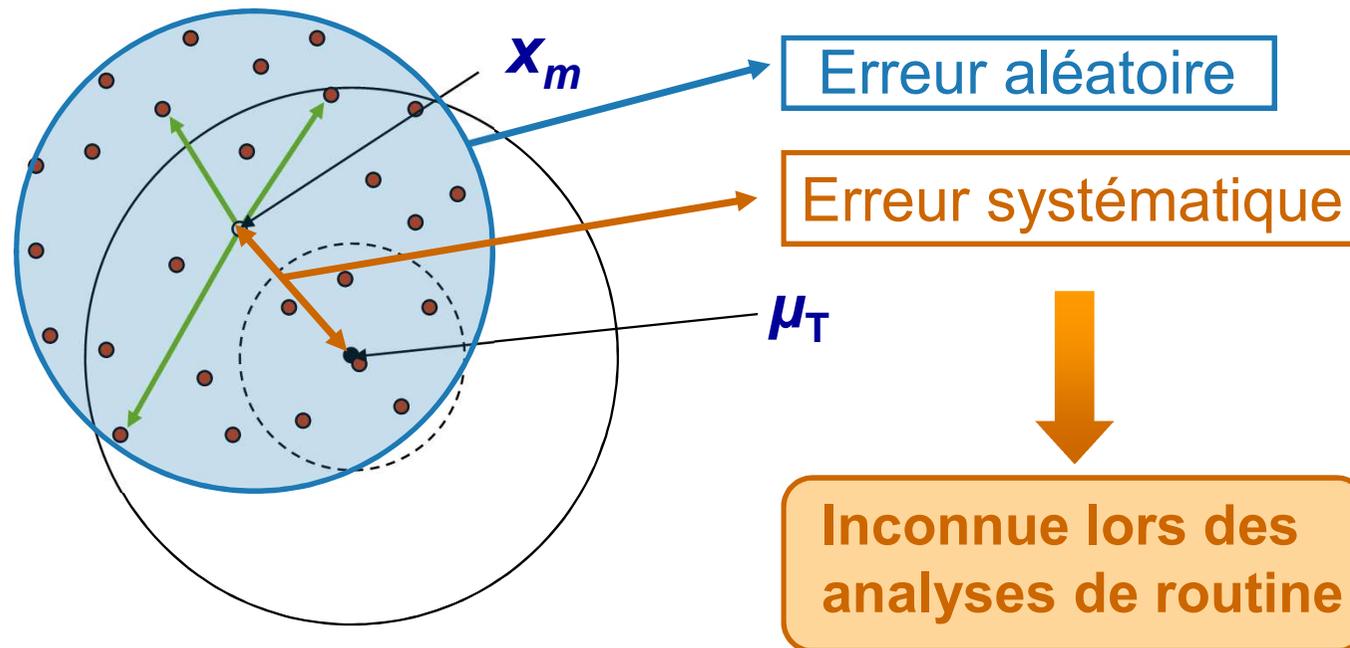


# Approche de validation

## Erreurs analytiques

$X_m$  = moyenne des résultats observés

$\mu_T$  = vraie valeur inconnue



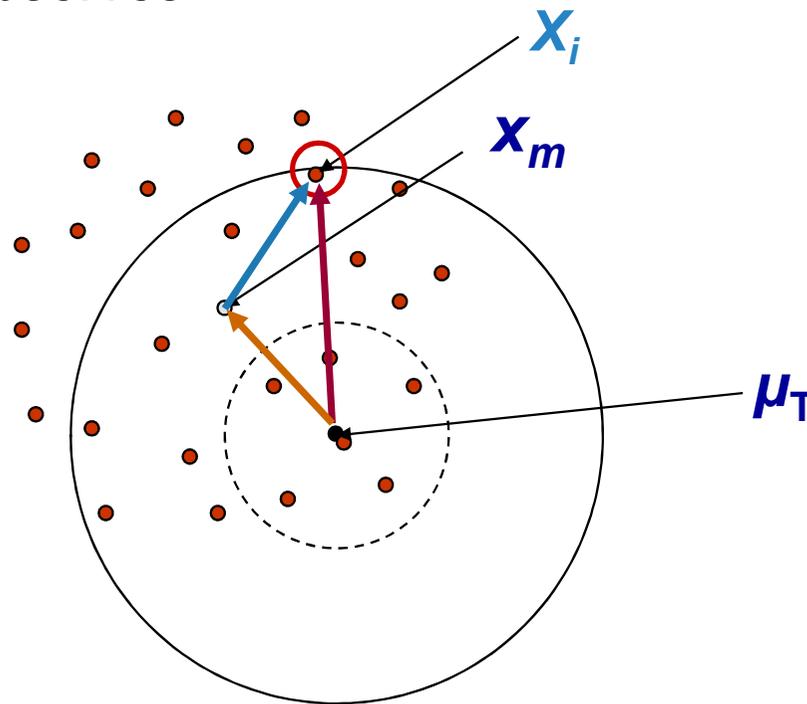
# Approche de validation

## Erreurs analytiques

$X_m$  = moyenne des résultats observés

$\mu_T$  = 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

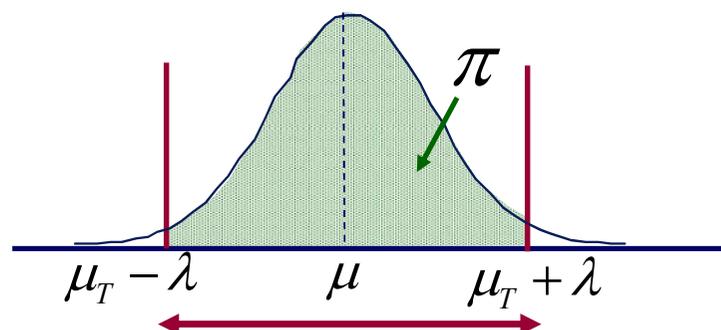
## Objectif de la validation

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.

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

$\lambda$  = limites d'acceptation prédéfinies

$\pi_{\min}$  = 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

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

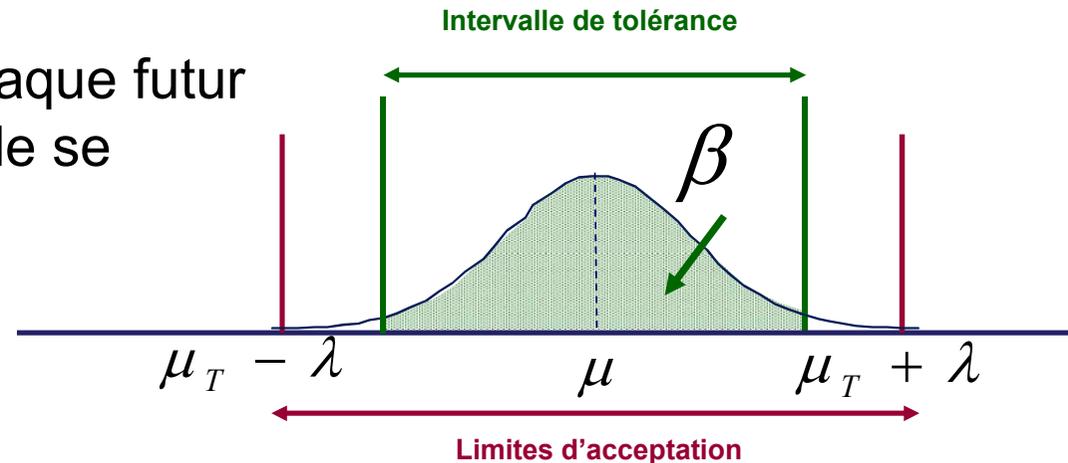


# Approche de validation

## Objectif de la validation

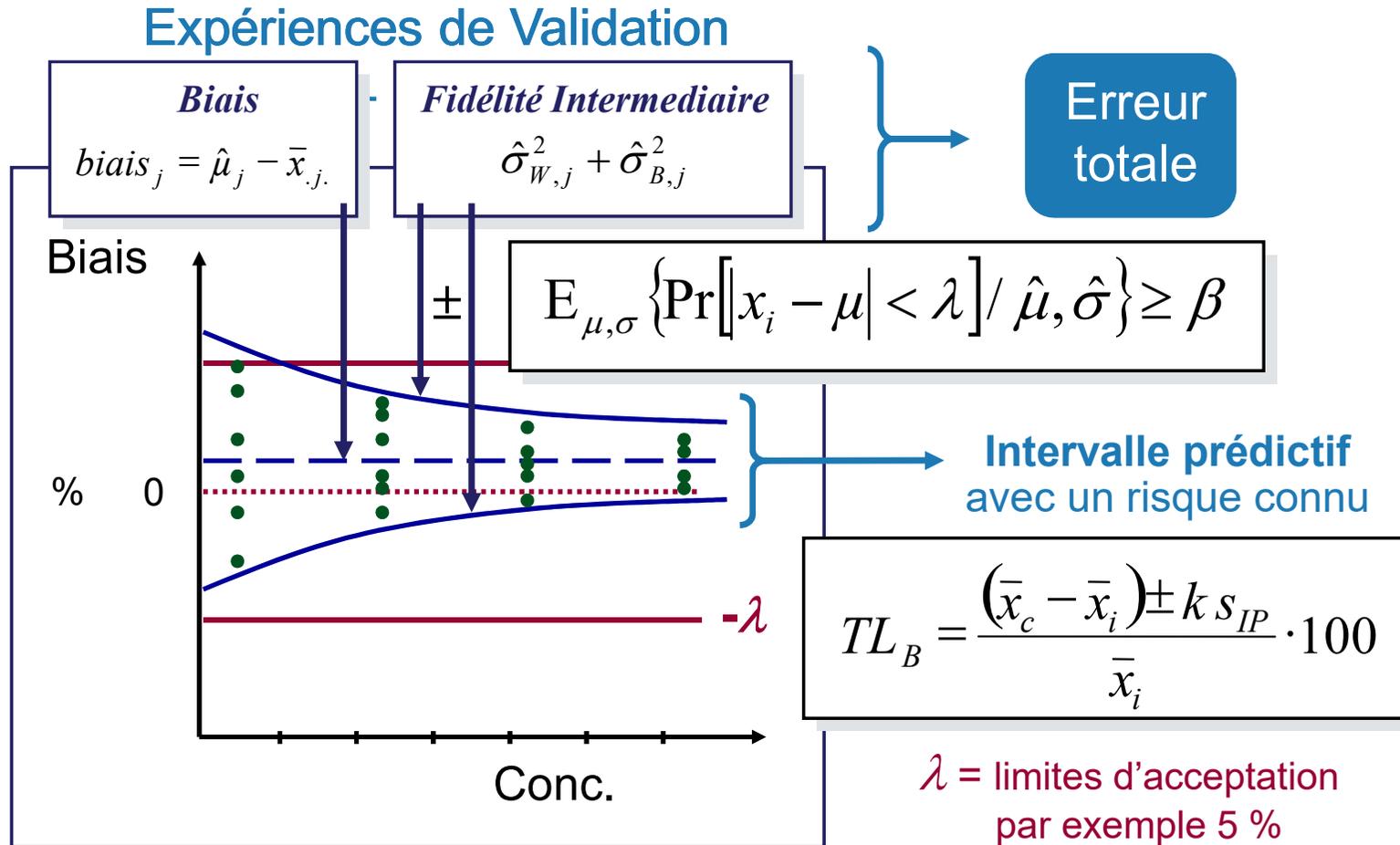
### $\beta$ -Expectation Tolerance Interval ( $\beta$ TI)

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

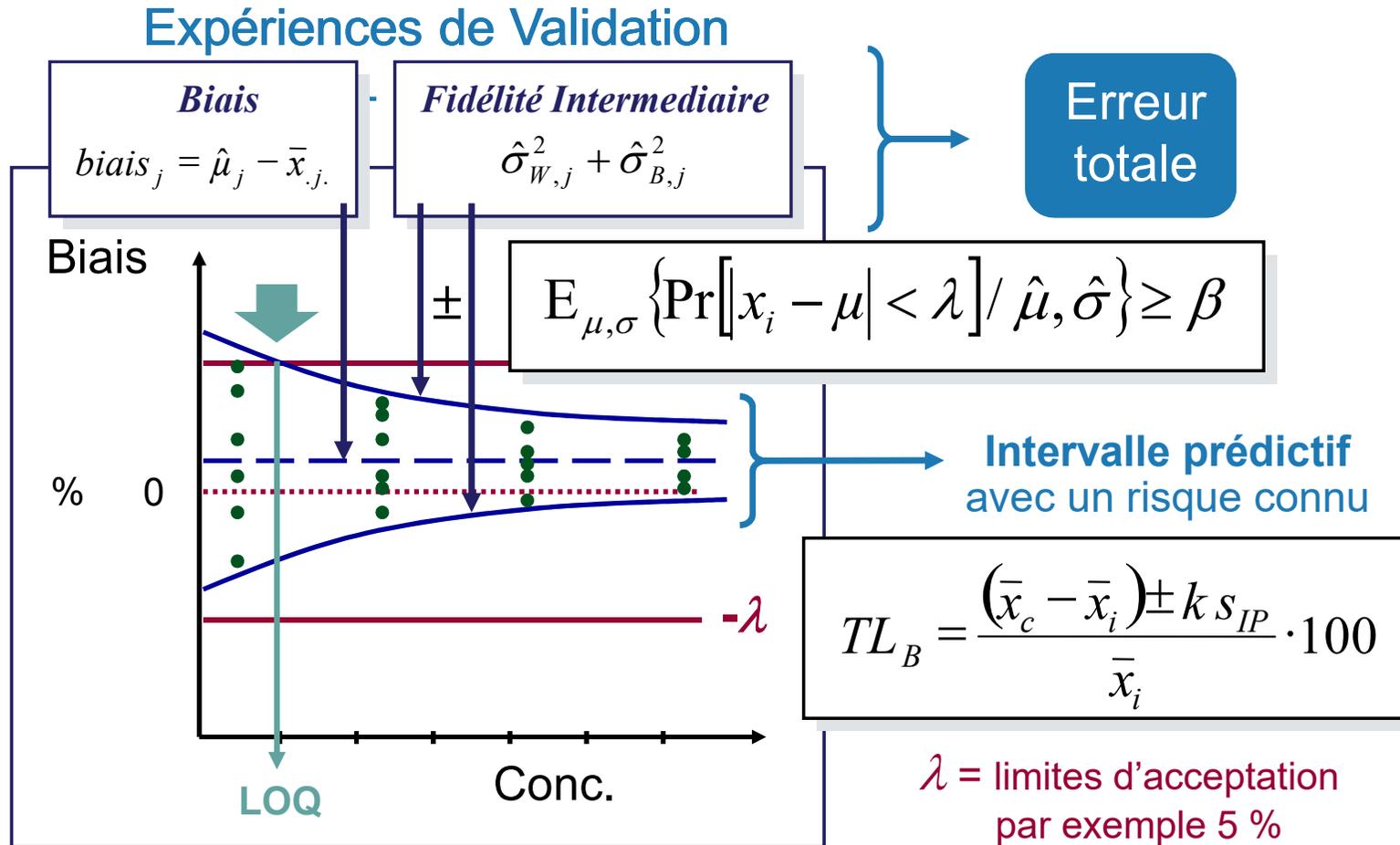


→ Si le  $\beta$ -expectation tolerance interval est inclus dans les limites d'acceptation, alors la **probabilité que chaque futur résultat soit dans les limites d'acceptation est au moins de  $\beta$**  (ex. 80%).

# Approche de validation – Profil d’exactitude



# Approche de validation – Profil d’exactitude



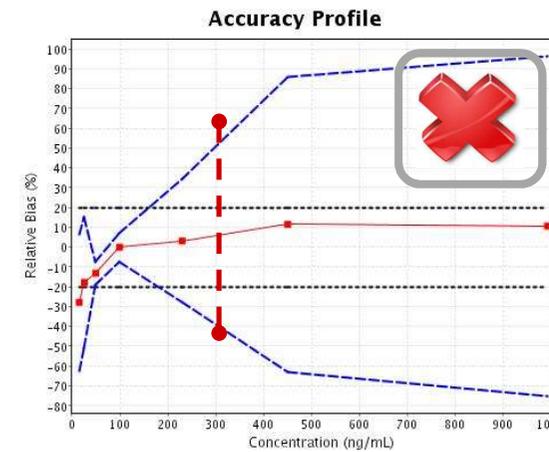
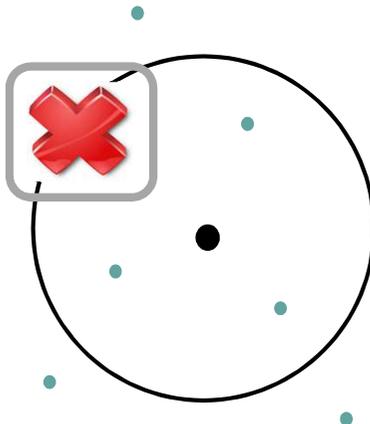
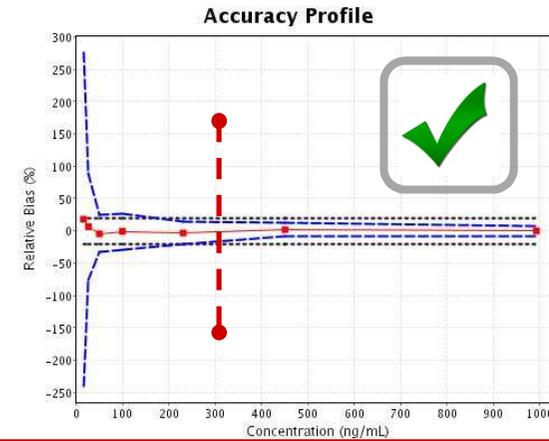
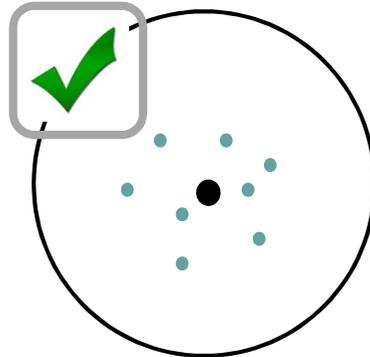
Pourquoi

Objectifs

Comment

# Approche de validation – Profil d'exactitude

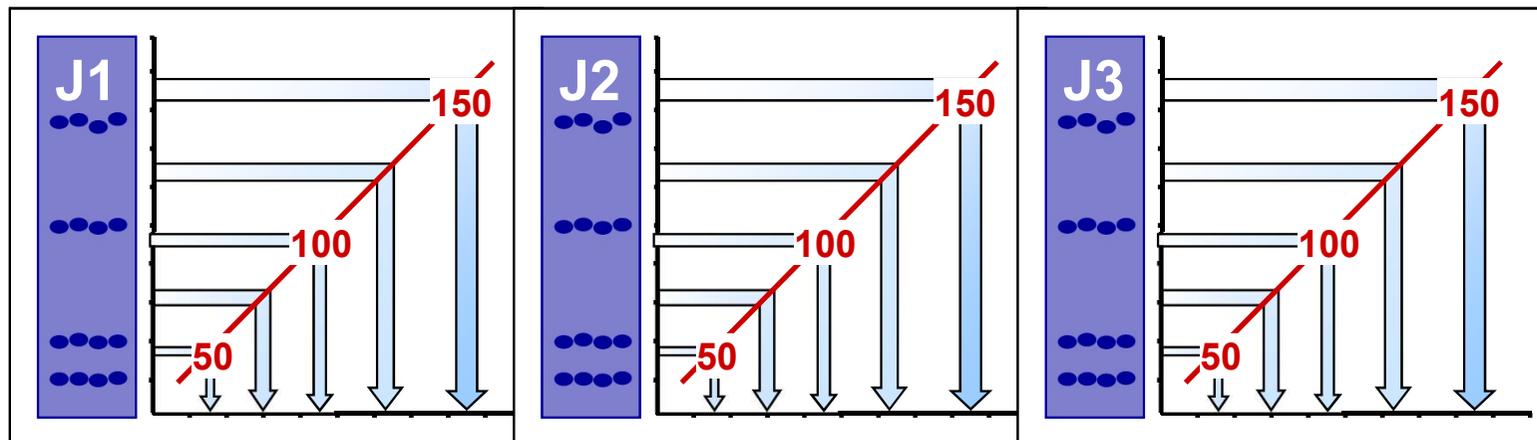
## Décision



# Exemples

## Exemple 1

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

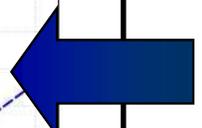
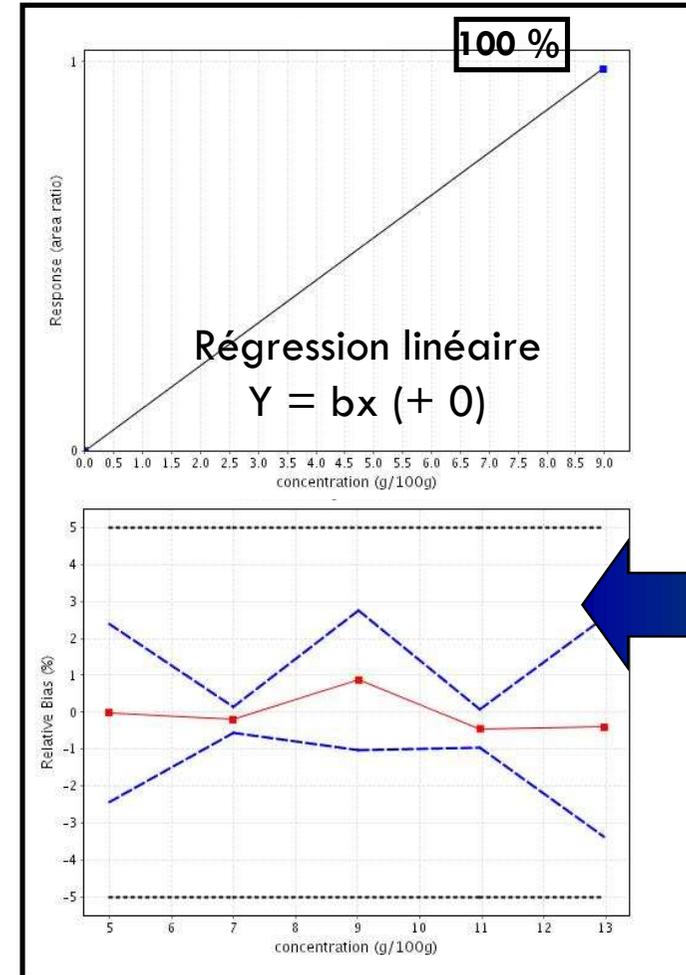
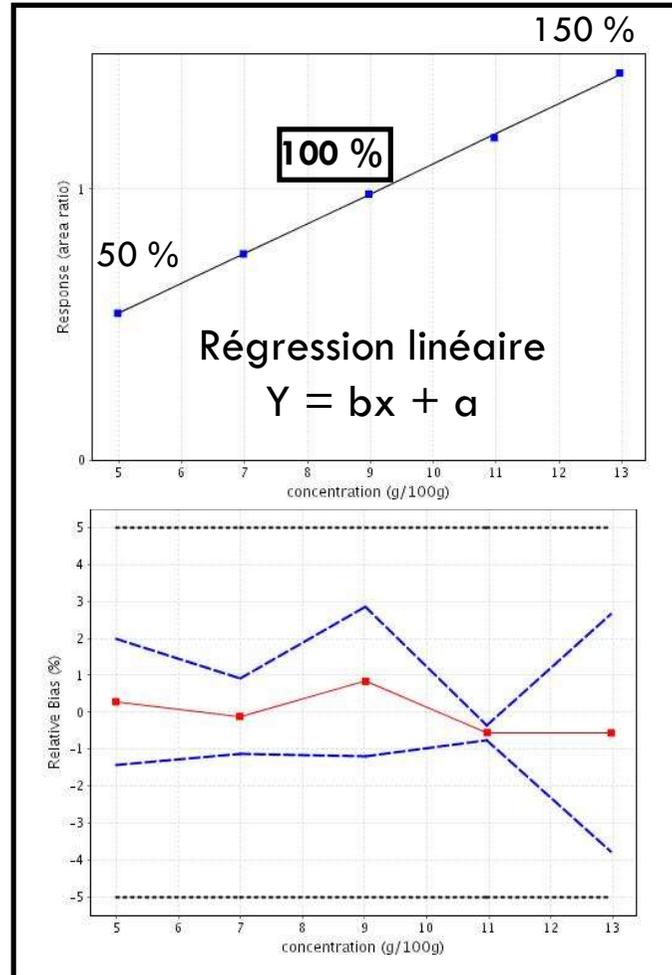


50 Standards de Calibration

● Standards de Validation

# Exemples

## Exemple 1



Pourquoi

Objectifs

Comment

# 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	<b>99.99</b>
2.0	6.986	6.972	-1.395E-02	-0.1997	<b>99.80</b>
3.0	9.015	9.094	7.823E-02	0.8678	<b>100.9</b>
4.0	10.98	10.93	-4.918E-02	-0.4480	<b>99.55</b>
5.0	12.97	12.92	-5.267E-02	-0.4060	<b>99.59</b>

# 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	<b>0.4848</b>	<b>0.4850</b>
2.0	6.986	3.898E-06	4.785E-03	<b>5.580E-05</b>	<b>0.6852</b>
3.0	9.015	5.778E-02	7.044E-02	<b>0.6409</b>	<b>0.7813</b>
4.0	10.98	1.158E-06	1.153E-02	<b>1.055E-05</b>	<b>0.1510</b>
5.0	12.97	1.461E-06	7.706E-02	<b>1.126E-05</b>	<b>0.5940</b>

# 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]

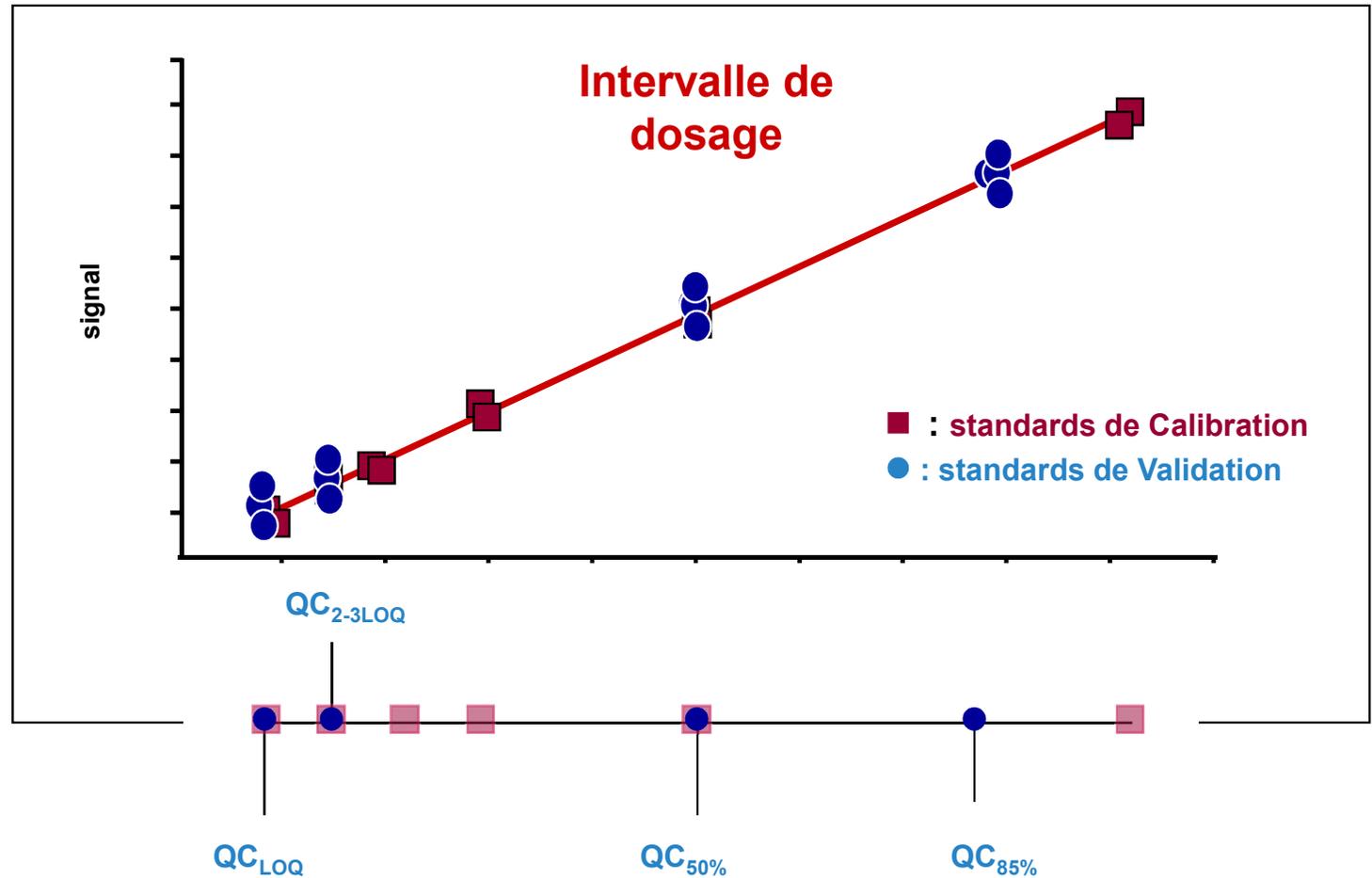
# Exemples

## Exemple 2

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

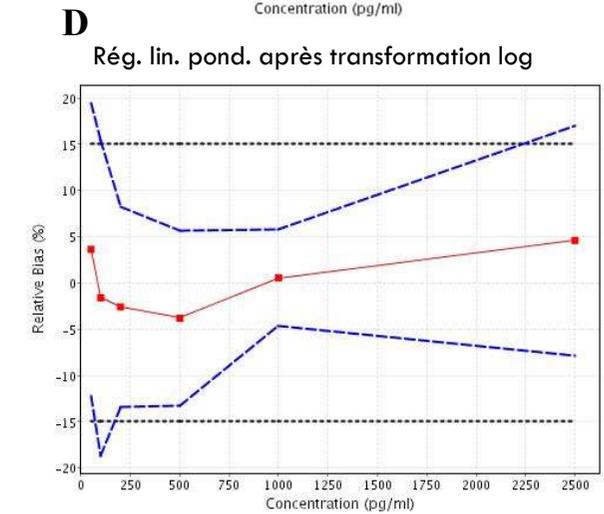
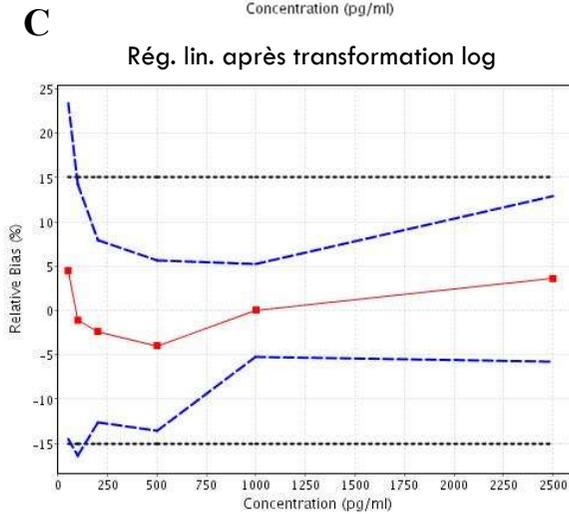
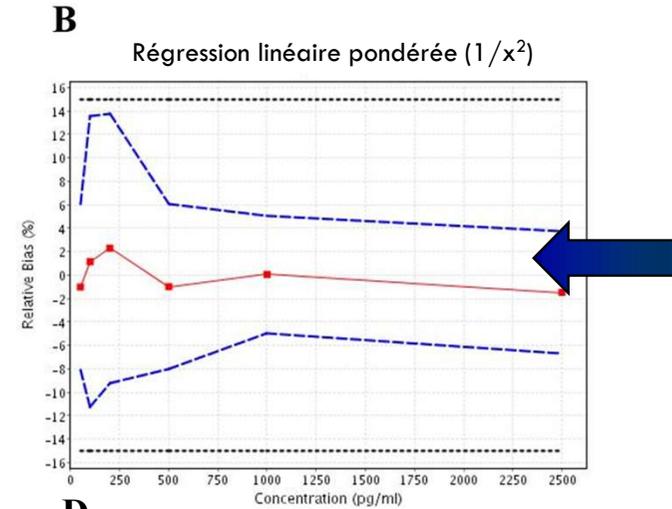
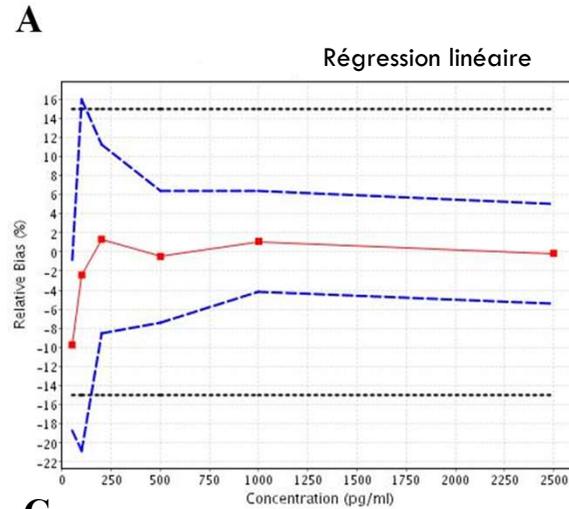
# Exemples

## Exemple 2



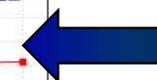
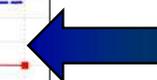
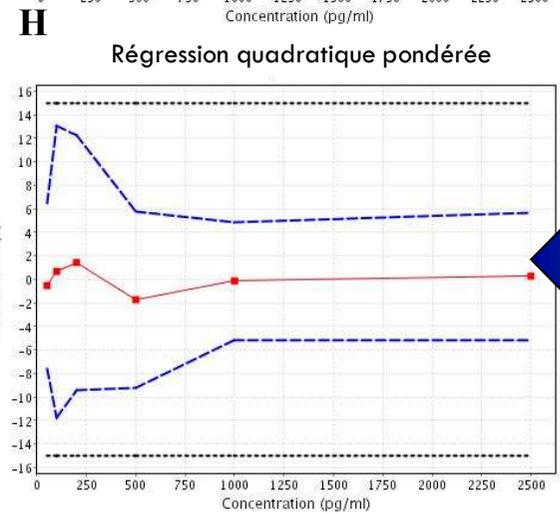
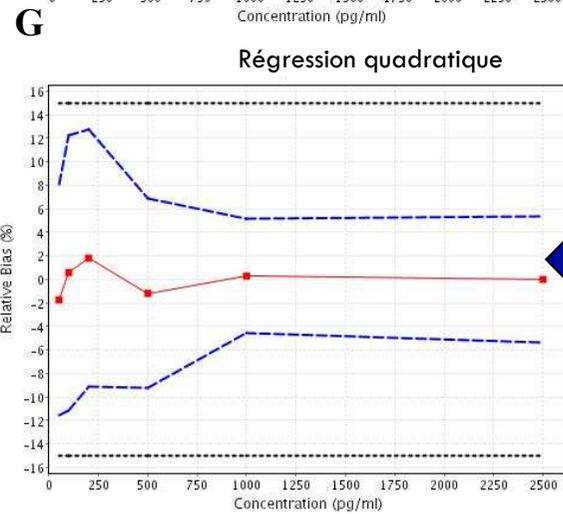
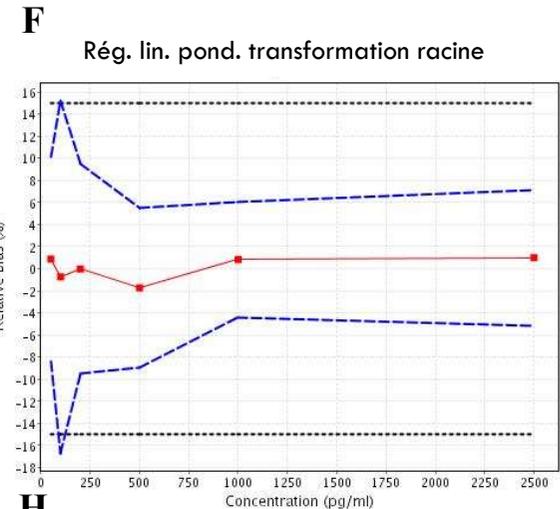
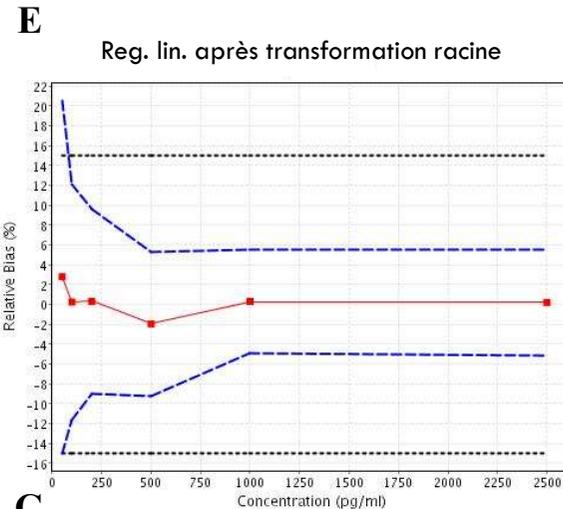
# Exemples

## Exemple 2



# Exemples

## Exemple 2



# Exemples

## Exemple 2

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

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

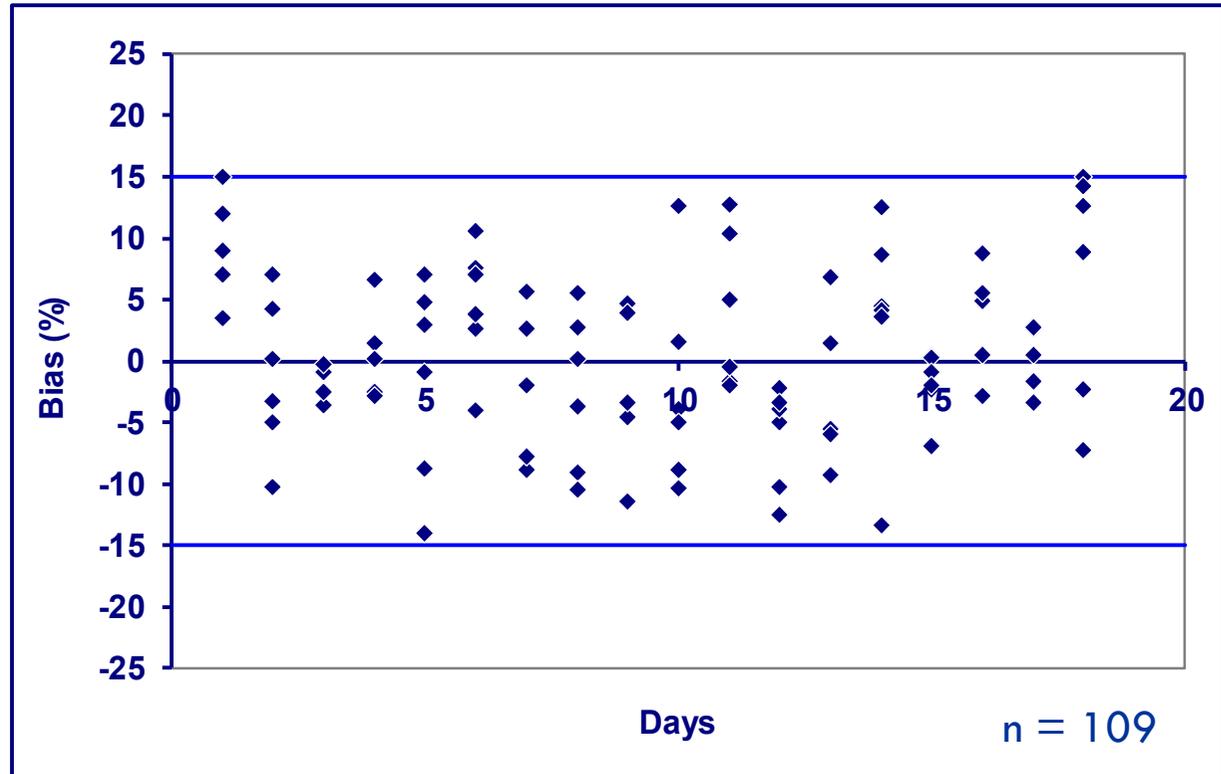
<b>Fidélité</b> (k=3; n=6)		
	<u>Répétabilité</u> (RSD, %)	<u>Fidélité intermédiaire</u> (RSD, %)
0.05 ng/ml	<b>5.2</b>	<b>5.5</b>
0.10 ng/ml	<b>5.2</b>	<b>8.6</b>
0.50 ng/ml	<b>3.6</b>	<b>4.1</b>
2.50 ng/ml	<b>4.1</b>	<b>5.1</b>

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

# Exemples

## Exemple 2

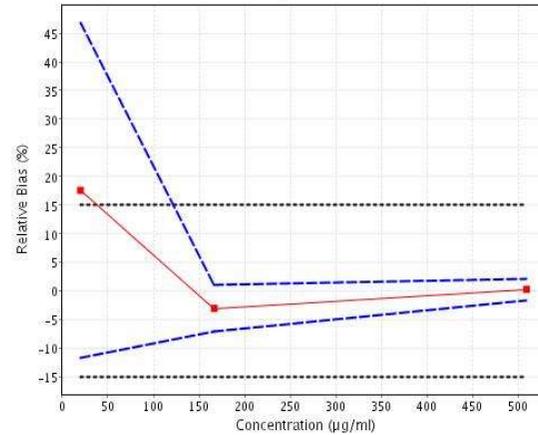


QC Chart

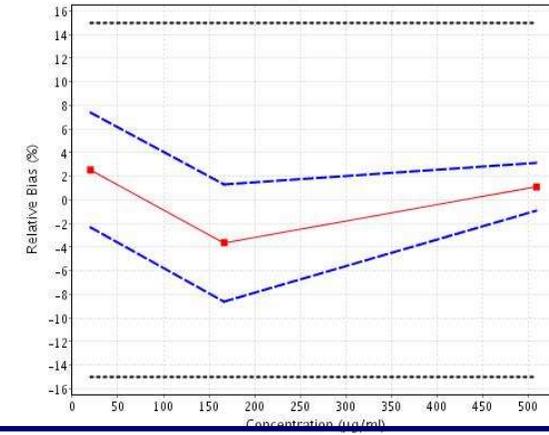
# Exemples

## Exemple 3

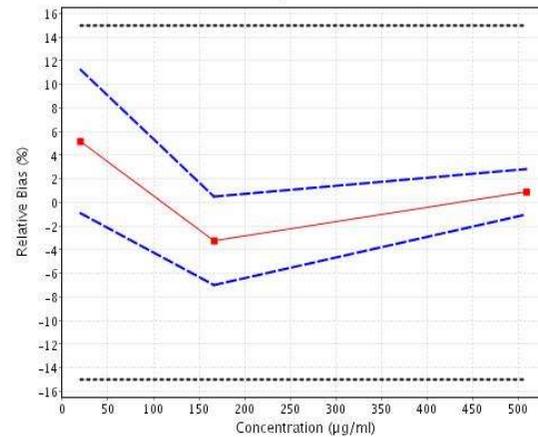
Régression linéaire



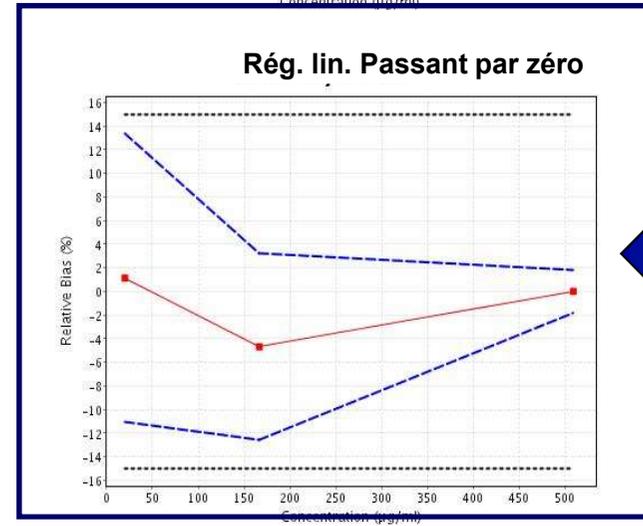
Régression linéaire pondérée (1/x)



Rég. lin. après transformation log

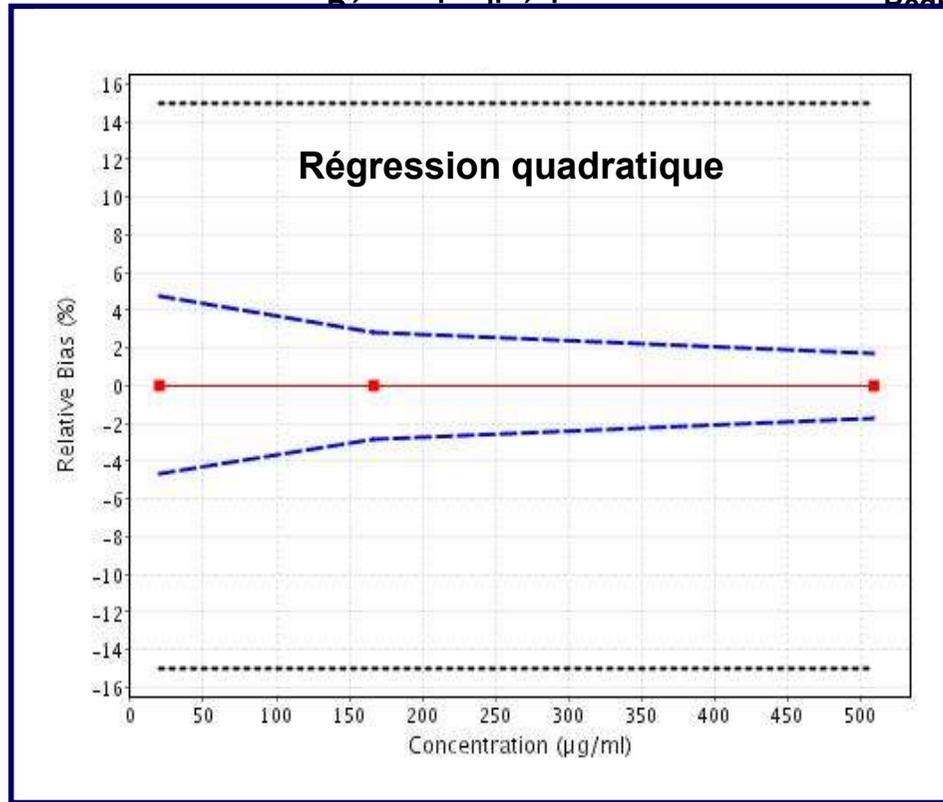


Rég. lin. Passant par zéro

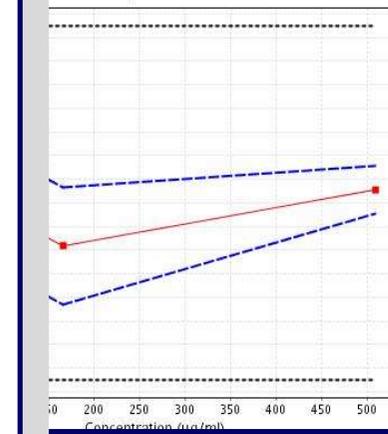


# Exemples

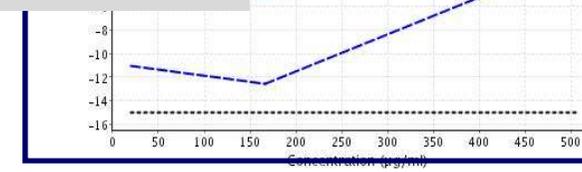
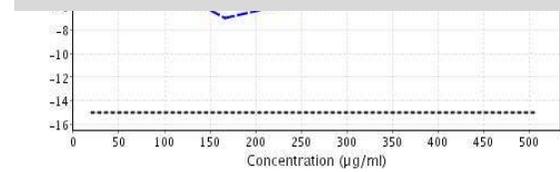
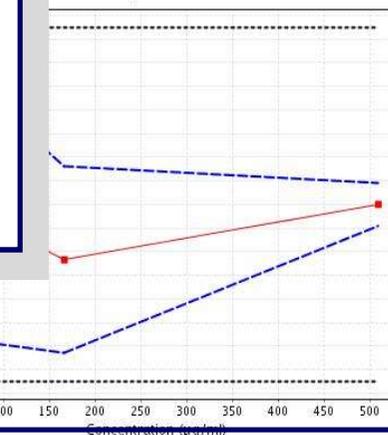
## Exemple 3



Régression linéaire pondérée (1/x)

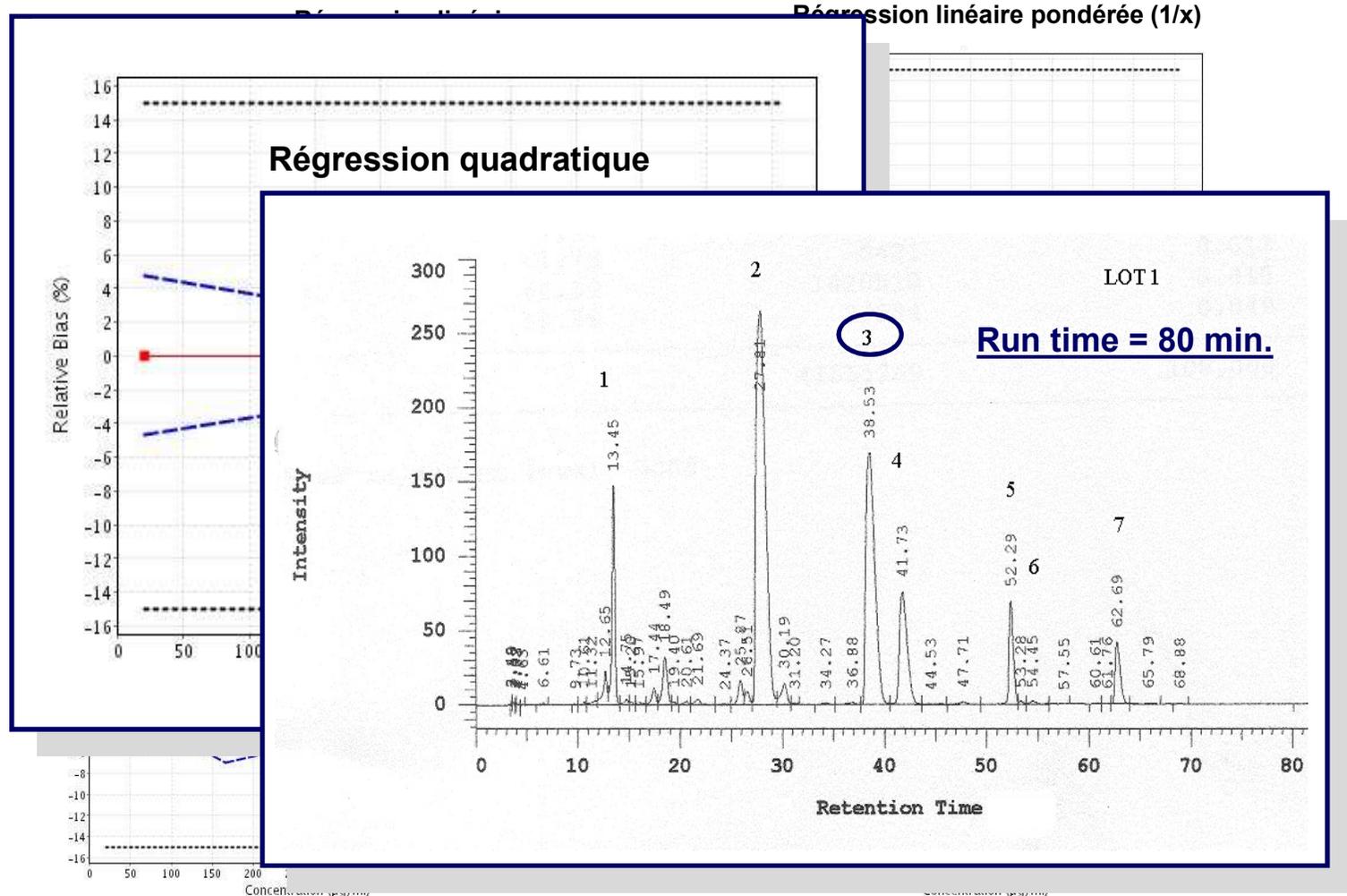


Rég. lin. Passant par zéro



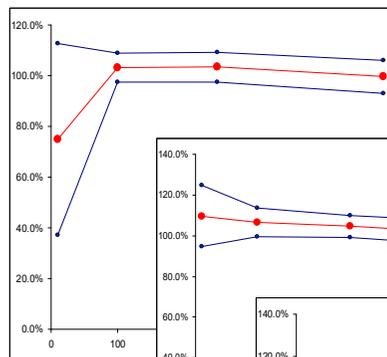
# Exemples

## Exemple 3



# Exemples

## Exemple 3



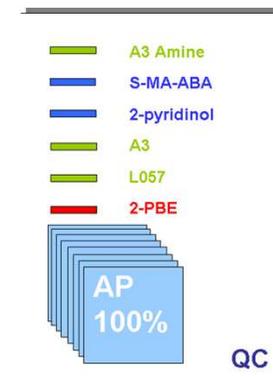
1. Linear regression (OLS)

2. External standard (1-Level)

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

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

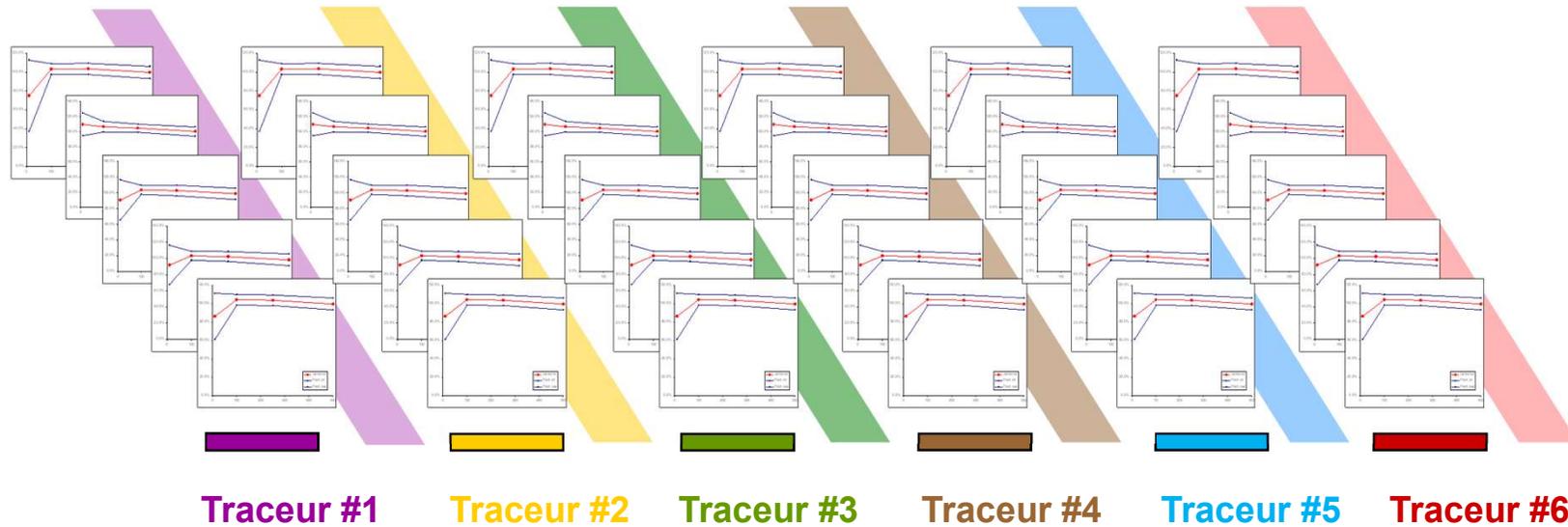
5. OLS forced through (0,0)



Traceur #1

# Exemples

## Exemple 3



### Evaluation des résultats

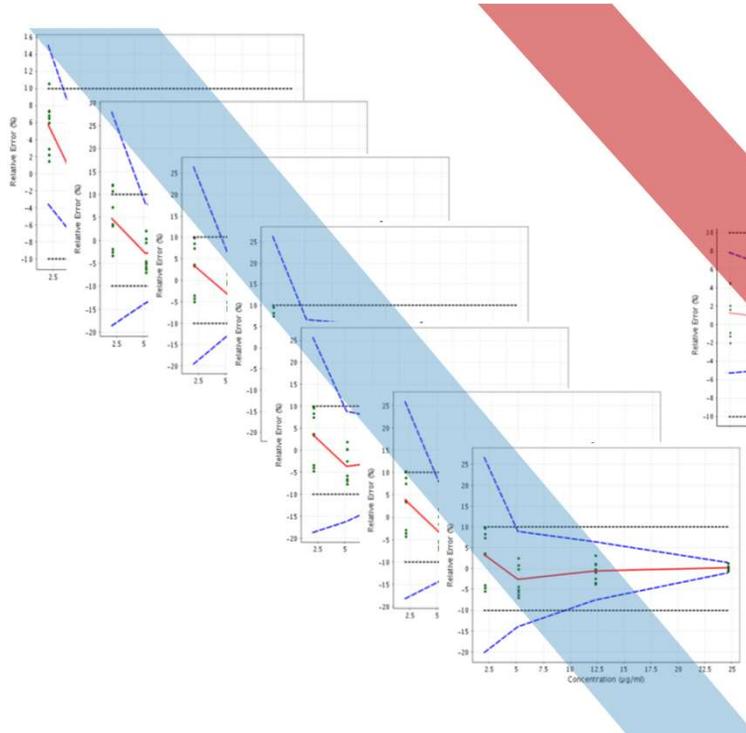
1. Chaque composé
2. Chaque modèle de calibration
3. Complexité mathématique
4. Complexité de la méthode

Pourquoi

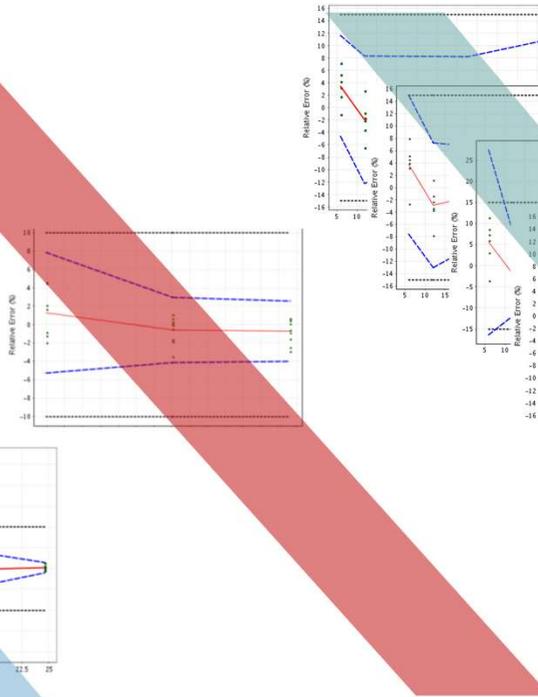
Objectifs

Comment

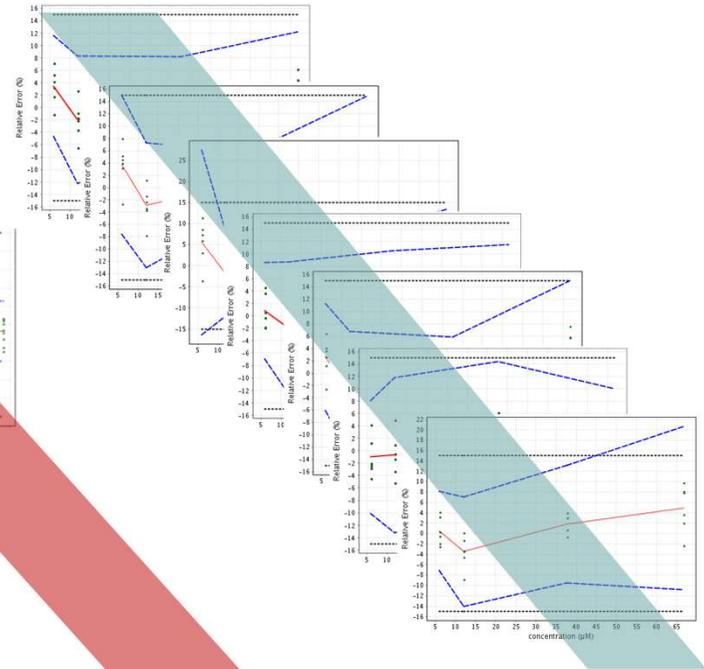
# Exemples



**Capillary Electrophoresis**



**Near Infrared**



**Colorimetric (UV/Vis)**



---

# Conclusion

- **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

