

---

# Définition de la validation de méthode et outils associés

Jérôme VIAL

*Laboratoire Environnement et Chimie Analytique de  
l'ESPCI*

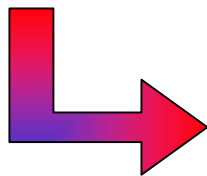
*[jerome.vial@espci.fr](mailto:jerome.vial@espci.fr)*



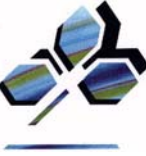
# Problématique

---

- **Demande sociétale** croissante en résultats d'analyse
  - Domaine **environnemental** (polluants dans les eaux, les sols...)
  - Domaine **agro-alimentaire** (sécurité des aliments...)
  - Domaine **pharmaceutique** (contrôle qualité)
  - Domaine **médicolégal** (cf. les experts...)
  - **Industrie** en général (Qualité des résultats)
  
- Nécessite de pouvoir garantir la **fiabilité** et la **traçabilité** des résultats fournis.



Mise en place d'un système organisationnel pour répondre à ce besoin



# Systeme Qualite

---

**Qualification**

**Validation**

**Traçabilité**  
**Fiabilité**

**Test de conformité**



# Qualification

---

➤ **La Qualification** d'un instrument représente l'ensemble des opérations, tests et résultats qui servent à vérifier ses performances.

① **QI** : qualification d'installation

*Vérification présence pièces, manuels... ; connexions fluides+électriques...*

② **QO** : qualification opérationnelle

*Vérification que chaque module remplit les spécifications constructeur (répétabilité, justesse, linéarité, calage en  $\lambda$ ...)*

③ **QP** : qualification des performances

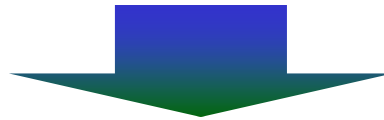
*Vérification des performances dans des conditions proches de celles de l'utilisation en routine*



# Test de conformité

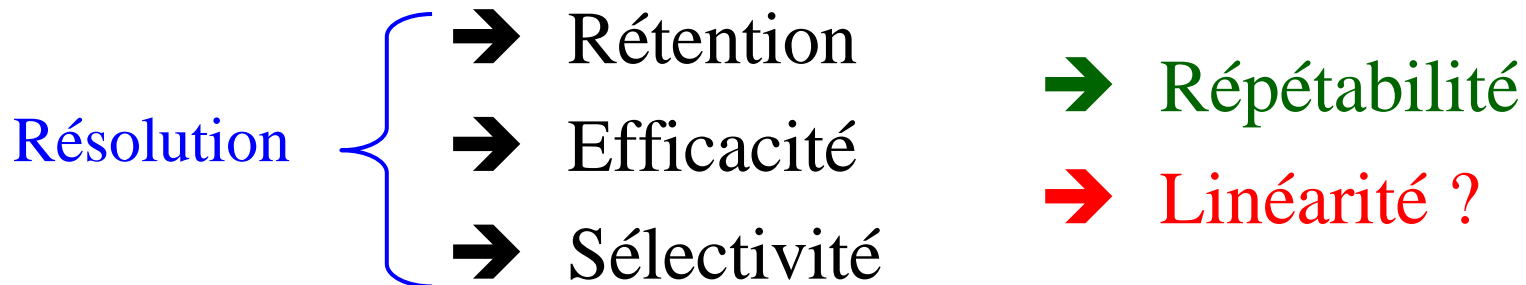
---

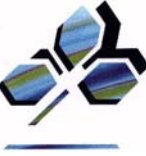
Ensemble de tests permettant de vérifier que, **pendant l'analyse**, les performance du système sont compatibles avec le cahier des charges de la méthode.



## Échantillons intégrés dans la séquence analytique

Paramètres suivis (ex : LC) :





# Validation

---

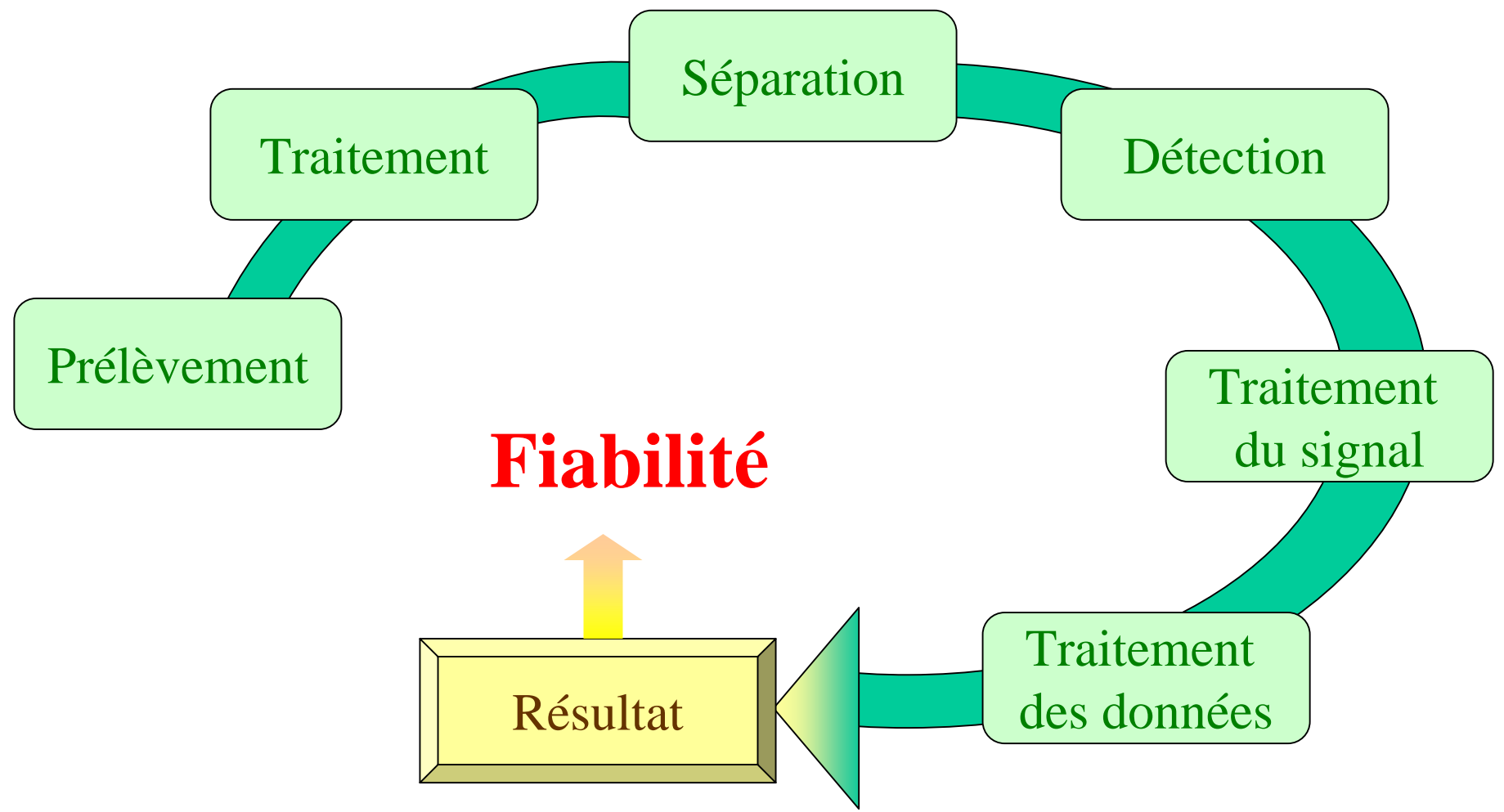
➤ **La Validation** d'une méthode est la procédure par laquelle on démontre, preuves expérimentales à l'appui, que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée.

⇒ Il existe plusieurs degrés de validation suivant la nature de la méthode, ce à quoi elle est destinée et le domaine concerné :

- Méthode de contrôle en routine, utilisée sur plusieurs sites, contexte réglementaire fort = **validation approfondie**
- Méthode utilisée ponctuellement dans un seul laboratoire, contexte réglementaire faible = **validation rapide**

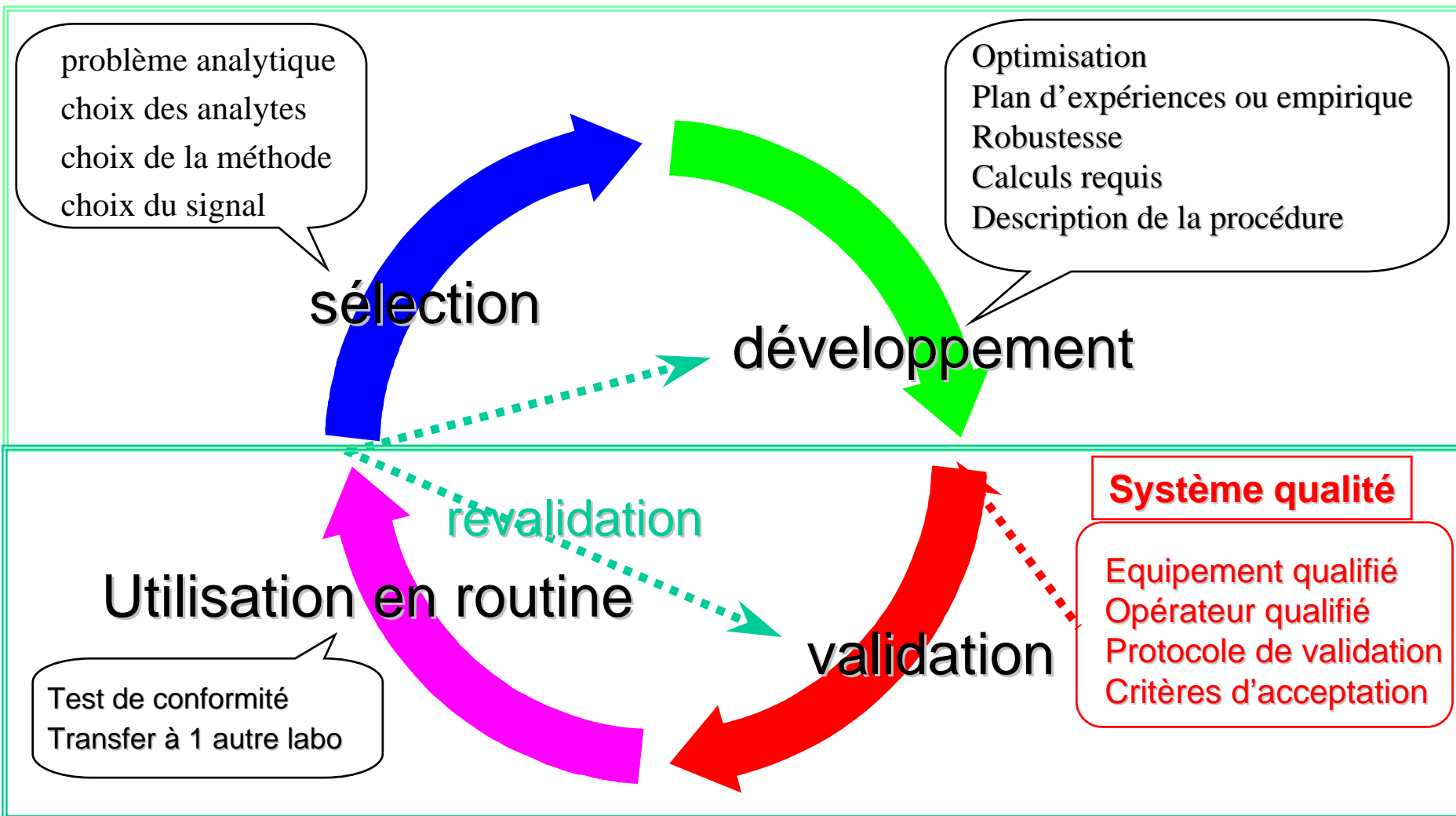


# Que valider?

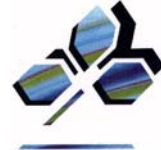




# Quand valider?







# Genèse d'une validation

Normes et recommandations



ICH  
Washington  
Eurachem  
EN, ISO  
etc.

Commission scientifique



Protocole de validation  
**SFSTP**, littérature, etc.



**Choix du niveau de validation approprié au besoin**

Dossier de validation spécifique



## Documents de référence (1)

---

- SFSTP : « *Guide de validation analytique - Rapport d'une commission SFSTP* »
  - *I. Méthodologie* : STP Pharma Pratiques 2 (4) 205-226 **1992**
  - *II. Exemples d'application* : 227-239 **1992**
  
- SFSTP : « *Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP* » : STP Pharma Prat., 7, 169-194, **1997**
  
- SFSTP : « *Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches* »
  - *Partie I - Généralités* : STP Pharma Prat., 7, 101-138, **2003**
  - *Partie II – Statistiques* : STP Pharma Prat., 16, 1-31, **2006**



## Documents de référence (2)

---

- 2 “guidelines” ICH dédiés

(<http://www.fda.gov/>) ou (<http://www.ich.org>)

### – **Q2: «Analytical Validation»**

- Q2A: «Text on Validation of Analytical Procedures»

Présente une discussion sur les caractéristiques qui doivent être prises en compte au cours de la validation des méthodes analytiques

- Q2B: «Methodology»

Son but est de fournir des conseils et recommandations sur la manière d’appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique. En outre, le document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d’enregistrement.

# Documents de référence (3)

---

## Autres guidelines ICH

- **Q1: «Stability»**
  - Q1A (*in revision*): «Stability Testing of New Drugs and Products»
  - Q1B: «Photostability testing»
  - Q1C: «Stability Testing for New Dosage Forms»
- **Q3: «Impurities»**
  - Q3A (*in revision*): «Impurities in New Drug Substances»
  - Q3B (*in revision*): «Impurities in New Drug Products»
  - Q3C: «Impurities: Residual Solvents»
- **Q6: «Specifications»**
  - Q6A: «Chemical Substances with its Decision Trees»
  - Q6B: «Biotechnological Substances»



## Documents de référence (4)

---

- ◆ FDA «Guidance for Industry - Analytical Procedures and Methods Validation - Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation» (Draft, August 2000)
- ◆ Guides Eurachem
- ◆ Normes (ISO 5725, V03-110, ...)
- ◆ Etc...



## Points clés de la validation

---

- Spécificité/Sélectivité
- Fidélité
- Justesse
- Linéarité
- Gamme
- Limites de détection et de quantification
- Stabilité
- Robustesse



# Ex de mise en œuvre de validations

Type de tests Caractéristiques	Dosage	Impuretés		Identification	Dosage bioanalyse
		Quantitatif	Essais limites		
Justesse	✓	✓			✓
Fidélité répétabilité	✓	✓			✓
Fidélité fidélité intermédiaire	✓	✓			✓
Spécificité Sélectivité	✓	✓	✓	✓	✓
Limite de détection		✓	✓		✓
Limite de quantification		✓			✓
Linéarité	✓	✓			<b>Fonction de réponse</b>
Gamme	✓	✓			✓
Robustesse	✓	✓	✓		✓

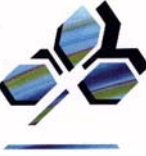


# Spécificité/Sélectivité

---

- Une méthode est **spécifique** si elle produit une réponse uniquement pour l'analyte d'intérêt
- Dans le cas des méthodes séparatives, on parle plutôt de **sélectivité** : capacité à différencier et quantifier l'analyte cible en présence d'interférents dans l'échantillon.
- ✓ Exemple d'approche possible : Comparaison du signal de l'analyte avant et après dopage par des interférents potentiels.
- ✓ Autre approche possible : mise en œuvre de méthodes orthogonales.

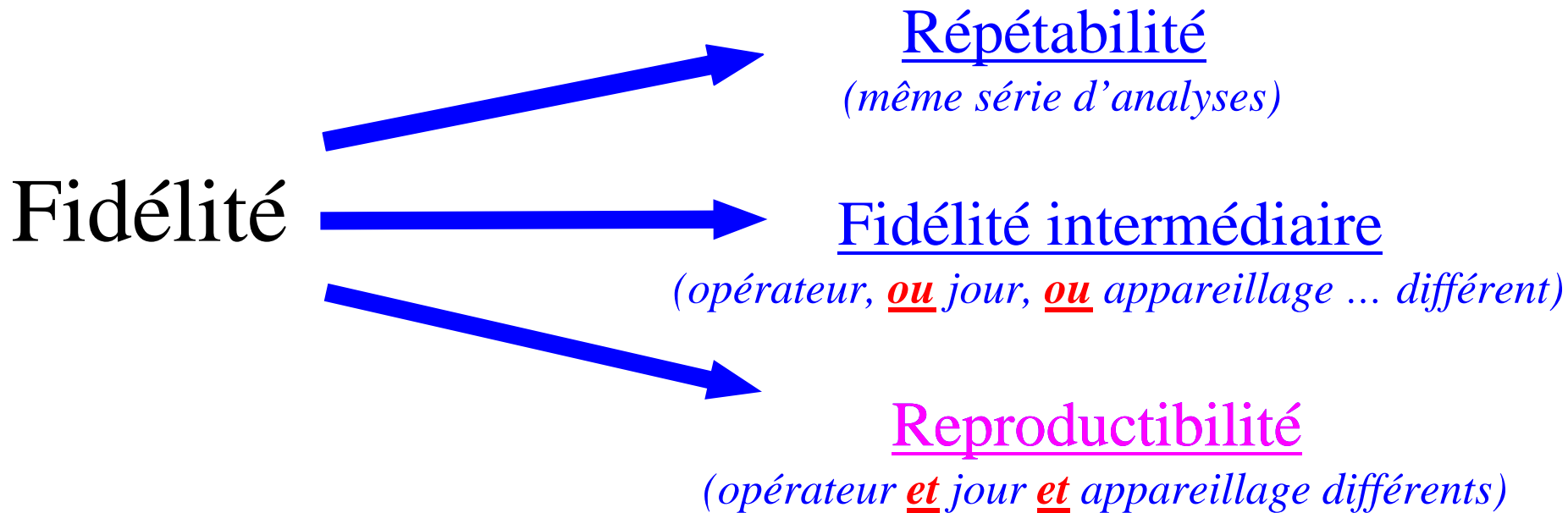




# Fidélité

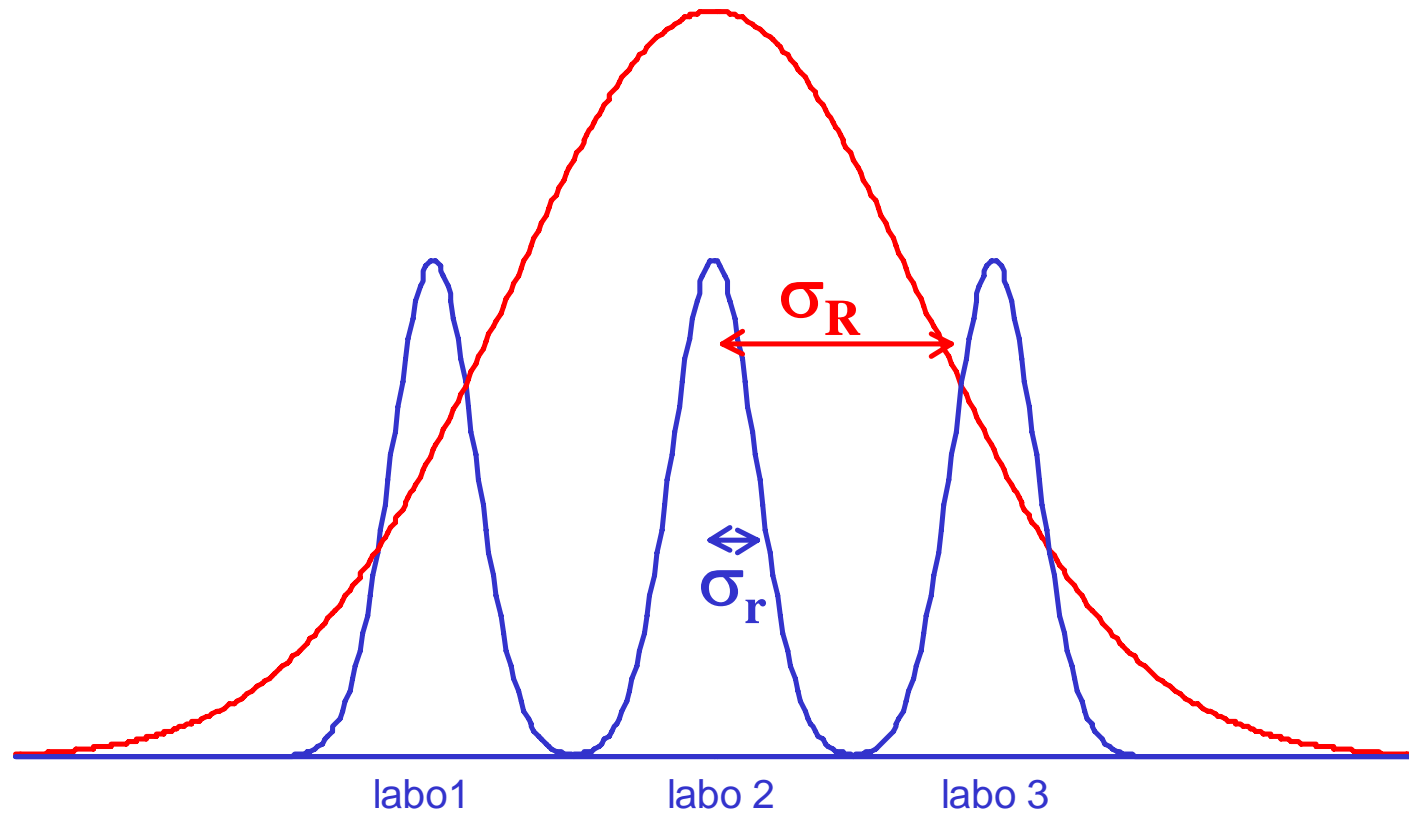
---

Fidélité = ensemble des caractéristiques de dispersion



ICH : « Reproducibility is assessed by means of an inter-laboratory trial »

# Répétabilité et Reproductibilité

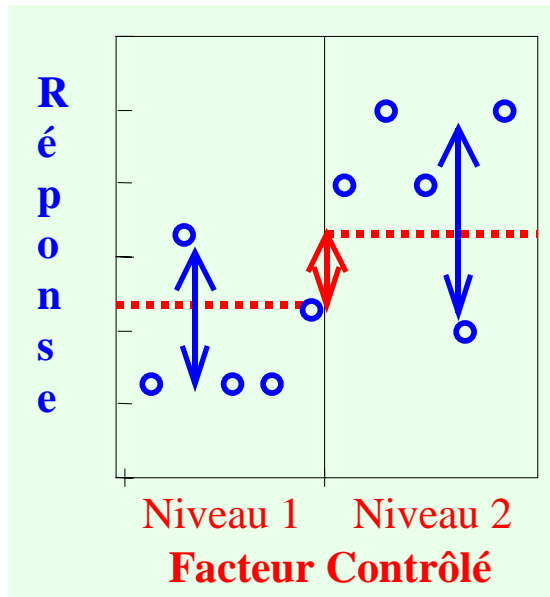


Comment estimer les dispersions inhérentes  
aux différentes sources de variations possibles?

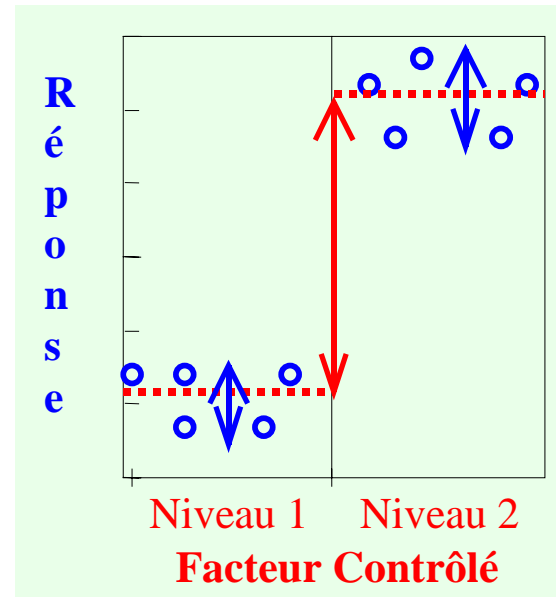
# L'ANOVA

Méthode permettant de déterminer si un facteur a une influence **significative** sur la dispersion des résultats

## ➤ Principe



ou



# Justesse

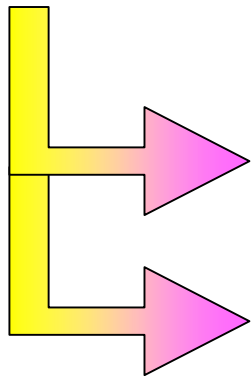
## Accord entre résultat obtenu et valeur vraie

- En Chimie analytique : **valeur vraie**

↳ Utilisation de **MRC**

*BCR (Europe), NIST (États-Unis), LNE (France), AIEA (Nucléaire)*

- Dans de nombreux domaines : **MRC**

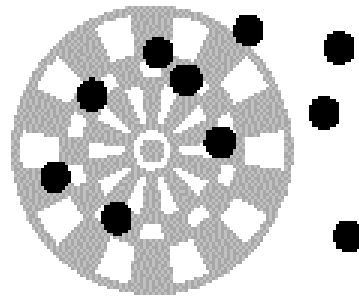


Fabrication de « MR maison »  
à partir d'un CI

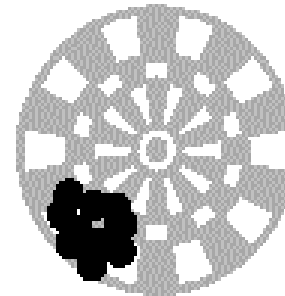
Comparaison avec une méthode de  
référence

# Fidélité et justesse

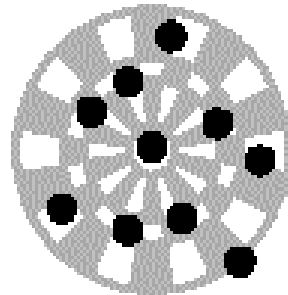
Non fidèle  
non juste



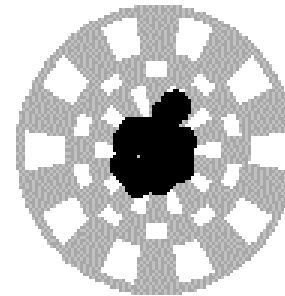
Fidèle  
non juste



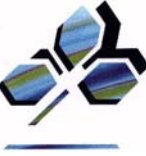
Non Fidèle  
Peut être juste?



Fidèle  
juste



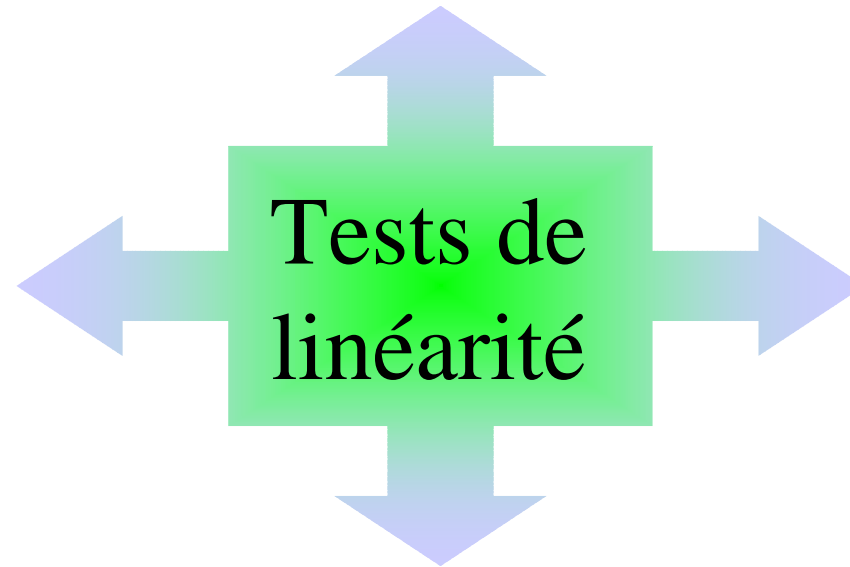
*Cible*



# Comment vérifier la linéarité?

---

Analyse des résidus

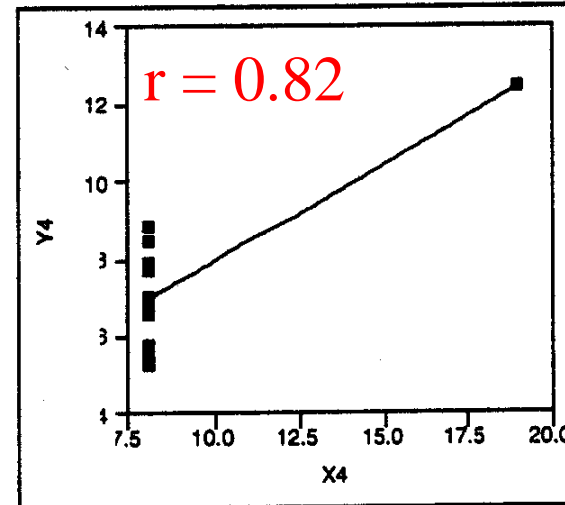
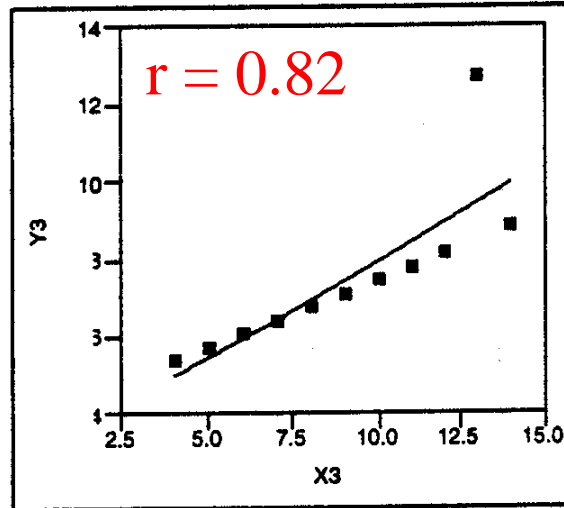
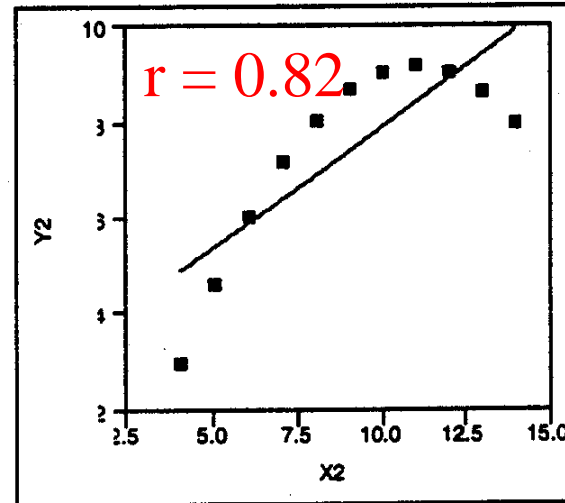
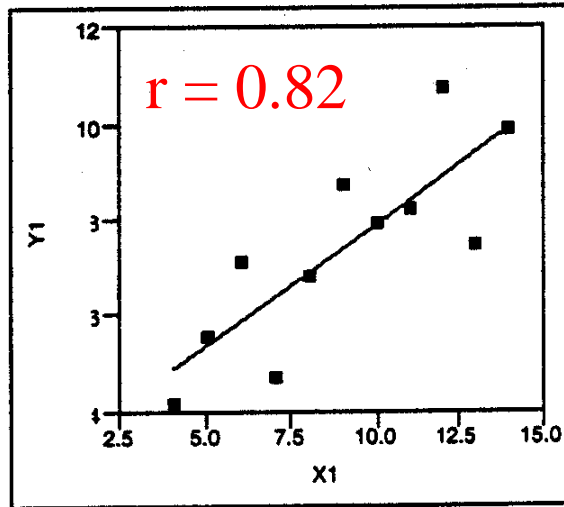


Coefficient  
de corrélation

Test  
d'adéquation

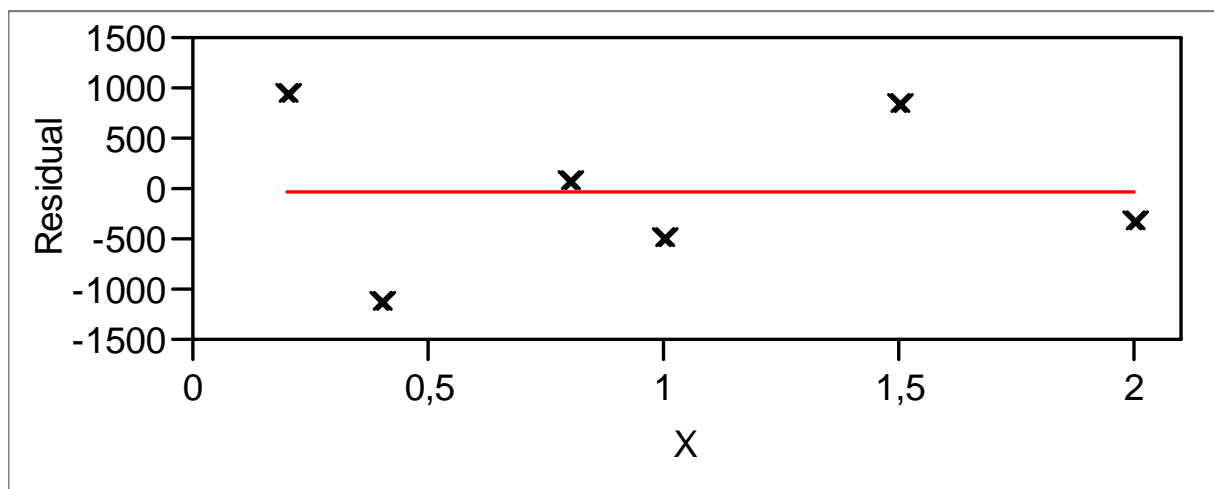
Comparaison avec un modèle quadratique

# Insuffisance de r



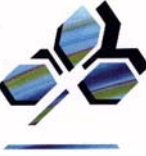
# Analyse des résidus

- Résidus = écarts entre les points expérimentaux et la droite de régression



➤ Acceptable en première approche





## Test d'un modèle d'ordre 2

---

- Principe = Déterminer si une modélisation par un polynôme de degré 2 ne serait pas mieux adaptée.

$$y = a + bx + cx^2$$

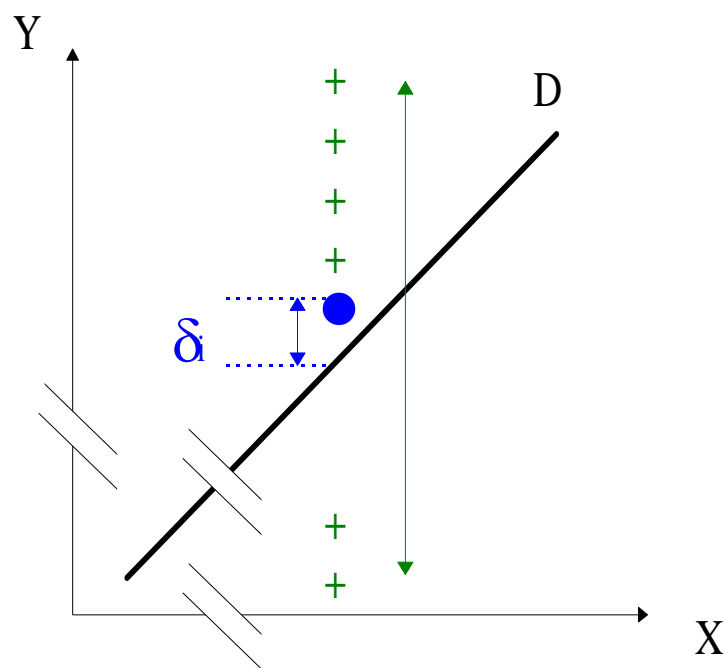
- Comment ?
  - En testant si  $c = 0$
  - test de Mandel sur les variances



Inconvénient : type d'écart à la linéarité imposé

# Défaut d'adéquation

- Principe = déterminer s'il est possible de trouver un meilleur modèle que la droite

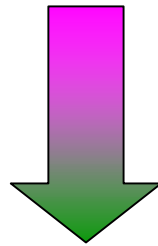


- Comment ? En examinant si la dispersion entre les moyennes des niveaux peut s'expliquer par la dispersion à l'intérieur des niveaux

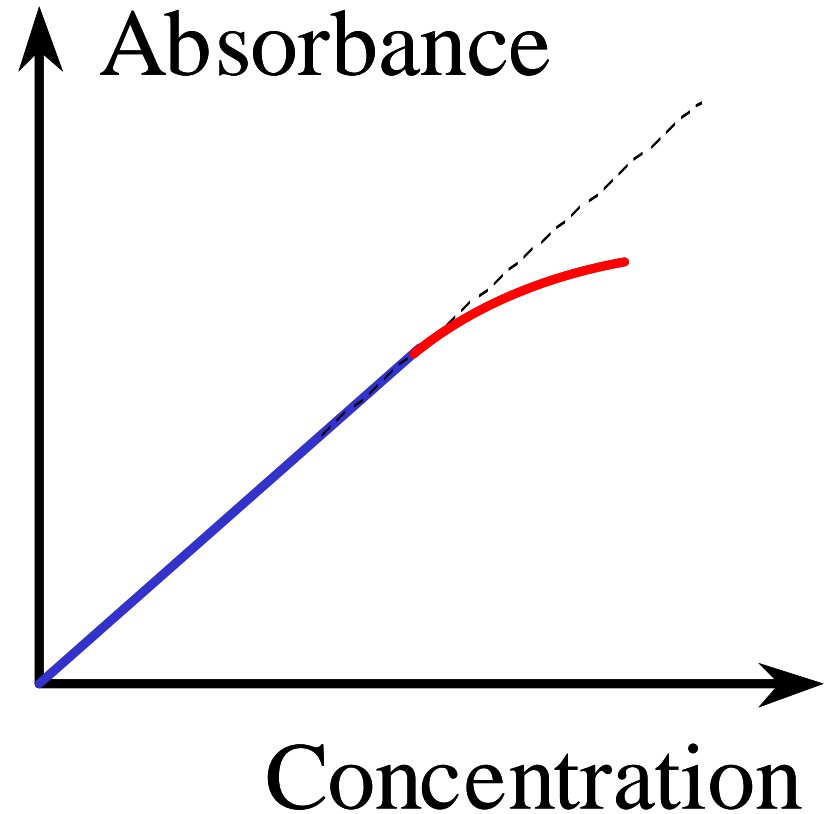
# Gamme

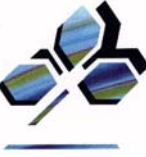
➤ La gamme d'une méthode d'analyse est limitée :

- du côté des faibles concentrations par **LD/ LQ**
- du côté des fortes concentrations par la **borne supérieure** du domaine linéaire



Définir une **methodologie** pour déterminer les limites de la gamme





# Limites de détection et de quantification

---

⊠ **LD** = Plus petite quantité d'analyte dont on puisse dire avec un niveau de confiance donné qu'il est présent dans l'échantillon

⊠ **LQ** = Plus petite quantité d'analyte qui peut être quantifiée avec un niveau de confiance donné.



## Concrètement

$$Y(\text{LD}) = (B) + k(\alpha, \beta)\sigma_B$$

Habituellement  $\alpha = \beta = 5\%$   $\longrightarrow$   $k = 3,29$

... en arrondissant on retrouve le classique  $k = 3$

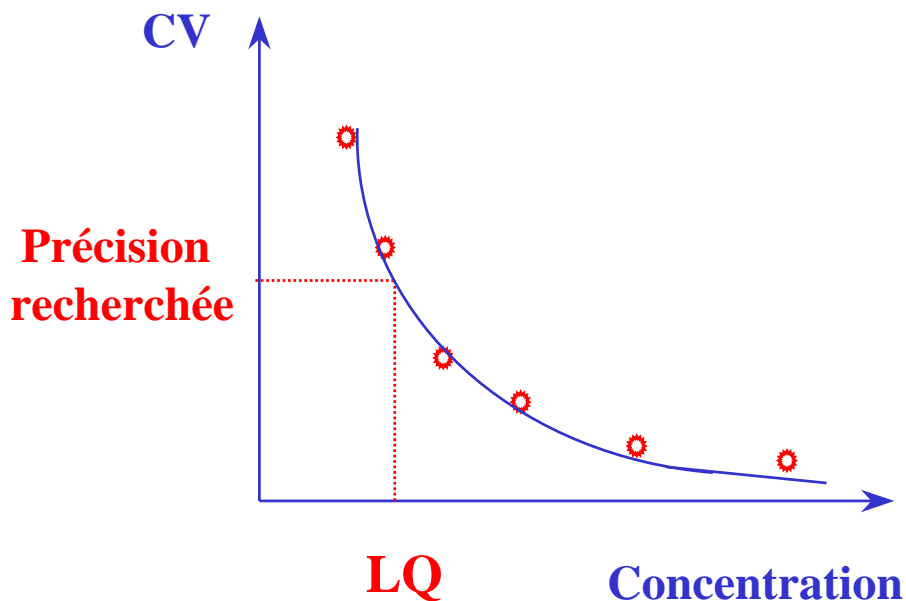
Pour la LQ, on prend usuellement par défaut  $k = 10$

💣 Difficulté : souvent  $\sigma_B$  n'est pas directement accessible

↳ **Nécessité de l'estimer**

↳ **Multiples possibilités**

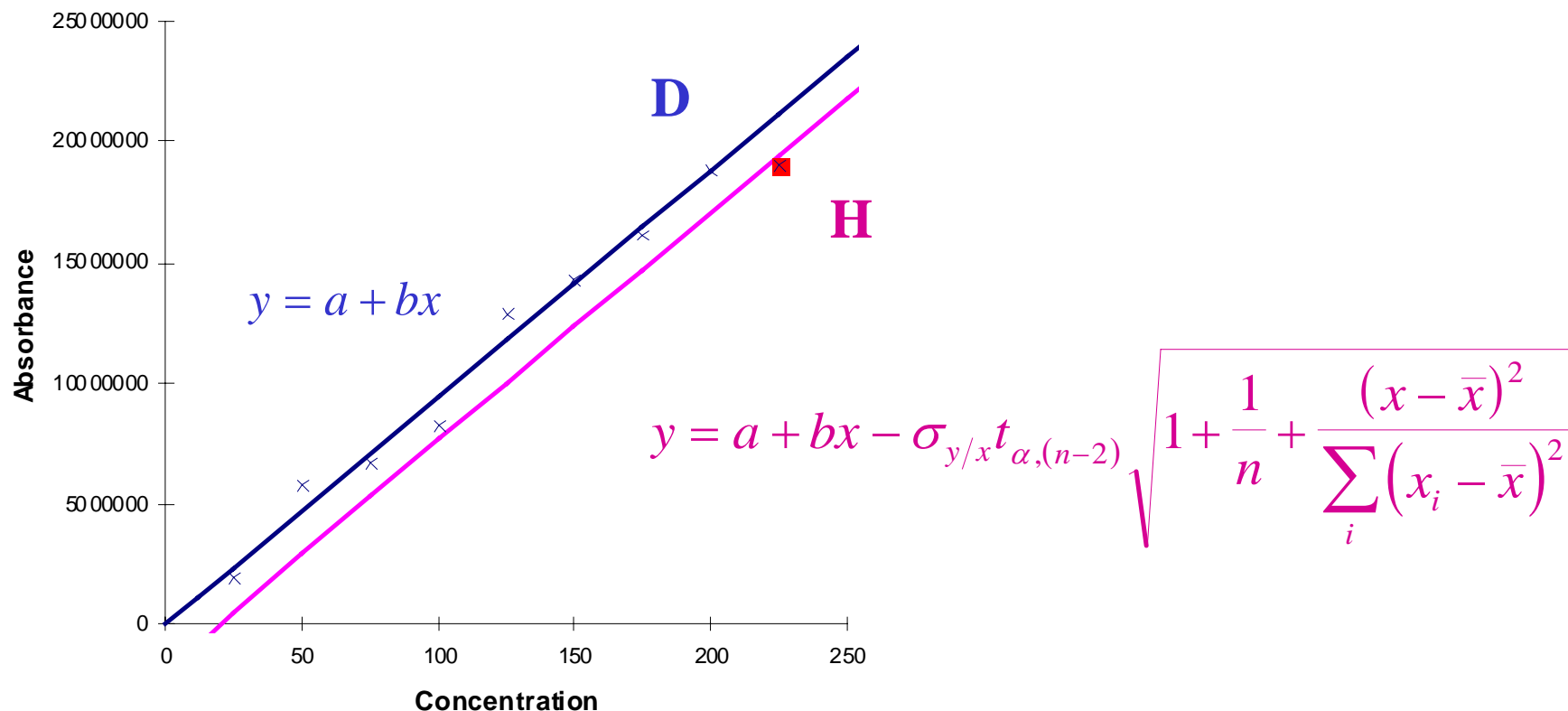
# Méthode CV cible/LQ



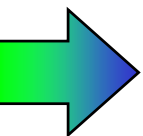
- Définir la fidélité recherchée au niveau LQ
- Préparer des échantillons à différents niveaux de concentration
- Injecter chaque échantillon six fois
- Calculer le CV pour chaque niveau
- Reporter sur un graphe le CV en fonction de la concentration

# Borne supérieure

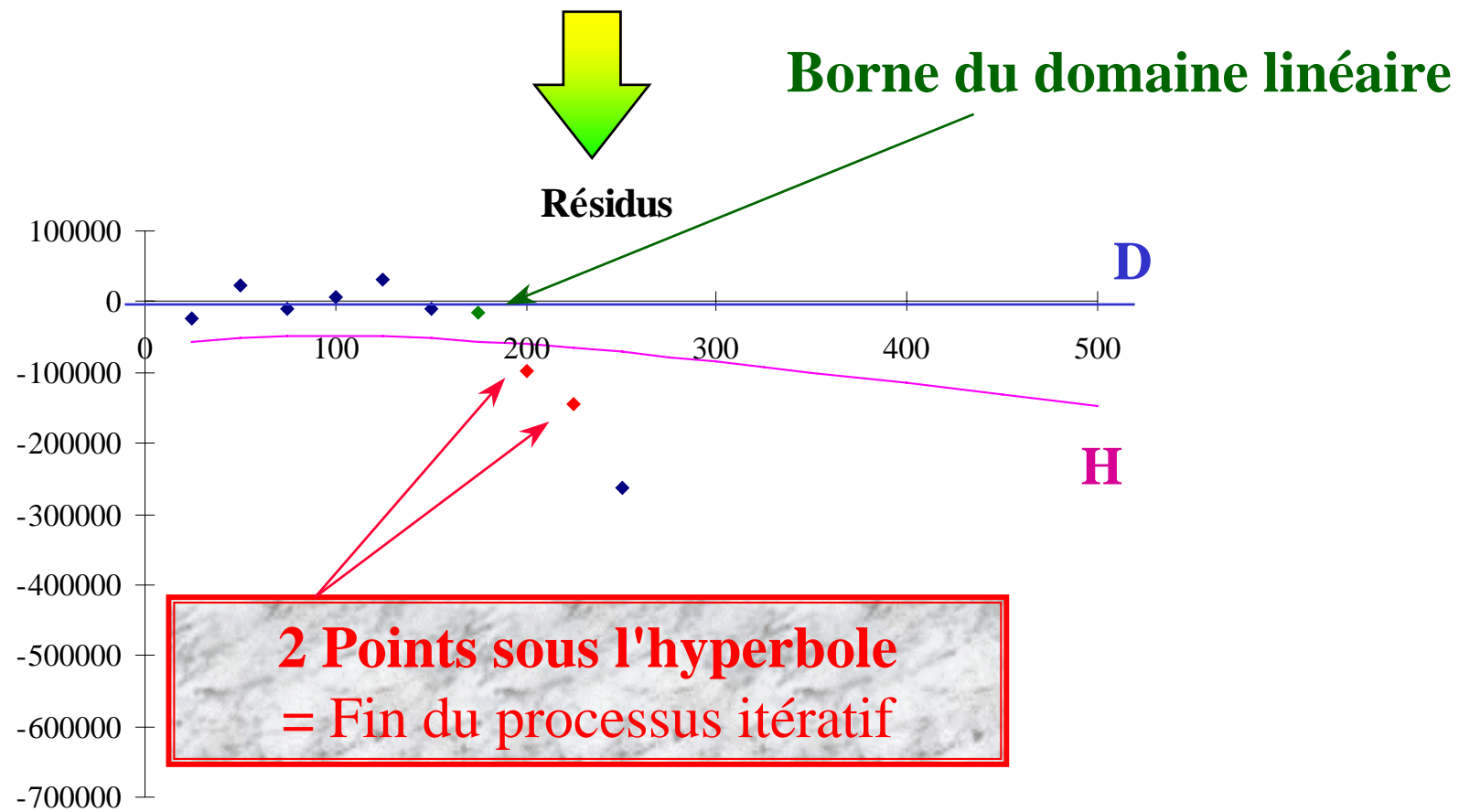
- Confrontation des points expérimentaux à **H**, hyperbole de prédiction inférieure de la droite de régression **D**



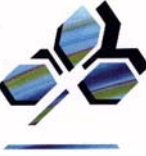
# Principe itératif



A chaque étape, calcul des résidus et de l'enveloppe de prédiction







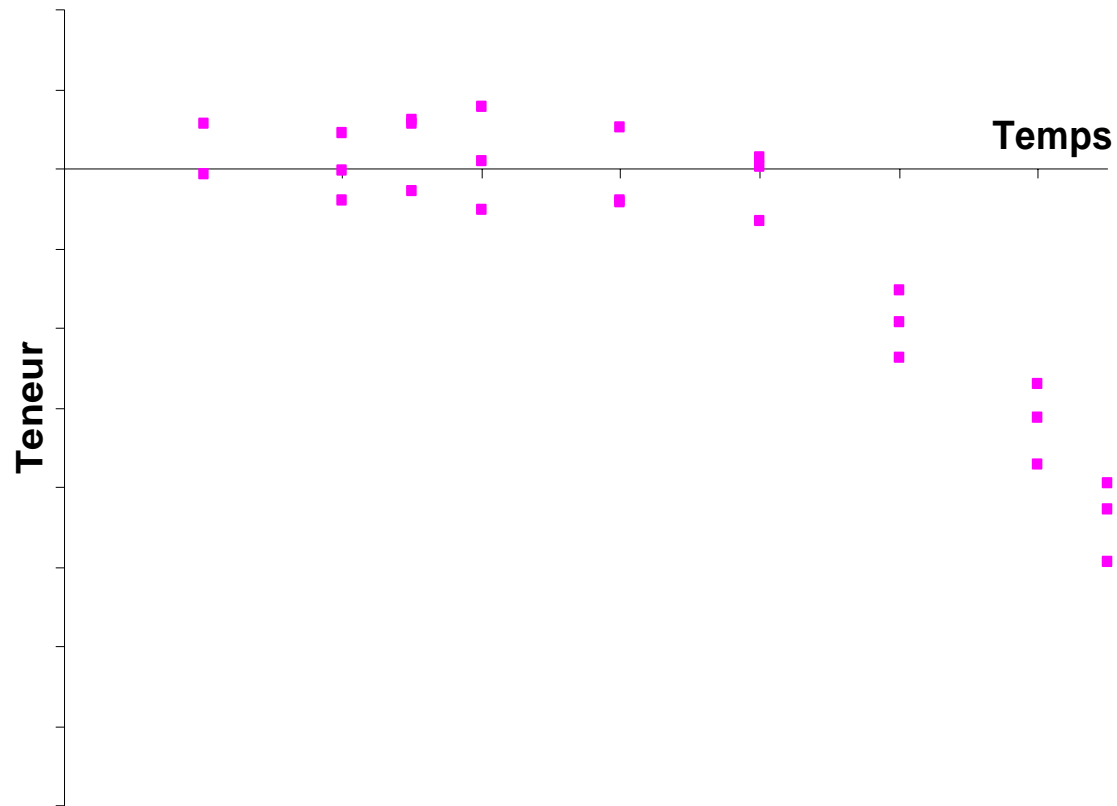
## Stabilité (1)

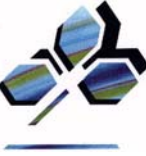
---

- Définition: absence de variation significative de la réponse de l'analyte en fonction du temps
- Analyses répétées à différents instants après stockage:
  - pour les étalons, y compris l'étalon interne
  - pour les échantillons réels, avant et après traitement
- Méthodologie



# Stabilité (2)

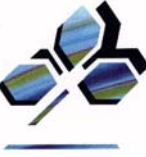




# Robustesse

---

**La robustesse** d'une méthode est sa capacité à **maintenir ses performances** lorsqu'elle est soumise à de **petites variations fortuites** des conditions expérimentales, *telles celles susceptibles de se produire lors de sa mise en œuvre par un autre opérateur, sur un autre matériel ou dans un autre laboratoire.*



# Outil d'étude : les plans d'expériences

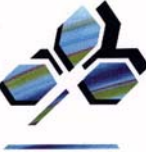
---

- Approche expérimentale permettant d'étudier les effets de plusieurs facteurs et de leurs interactions éventuelles.

Comment? : En provoquant de manière contrôlée des variations **simultanées** des facteurs.

Interprétation des résultats :

1. **Calcul** des effets et interactions à partir des réponses mesurées et de la *matrice des expériences*.
2. **Significativité** des effets?



# Types de plans d'expériences

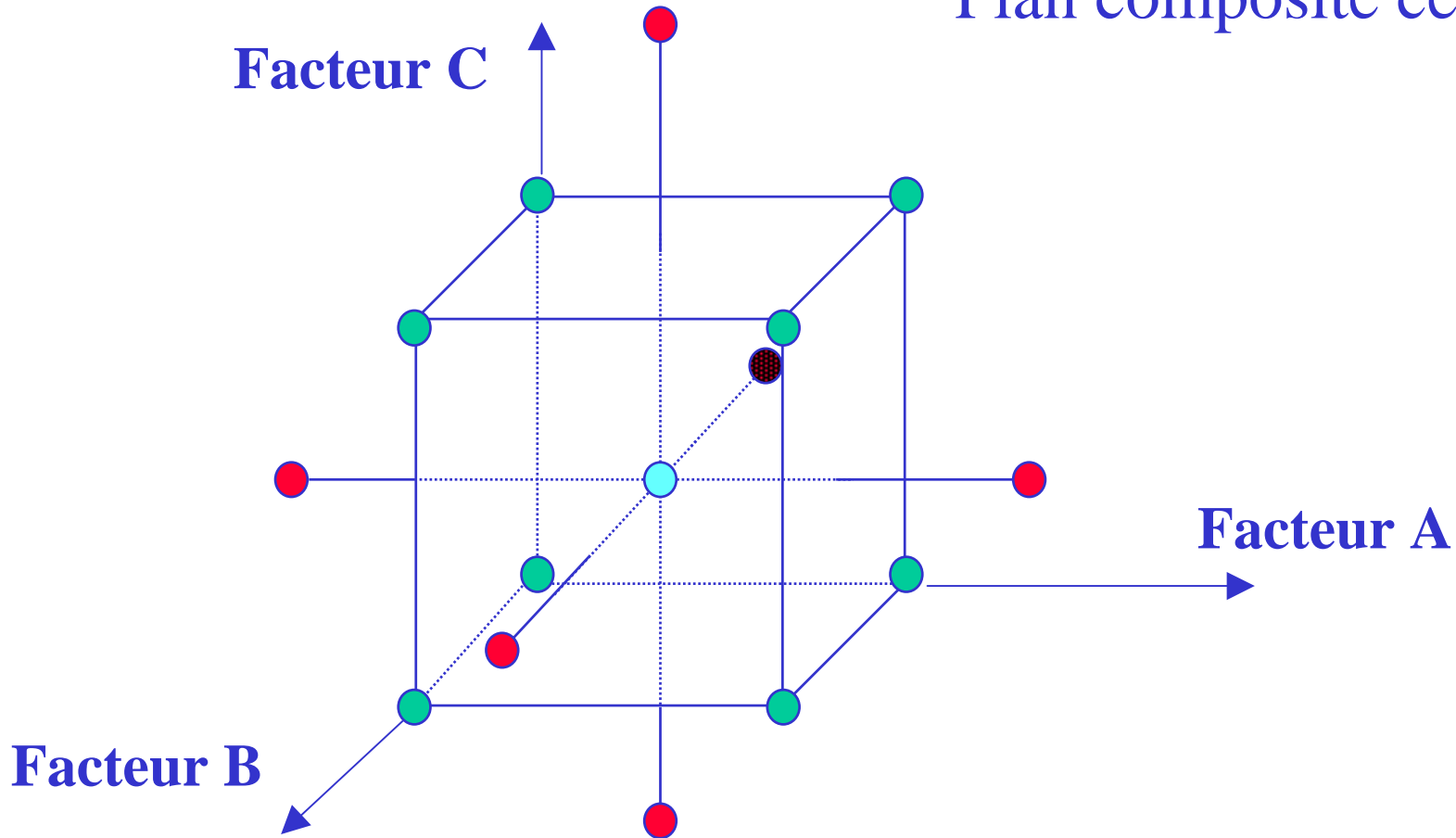
---

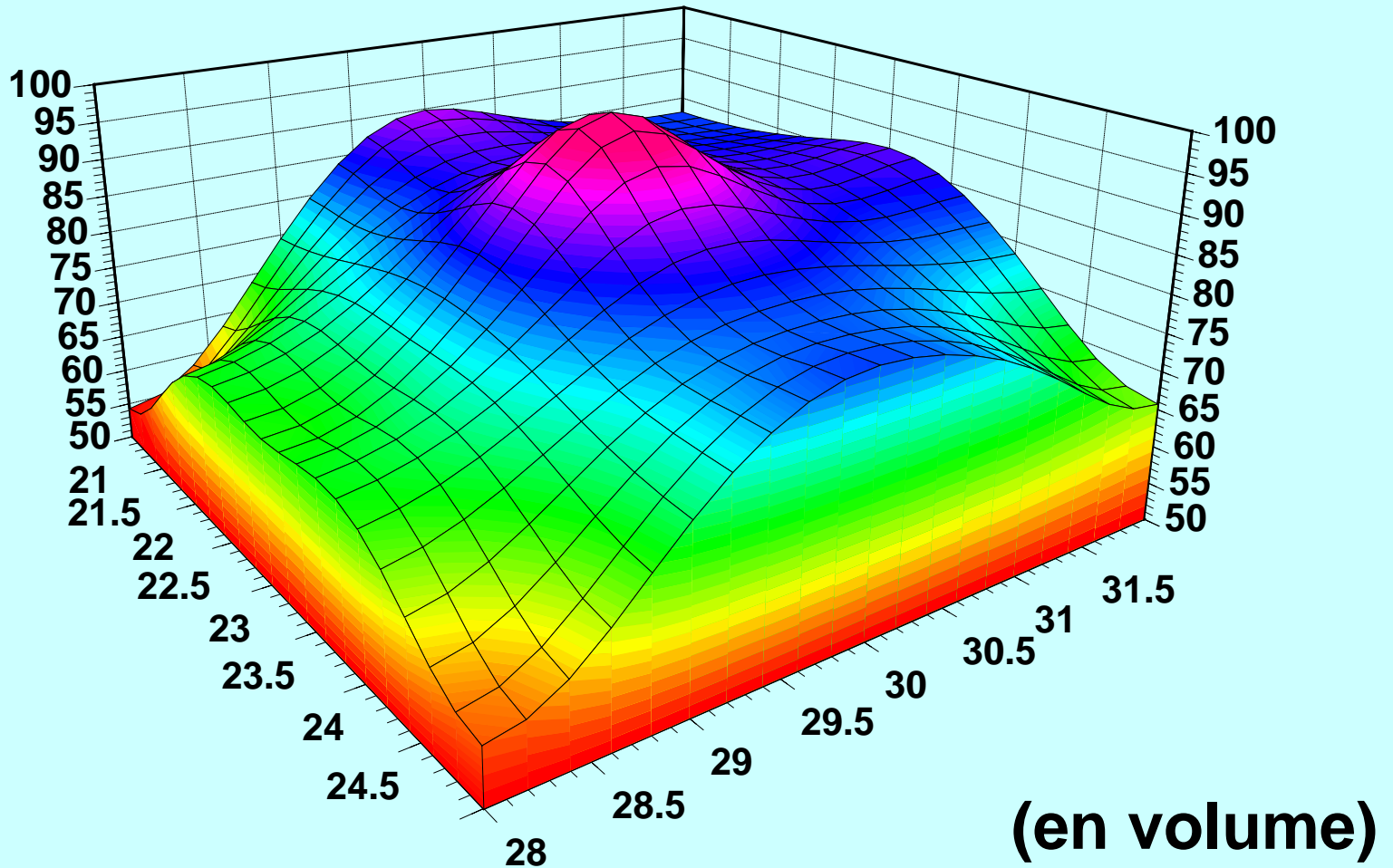
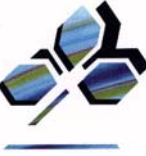
- Plans de « screening »
  - ☺ petit nombre d'essais expérimentaux
  - ☹ nombreuses aliases, rendant les interactions inaccessibles
- Plans pour surfaces de réponse
  - ☺ modélisation des réponses et définition des domaines de tolérance
  - ☺ interactions accessibles
  - ☹ plus grand nombre de mesures



# Exemple de plan

## Plan composite centré

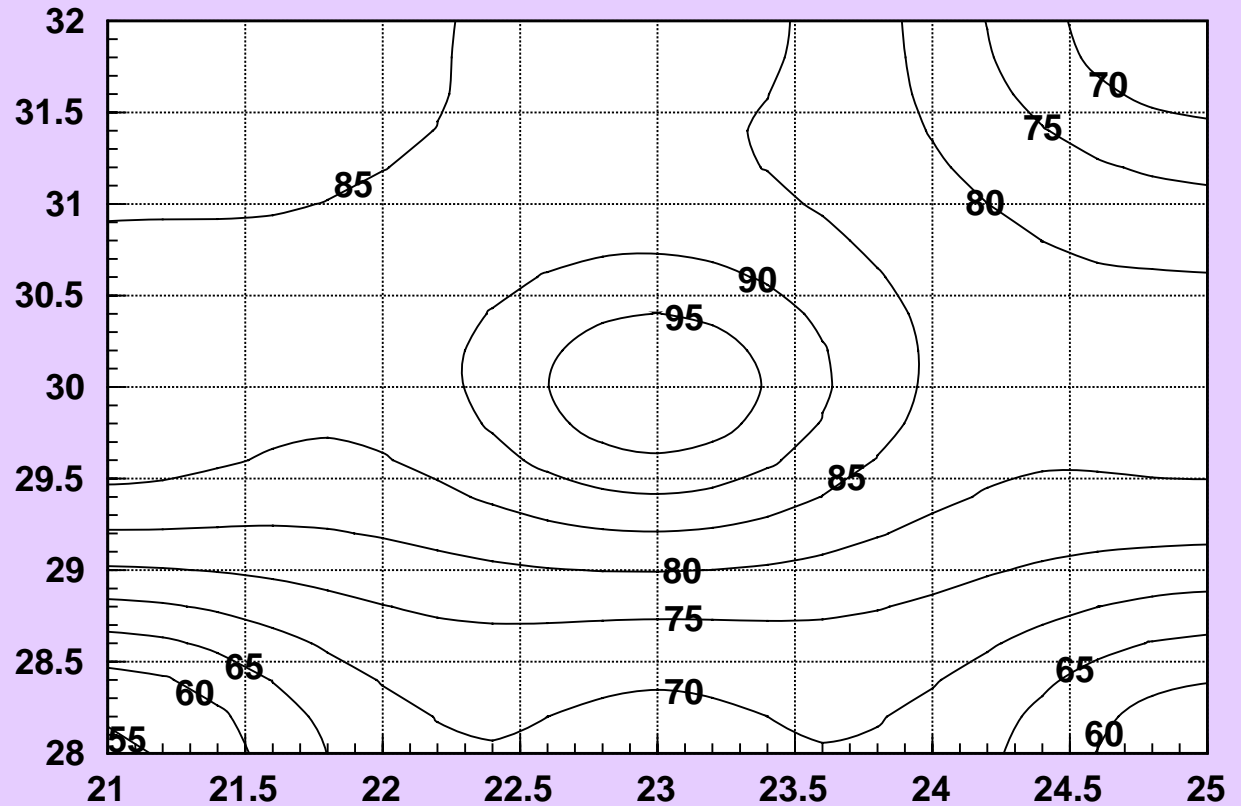






# Courbes d'isoréponses

(en volume)





## Paradoxe?

---

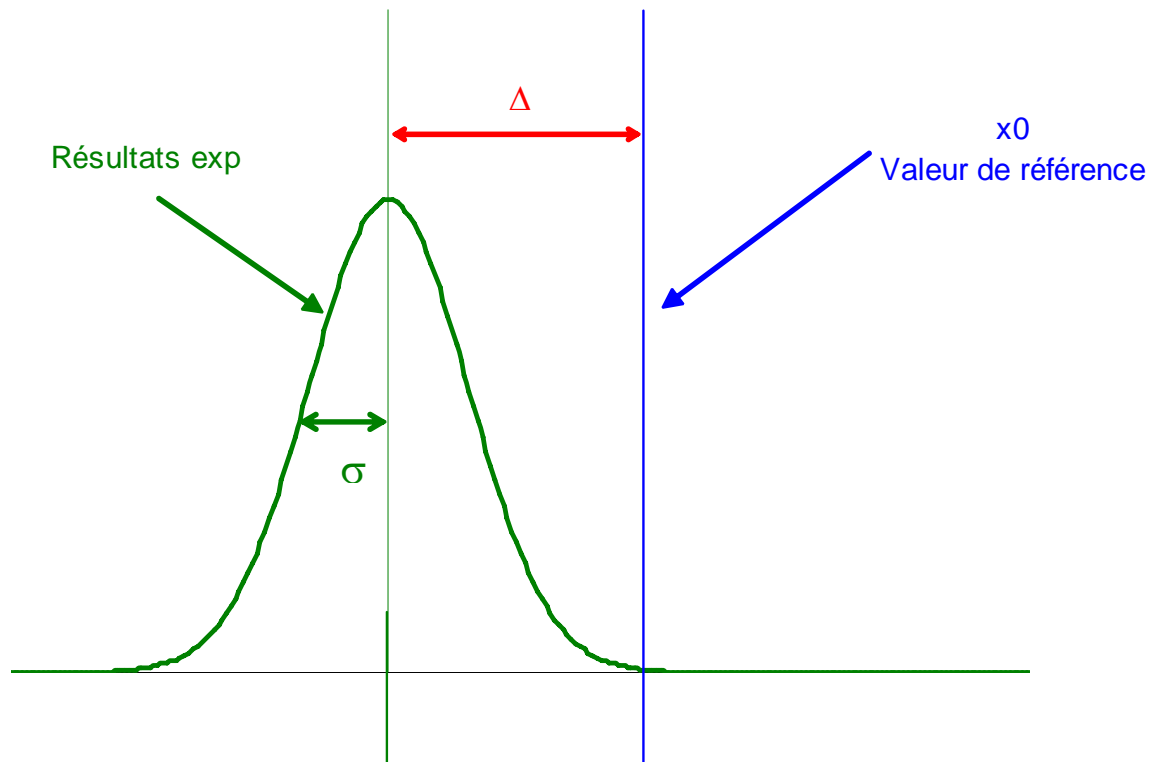
« Pour bien valider il faut mal travailler... »

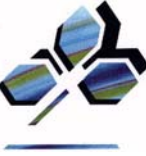


Mauvaise utilisation et interprétation des outils statistiques (= diagnostic)

## Exemple d'illustration

Comparaison des résultats obtenus par un opérateur à une valeur de référence (test de justesse)





# Test statistique

---

Hypothèse nulle ( $H_0$ ) : la valeur fournie par l'opérateur est celle de référence, i.e.  $\Delta = 0$

Si  $H_0$  est vérifiée alors la fonction discriminante

$$t = \frac{\Delta}{\sigma} \quad \rightsquigarrow \quad \text{Student} \quad t_{obs} = \frac{\bar{x} - x_0}{\hat{\sigma} / \sqrt{n}}$$

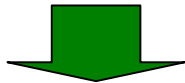
- $H_0$  non rejetée si  $|t_{obs}| < t_{lim}(\alpha)$
- $H_0$  rejetée si  $|t_{obs}| > t_{lim}(\alpha)$



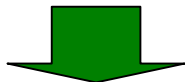
# Interprétation usuelle

---

$H_0$  non rejetée

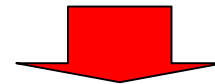


Pas de différence  
significative mise en évidence  
entre la valeur de l'opérateur  
et celle de référence



Décision : résultats considérés  
comme justes

$H_0$  rejetée



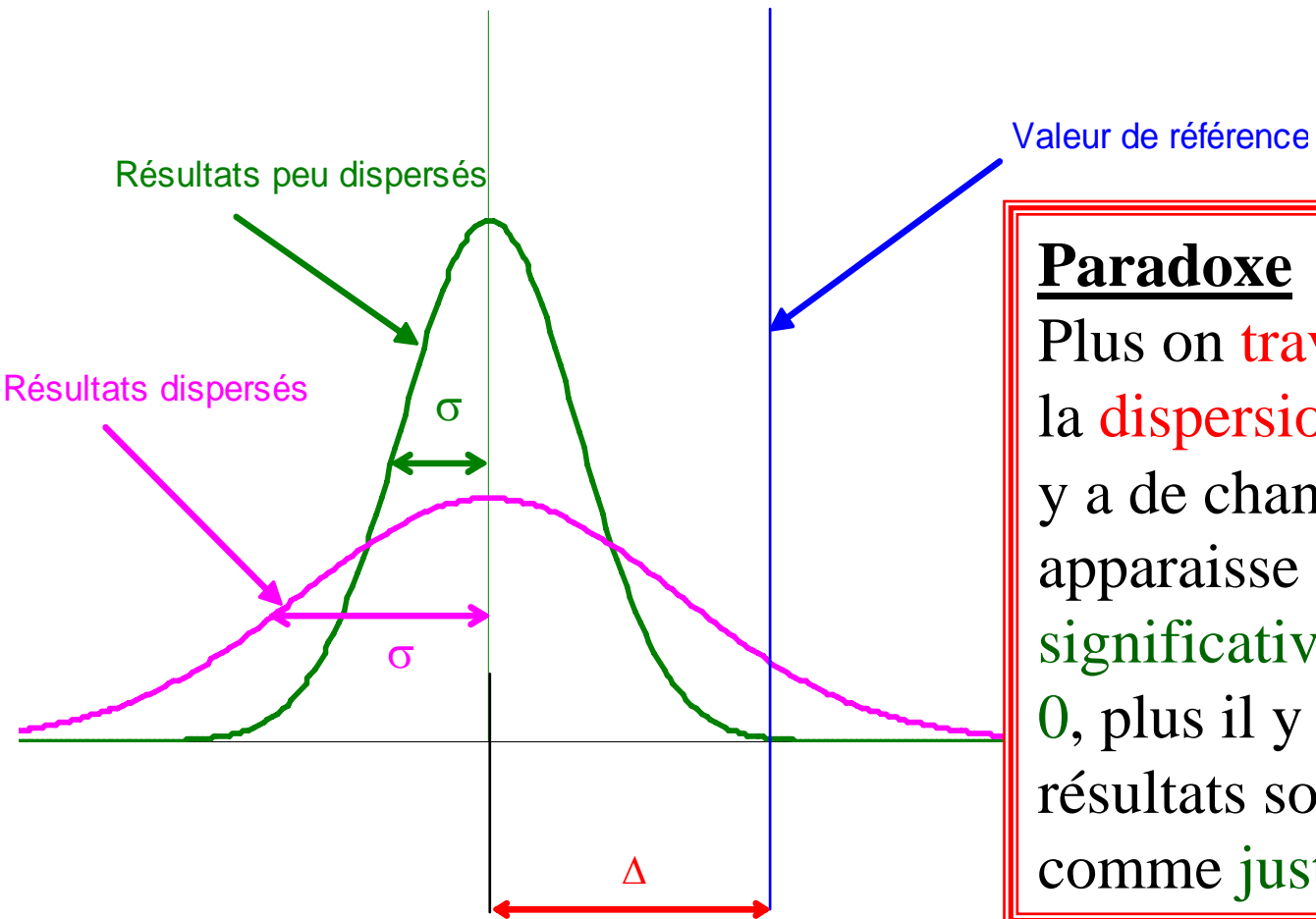
Mise en évidence d'une différence  
significative entre la valeur de  
l'opérateur et celle de référence



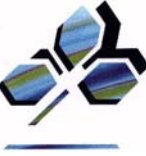
Décision : résultats considérés  
comme non justes



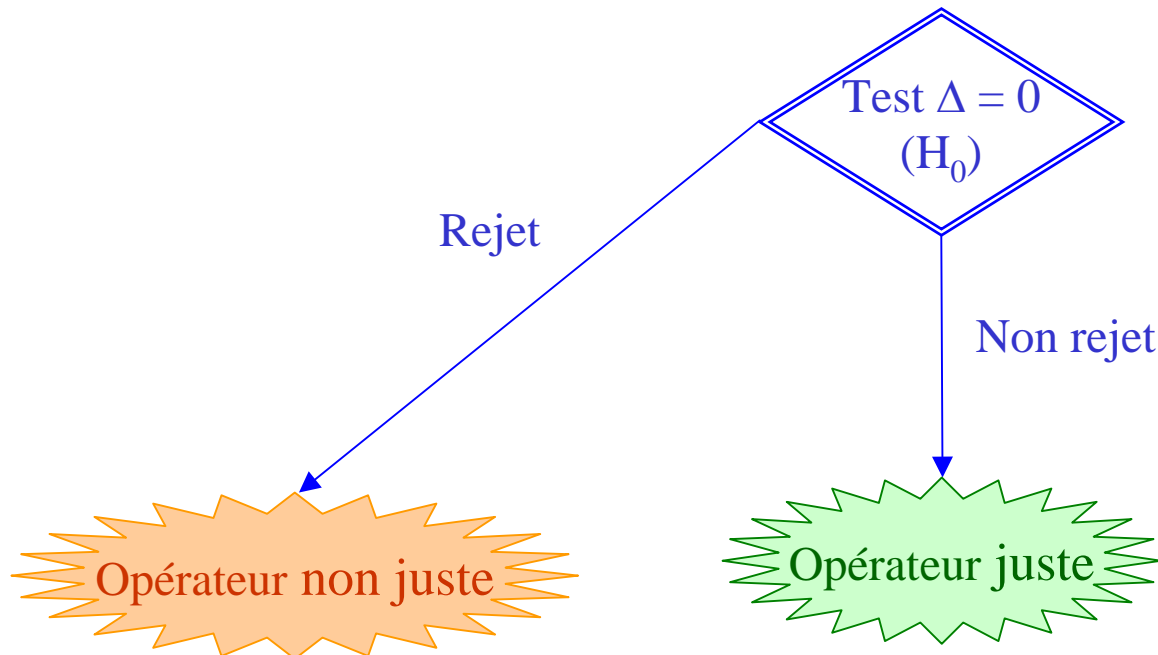
# Défaut du raisonnement



**Paradoxe**  
 Plus on **travaille mal**, *i.e.* plus la **dispersion est élevée**, plus il y a de chances pour que  $\Delta$  apparaisse **non significativement différent de 0**, plus il y a de chance que les résultats soient considérés comme **justes**

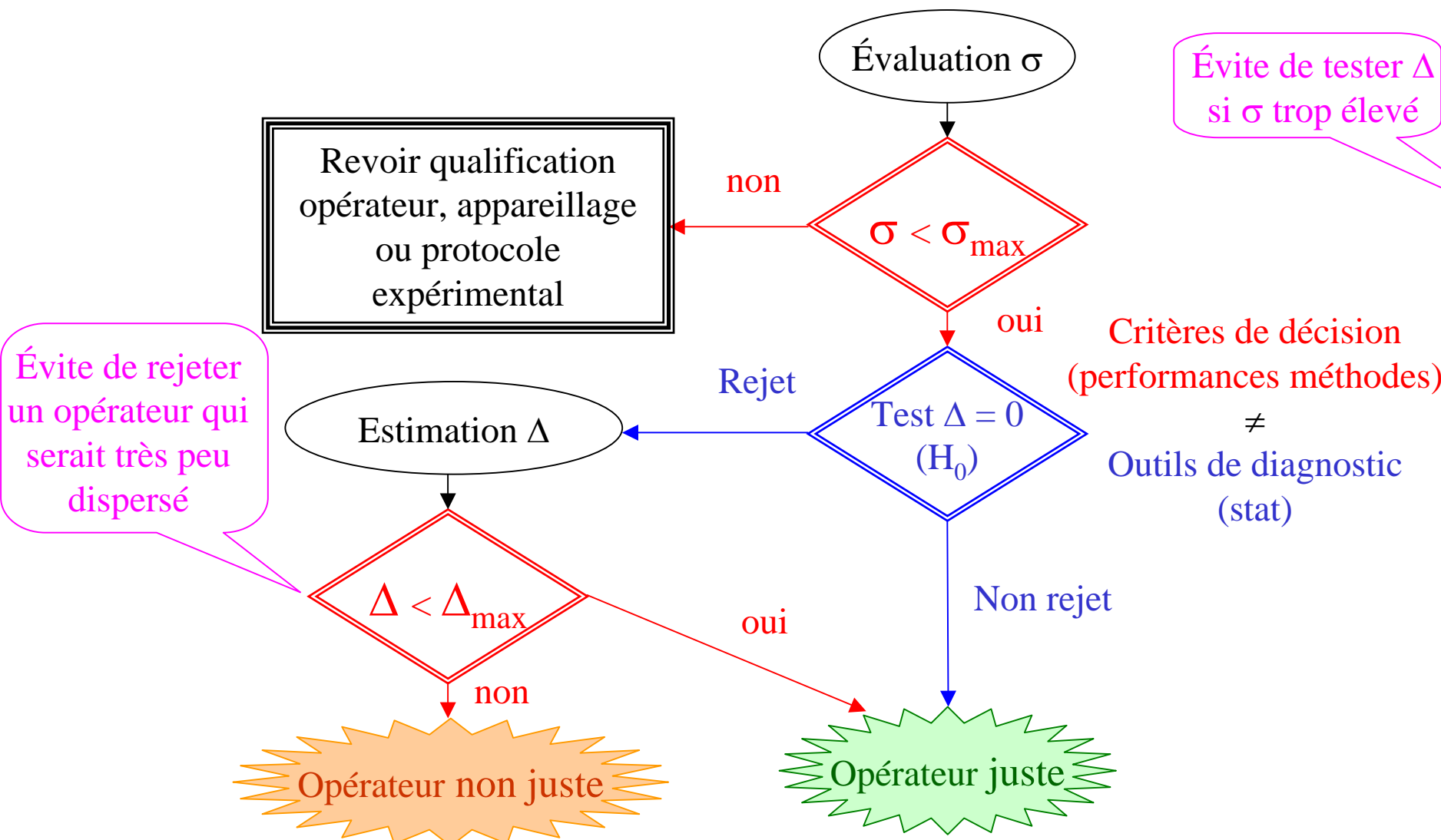


# Schéma classique





# Approche rationnelle





# Profil d'exactitude : principe

---

Approche basée sur le concept d'erreur totale = justesse + fidélité

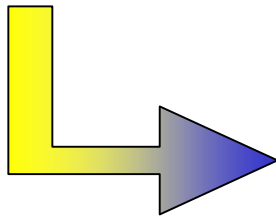
*(Proposée par une commission SFSTP en 2003)*

## Principe :

Lors de la validation utiliser 2 types d'échantillons :

➤ Étalons  $\Rightarrow$  établissement courbe d'étalonnage

➤ Témoins de validation  $\Rightarrow$  échantillons traités comme des inconnus

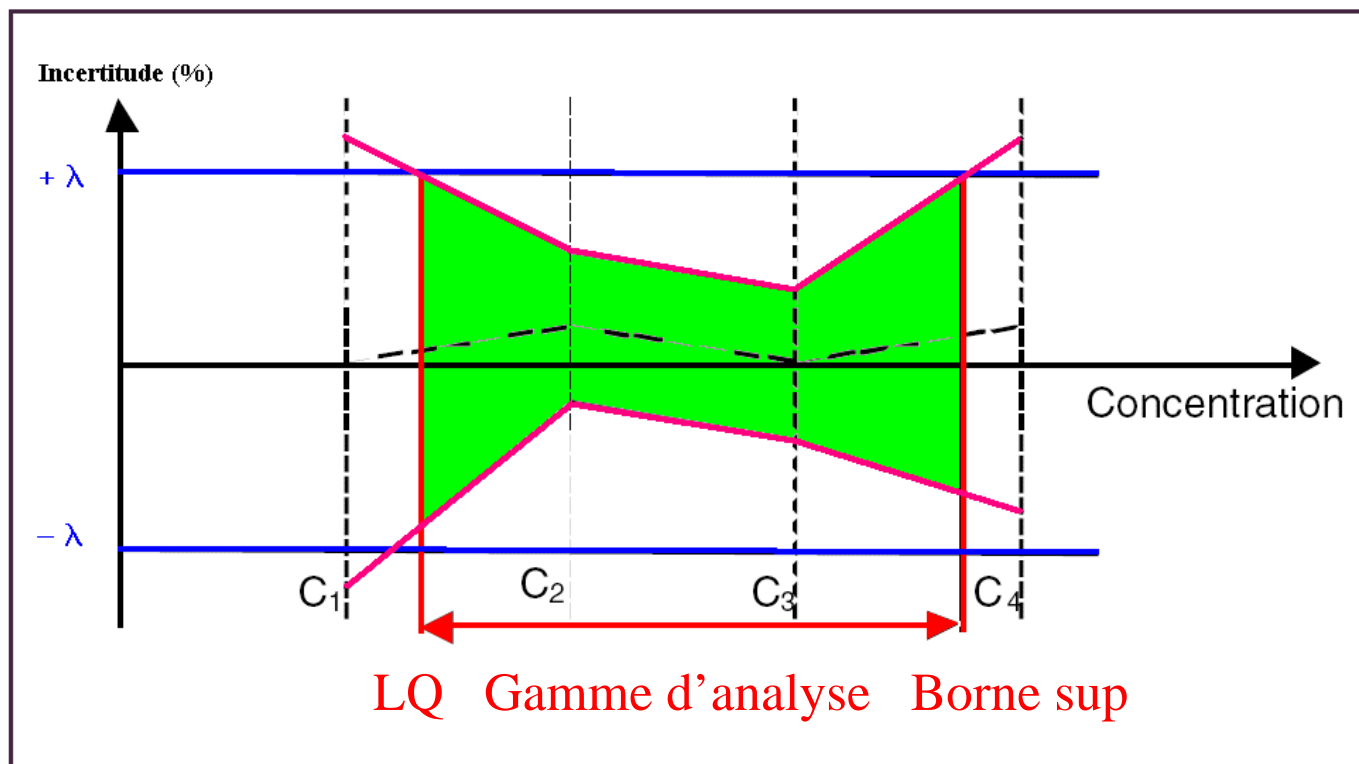


Estimation des caractéristiques de fidélité et justesse à partir des valeurs retrouvées sur les témoins de validation



# Profil d'exactitude : construction

- ✓ Construction de l'intervalle qui aura une probabilité donnée de contenir un nouveau résultat expérimental
- ✓ Comparaison avec les limites d'acceptation de la méthode





# Conclusions

---

- Place centrale de la validation dans le système qualité, pour assurer la fiabilité des résultats
- **Outils statistiques** sont des outils de diagnostic indispensables pour caractériser une méthode et la valider
- Éviter la confusion entre outils de diagnostic (test statistiques) et **critères de décision** (performances minimales attendues pour la méthode)
- La validation peut prendre différentes formes selon les besoins et domaines concernés, les approches évoluent et s'améliorent avec le temps mais les principes et outils restent fondamentalement similaires



# Lectures complémentaires (1)

---

- [1] **Quality Assurance in Analytical Chemistry.** *W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert*, VCH, Weinheim, Germany, **1995**.
- [2] **La validation des méthodes d'analyse, une approche chimiométrique de l'assurance qualité au laboratoire,** *M. Feinberg*, Masson, Sciences de l'ingénieur, Paris, France, **1996**
- [3] **Qualification, validation et test de conformité : outils indispensables pour la sécurité des analyses.** *J. Vial, K. Le Mapihan, A. Jardy*, Bioforum International Edition Française, **2002**, 2, 18-21.
- [4] **L'apport des méthodes statistiques dans la maîtrise de la qualité des analyses.** *A. Jardy, J. Vial*, « Dossier : Métrologie en chimie » *Analisis* **1999**, 27, 511-519.
- [5] **Study of the linear range in HPLC analyses with UV detection: Methodology and experimental application to the influence of the analyte UV-spectrum.** *J. Vial, A. Jardy*, *Journal of High Resolution Chromatography*, **1999**, 22, 217-221.



## Lectures complémentaires (2)

---

- [6] **Experimental comparison of the different approaches to estimate LOD and LOQ of an HPLC method.** J. Vial, A. Jardy, *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 2672-2677.
- [7] **How taking into account both preparation and injection in HPLC linearity studies.** J. Vial, A. Jardy, *J. Chrom. Sci.*, **2000**, 38, 189-194.
- [8] **Interlaboratory studies : the best way to estimate dispersion of an HPLC method and a powerful tool for analytical transfers.** J. Vial, A. Jardy, *Chromatographia*, **2001**, 53, S-141-S-148.
- [9] **Validation of internal normalization for impurities assays.** J. Vial, A. Jardy, J.M. Menet, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2001**, 24, 2067-2085.



## Lectures complémentaires (3)

---

- [10] **Nouveaux outils chimiométriques pour traiter la linéarité dans de cadre de la validation des méthodes séparatives.** J. Vial, A. Jardy, *Spectra Analyse* , **2001**, 223, 13-18.
- [11] **Robustness study of a reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of carboxylic acids in industrial reaction mixtures.** E. Destandau, J. Vial, A. Jardy, M.-C. Hennion, D. Bonnet, P. Lancelin, *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 572, 102-112.
- [12] **Robustness Tests.** B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, *LCGC Europe* , **2006**, 19, 418-423.
- [13] **Experimental Design Approaches in Method optimization.** Y. Vander Heyden, *LCGC Europe* , **2006**, 19, 469-475.