

Séminaire Session d'étude

Validation des bio-essais

18 juin 2026 ●

SFSTP



Philippe Le Mignot,
Président de la commission, **SFSTP**
Associate Director – CMC Analytical
R&D, **GSK Vaccines Belgique**



Didier Maire

Pharmacien responsable de l'établissement pharmaceutique et directeur de l'installation d'essai de **Confarma France**

Président de la Commission Validation des bio-essais **SFSTP**

Membre de la Commission Robustesse des procédures analytiques **SFSTP**

Membre de la Commission Incertitude de mesure **SFSTP**

Auteur STP Pharma Pratiques

- 2017 Incertitude de mesure des méthodes analytiques dans le contrôle du médicament
- 2021 Robustesse des procédures analytiques Partie 1: concept, réglementation et outils
- 2023 Robustesse des procédures analytiques Partie 2 : Exemples d'application et comparaison des logiciels

Validation des bio-essais



Philippe Le Mignot,
Président de la commission, **SFSTP**
Associate Director – CMC Analytical
R&D, **GSK Vaccines Belgique**



Nicolas Pointereau,
Responsable des opérations
analytiques, **QUALILAB**



Alexandra Cervantès,
Responsable Méthodes et Modèles
immunologiques
précliniques, **Virbac**



Elodie Ribert,
Head of Analytical Development
and Validation, **Clean Cells**



Isabelle Eynard,
Responsable R&D
Bioanalyse, **Virbac**



Jean-Marc Roussel,
Consultant en développement et
validation de méthodes
analytiques

Introduction : les Bio-essais

Introduction : les Bio-essais

- Un **bio-essai**, est une **procédure analytique** qui permet d'évaluer l'**activité**, la **concentration** ou la **pureté d'une substance** ou d'étudier ses **effets biologiques** à partir d'**organismes vivants** (entiers ou leurs composants, comme des cellules, des enzymes, des anticorps, etc).
- En d'autres termes, au lieu d'utiliser des méthodes chimiques ou physico-chimiques directes, un bio-essai :
 - Observe la **réponse biologique** d'un système vivant à la substance testée,
 - Ou mesure la substance testée pour la mettre en lien avec ses **effets biologiques**.

Introduction : les Bio-essais

- Les bio-essais peuvent être des techniques analytiques faisant appel à du matériel biologique :
 - ELISA,
 - PCR et/ou qPCR,
 - Cytométrie,
 - Microscopie,
 - Chromatographie....

Donc, tout ce qui concerne les méthodes biomoléculaires, cellulaires et analytiques rapportées à une réponse biologique.

Introduction : les Bio-essais

- Selon USP <1032> :
 - Les essais biologiques, ou bio-essais, utilisent du matériel vivant pour comparer des échantillons à des étalons.
 - Ces comparaisons peuvent être qualitatives et/ou quantitatives pour déterminer l'identité ou l'activité biologique de l'échantillon.
 - Ils sont utilisés dans différents contextes et objectifs :
 - Evaluation de l'efficacité et de la toxicité du produit pharmaceutique (biologique ou non),
 - Contrôle qualité de lots de produits biologiques,
 -

Introduction : Validation des Bio-essais

- Etape primordiale et réglementairement indispensable du contrôle qualité des produits biologiques.
- Etape fondamentale de l'évaluation des performances des méthodes d'analyse.
- Objectif :
 - Démontrer la qualité et la pertinence des résultats analytiques obtenus.



Introduction : Validation des Bio-essais

- Lignes directrices :
 - Existent pour les analyses chromatographiques et les essais de ligands (ICH M10).
 - Pour les bio essais in vivo, ex vivo et in vitro (cell base assays) des recommandations sont mentionnées dans l'USP :
 - Paramètres de validations à évaluer
 - Règles statistiques à appliquer.
 - L'ICH Q2 (R2) mentionne très succinctement l'évaluation des activités (potency) des produits testés.



Introduction

- Constat :
 - Nombreuses publications relatives à la validation en physico-chimie, mais....
 - Nettement moins relatives à la validation des bio-essais.
- Objectifs de la commission :
 - Décrire les méthodologies permettant de conduire les validations des bio-essais,
 - Présenter l'exploitation statistique des données de validation et l'utilisation du profil d'exactitude lorsque cela est possible,
 - L'incertitude des mesures sera également évoquée.
 - Présenter différents exemples d'application,

Introduction

- Sommaire :

1. Aspects réglementaires,
2. AQbD et cycle de vie,
3. Robustesse,
4. Validation,
5. Valeurs aberrantes,
6. Exemples
7. Suivi des performances,

Aspects réglementaires

1. Aspects réglementaires

Différents textes réglementaires sont applicables aux Bio essais :

- ICH Q14 Analytical Procedure Development (2023)
- ICH Q2(R2): Validation of Analytical Procedures (2023)
- USP <1225> Validation of analytical procedures (2017, révision en cours USP PF51(6)-2025)
- FDA: Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry (2018)
- ICH M10 Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis (2022)
- USP <1032> Design and Development of Biological Assays (2013, révision en cours USP PF50(6)-2024)
- USP <1033> Biological Assay Validation (2026)
- USP <1034> Analysis of Biological Assays (2013, révision en cours USP PF50(6)-2024)
- Japan Guideline on Bioanalytical Method Validation in Pharmaceutical Development (2013)

1. Aspects réglementaires

- ICH Q14: Development of analytical procedures (2023)
 - Décrit la méthodologie générale de développement d'une procédure analytique, de la conception (ATP) à la validation et la mise en oeuvre (notion de cycle de vie de la procédure analytique)
 - concept d'Analytical Quality by Design

1. Aspects réglementaires

- ICH Q2(R2): Validation of Analytical Procedures (2023)
 - Ce texte indique que l'objectif de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle est adaptée à l'objectif visé
 - Applicable pour :
 - Les tests d'identification destinés à garantir l'identité d'un analyte dans un échantillon,
 - Le dosage,
 - La recherche d'impuretés qui peut être soit un test quantitatif, soit un test de limite pour l'impureté dans un échantillon.

1. Aspects réglementaires

- ICH Q2(R2): Validation of Analytical Procedures (2023)
 - Décrit les procédures de dosage qui sont destinées à mesurer l'analyte présent dans un échantillon donné.
 - La méthodologie est donc :
 - Partiellement adaptée à la validation des Bio essais type essais chromatographiques et essais de liaisons Ligands,
 - Et partiellement utilisable pour les bio essais in vivo, ex vivo et in vitro.



1. Aspects réglementaires

- USP <1225>: Validation of Analytical Procedures
 - La révision en cours fournit des informations qui viennent compléter ICH Q2(R2).
 - La qualité du résultat reportable (reportable result) est mise en avant (notion d'écart-type du résultat reportable et de stratégie de réplication).

1. Aspects réglementaires

- FDA : Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry (2018)
 - S'applique aux procédures bioanalytiques telles que les essais chromatographiques (CC) et les essais de liaison de ligands (LBA)
 - Détermination quantitative des niveaux de médicaments, de leurs métabolites, de protéines thérapeutiques et de biomarqueurs dans des matrices biologiques.

1. Aspects réglementaires

- FDA : Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry (2018)
 - Utile pour les biomarqueurs car ICH M10 ne les couvre pas
 - Soulève les questions suivantes :
 - La méthode mesure-t-elle l'analyte prévu ?
 - Quelle est la variabilité associée à ces mesures ?
 - Quelle est l'étendue des mesures qui fournissent des données fiables ? (concept de LLOQ et ULOQ)
 - Le concept d'adéquation à l'objectif (Fit for Purpose) stipule que le niveau de validation doit être approprié à l'objectif prévu de l'étude.

1. Aspects réglementaires

- FDA : Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry (2018)
 - Les facteurs à évaluer :
 - Les étalons de référence, les réactifs critiques, les courbes d'étalonnage, les échantillons de contrôle de qualité (CQ), les sélectivité et spécificité, la sensibilité, la justesse, la fidélité, la récupération, la stabilité de l'analyte dans la matrice.
 - Avec les notions de :
 - Validation partielle qui évalue les modifications des méthodes bioanalytiques déjà validées.
 - Validation croisée qui est une comparaison des paramètres de validation de deux ou plusieurs méthodes ou techniques bioanalytiques.

1. Aspects réglementaires

- EMA : Guideline on bioanalytical method validation (2012)
 - Ce guide exposait les mêmes recommandations que le guide FDA : Bioanalytical Method Validation, Guide pour l'industrie (mai 2018)
 - Ne couvrait pas les biomarqueurs
 - Obsolète, remplacé officiellement par ICH M10 en 2022

1. Aspects réglementaires

- ICH M10 : Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis (2022)
 - Recommandations pour la validation des essais bioanalytiques pour la quantification chimique et biologique des médicaments :
 - Méthodes de mesure des concentrations de médicaments chimiques et biologiques et de leurs métabolites dans des échantillons biologiques.
 - Ces données sont utilisées pour prendre des décisions réglementaires dans toutes les phases pré-cliniques et cliniques.

1. Aspects réglementaires

- ICH M10 : Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis (2022)
 - Le texte reprend les items des guides :
 - FDA : Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry (2018),
 - Guideline on bioanalytical method validation de L'EMA (2012).

Ce guide est adapté aux essais chromatographiques et aux essais de ligands comme l'Elisa.

1. Aspects réglementaires

- **L'USP dispose de 3 chapitres de recommandations au sujet des Bio-essais.**
 - Le chapitre **<1032> DESIGN AND DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL ASSAYS (2013)**

présente la méthodologie pour la mise au point de procédures d'essais biologiques possédant une conception expérimentale solide, fournissant des données pouvant être analysées à l'aide de principes statistiques bien fondés, et qui sont adaptées à leur utilisation spécifique.

Ce chapitre se concentre sur les essais d'activité (potency) relative, dans lesquels l'activité d'une matière d'essai est quantifiée par comparaison avec l'activité d'une matière de référence.

1. Aspects réglementaires

- **Le chapitre <1032> DESIGN AND DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL ASSAYS (2013)**

Le texte précise que de nombreux principes décrits peuvent être appliqués à d'autres systèmes d'essai.

En raison de la variabilité inhérente aux systèmes d'essais biologiques (animaux, cellules : in vitro bio-essais : cell based, instruments, réactifs, en routine et entre laboratoires), une mesure absolue de l'activité est forcément plus variable. Cela a conduit à l'adoption de la méthodologie de l'activité relative dans laquelle on peut s'attendre à ce que l'échantillon testé se comporte comme une concentration ou une dilution de l'étalon.

L'activité relative est une mesure sans unité obtenue à partir d'une comparaison des relations dose-réponse des préparations médicamenteuses testées et des étalons.

1. Aspects réglementaires

- **Le chapitre <1032> DESIGN AND DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL ASSAYS (2013)**

L'essai biologique est utilisé pour évaluer l'activité du médicament en reflétant ou imitant si possible le mécanisme d'action connu ou prévu du produit et ceci en cours de développement.

Pour les essais de libération du produit, des spécifications d'activité sont établies pour définir un minimum ou une gamme de valeurs d'activité acceptables pour le produit. Enfin, le texte précise que l'étalon est un réactif essentiel dans les essais biologiques. Il doit être un matériau fiable auquel une préparation d'essai peut être comparée quantitativement. On peut attribuer à l'étalon une unité ou une activité spécifique qui représente un matériau totalement (100 %) actif.

Le chapitre traite des valeurs aberrantes.

1. Aspects réglementaires

Le nouveau chapitre <1033> BIOLOGICAL ASSAY VALIDATION (2026)

- Essais biologiques ou bio-essais
 - partie intégrante de l'évaluation de la qualité requise pour la fabrication et la commercialisation de médicaments biologiques et de certains médicaments non biologiques.
- Réponse d'un système biologique ou organisme à un échantillon
 - mesurent une réponse biologique, biochimique, physiologique ou immunologique au niveau cellulaire
 - reposent souvent sur la comparaison de la réponse du produit analysé à un standard

Le chapitre insiste sur la variabilité supérieure des essais biologiques par rapport aux essais chimiques.

1. Aspects réglementaires

Le chapitre <1033> BIOLOGICAL ASSAY VALIDATION (2026)

- Les paramètres de validation
 - l'exactitude relative
 - la spécificité
 - la fidélité intermédiaire (intégrant la répétabilité) et
 - la gamme

Les laboratoires peuvent utiliser la linéarité dilutive en comparant les courbes doses-réponses du produit testé vs l'étalon, pour vérifier l'exactitude relative et la gamme de la méthode.

- La robustesse
 - Ne constitue pas une exigence pour la validation
 - Evaluation recommandée avant la validation.

Dans ce chapitre, le terme "essai biologique" doit être interprété comme signifiant "essai biologique d'activité relative".



1. Aspects réglementaires

- **Le chapitre <1033> BIOLOGICAL ASSAY VALIDATION (2026)**

La quantité d'activité de l'étalon se voit initialement attribuer une valeur de 1,0 ou 100 %, et l'activité de l'échantillon test est calculée en comparant les courbes concentration-réponse pour la paire test et étalon.

On obtient une mesure sans unité, qui est l'activité relative de l'échantillon testé par rapport à l'activité de l'étalon.

Les méthodes de comparaisons utilisées sont les lignes parallèles ou les courbes parallèles à rapport de pente.

Les paramètres qui doivent être vérifiés sont l'activité relative, la spécificité, la fidélité intermédiaire (qui comprend la répétabilité), et le domaine de travail.

1. Aspects réglementaires

- **Le chapitre <1033> BIOLOGICAL ASSAY VALIDATION (2026)**

D'autres paramètres discutés dans le chapitre <1225> et dans ICH Q2(R2), tels que la limite de détection et la limite de quantification n'ont pas été inclus parce qu'ils ne sont généralement pas pertinents pour un essai biologique qui rapporte l'activité relative, sauf dans le cas des essais limites d'impuretés.

Le chapitre traite séparément la fidélité et l'exactitude et base son jugement de l'exactitude sur le biais et son intervalle de confiance.

1. Aspects réglementaires

- **Le chapitre <1034> ANALYSIS OF BIOLOGICAL ASSAYS (2013)**

Ce chapitre comprend des conseils pour l'analyse des résultats à la fois des essais biologiques décrits dans l'USP, et des essais biologiques non USP qui cherchent à se conformer aux qualités des essais biologiques recommandées par l'USP.

Elle fournit des recommandations pour la validation des méthodes bioanalytiques appliquées à la mesure des concentrations de médicaments dans les matrices biologiques obtenues dans les études toxicocinétiques animales et dans toutes les phases des essais cliniques.

Le chapitre donne des recommandations distinctes pour les essais de liaisons aux ligands qui diffèrent considérablement des méthodes analytiques chromatographiques.

1. Aspects réglementaires

- **Le chapitre <1034> ANALYSIS OF BIOLOGICAL ASSAYS (2013)**

Ce chapitre décrit la validation complète (avec les critères de sélectivité, transfert d'information, limite inférieure de quantification, courbe d'étalonnage, justesse, fidélité, qualité de la dilution, effet de matrice, stabilité), la validation partielle et la validation croisée.

Les chapitres <1032>, <1033> et <1034> sont adaptés pour les validations des Bio-essais et en partie pour les ligands

1. Aspects réglementaires

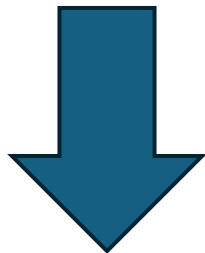
- Directive japonaise sur la validation des méthodes bioanalytiques dans le développement pharmaceutique (2013)
 - Relative au développement des médicaments dont les méthodes bioanalytiques :
 - Sont utilisées dans les études pharmacocinétiques cliniques et pré-cliniques (y compris les études toxicocinétiques)
 - Afin d'évaluer l'efficacité et la sécurité des médicaments et des produits pharmaceutiques et de leurs métabolites.

Elle prône l'utilisation de critères appropriés définis de manière prospective, sur la base d'un raisonnement scientifique.

1. Aspects réglementaires

- ICH Q14 Analytical Procedure Development (2023)
 - Guide compagnon d'ICH Q2(R2) (validation de méthode)
 - Utilisation des outils d'ICH Q2(R2)
 - Voir commission SFSTP "Quality by design Analytique (AQbD)"

Détaillons donc cela !



AQbD et cycle de vie

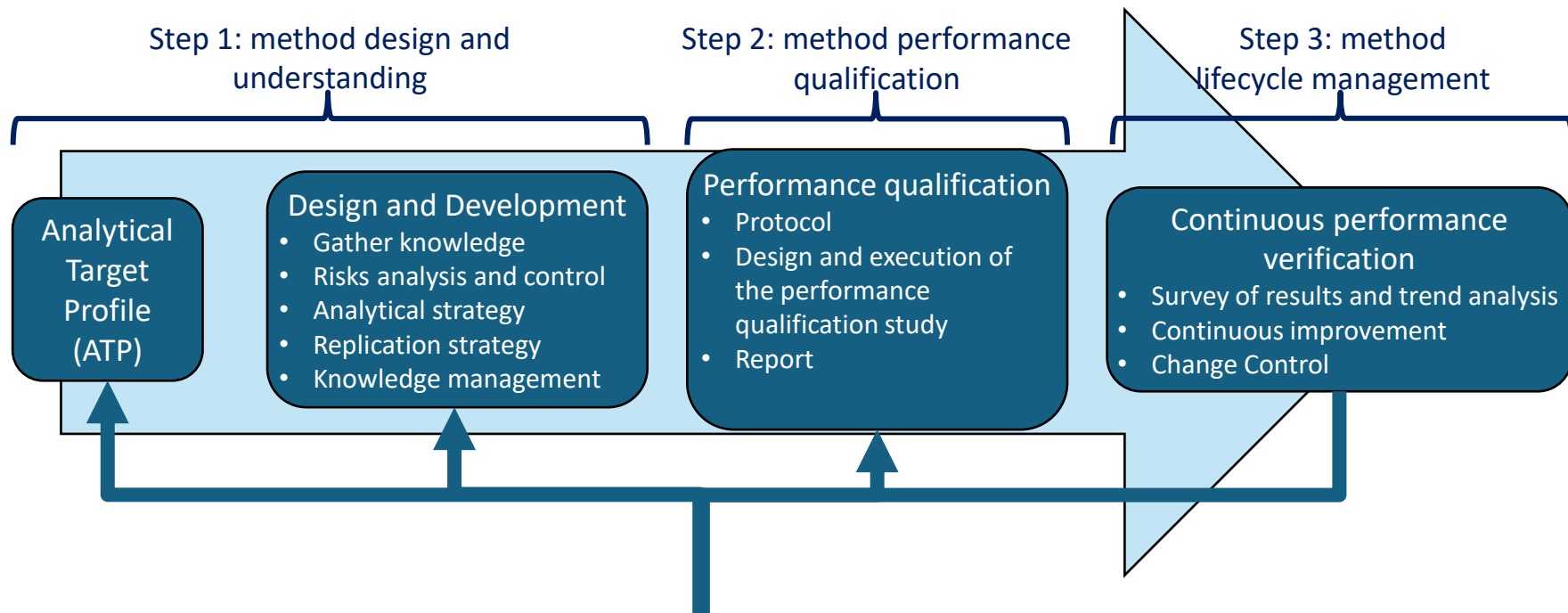
2. AQbD et cycle de vie

- Développement et validation: AQbD → ICH Q14
 - AQbD (<USP1220>): application des principes du QbD au Développement Analytique

“Quality by Design is a systematic approach to development that begins with predefined objectives and emphasizes product and process understanding and process control, based on sound science and quality risk management.”

(ICH, Q8(R2) Pharmaceutical Development (ICH, 2009)).

2. AQbD et cycle de vie

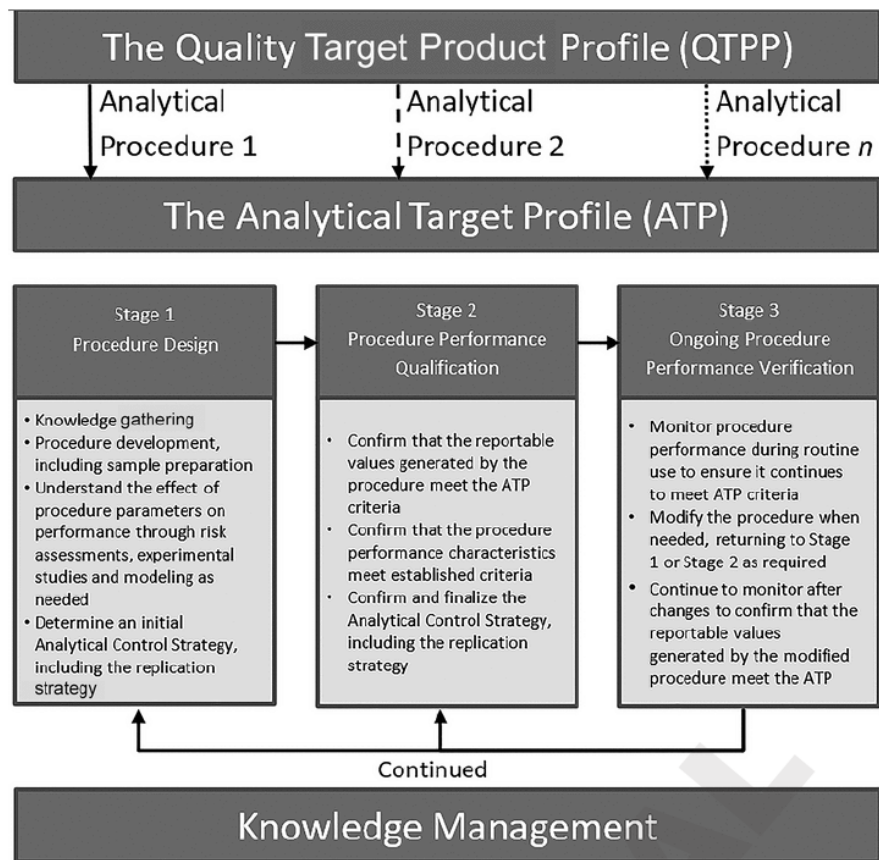


Continuous improvement

Adapted from: C. Sanger, E. Van Tricht; The Netherland area biotech discussion group - 2017

2. AQbD et cycle de vie

USP <1220>



2. AQbD et cycle de vie

Figure 1: The Analytical Procedure Lifecycle

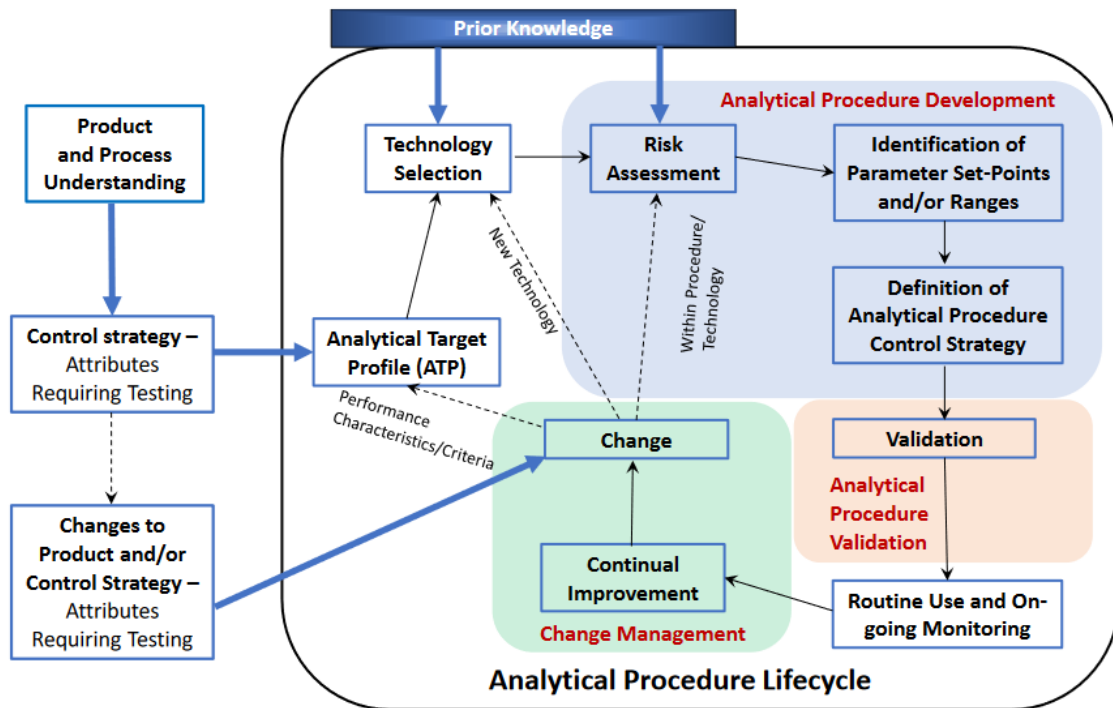


Schéma extrait de
ICH Q14

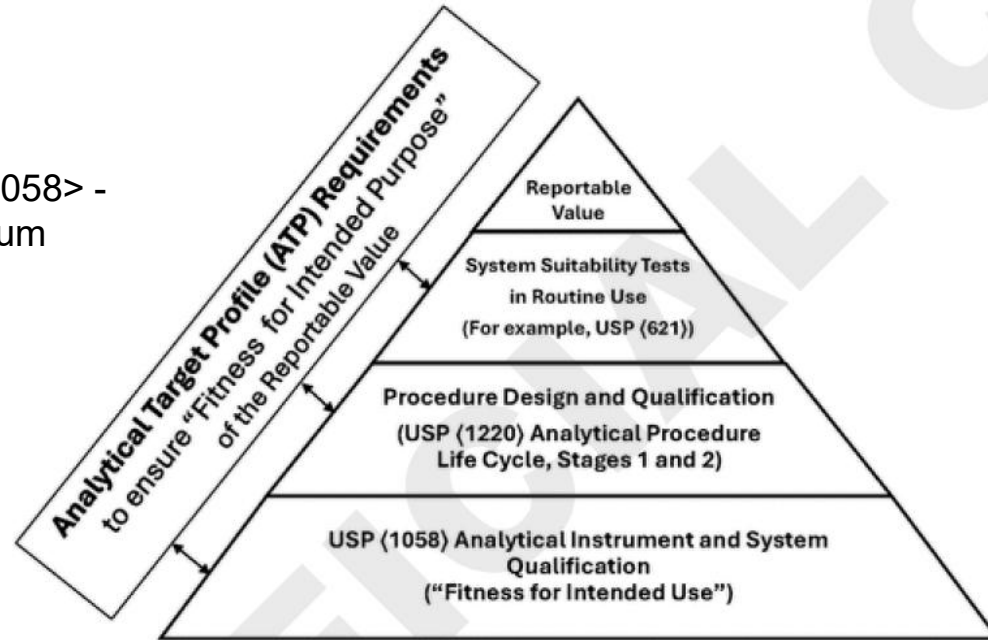
2. AQbD et cycle de vie

- ICH Q14 Analytical Procedure Development (2023)
 - Approche basée sur les risques
 - Notion d'Analytical Target Profile (ATP)
 - Point clé sur la Robustesse → Voir commission SFSTP « Robustesse »
 - Notion de procédure analytique multivariée (ne concerne pas les Bio-essais)
 - Notion d'analyse libératoire en temps réel
 - Proposition d'une approche alternative basée sur l'Erreur Analytique Totale (TAE) : combinaison de l'Exactitude (Biais) et de la Fidélité
 - Suivi des performances des méthodes analytiques – carte de contrôle (USP <1221>)
 - Notion de modification/changement de méthode après dépôt AMM

2. AQbD et cycle de vie

Qualification instrumentale : l'intégration dans le cycle de vie

Schéma d'après USP <1058> -
USP Pharmacopeial Forum
51(2)-2025



2. AQbD et cycle de vie

Qualification instrumentale : l'intégration dans le cycle de vie

Stage 1 Specification and Selection of the AIS	Stage 2 Installation and Performance Qualification/Validation	Stage 3 Ongoing Performance Verification
○ URS (defines intended use) ○ System level Risk Assessment (RA) ○ Evaluation and selection ○ Supplier Assessment /Qualification ○ Identify critical AIS and data integrity controls ○ Supplier SW assessment if required ○ Selection Report ○ Purchasing specification & PO	○ Plan work Required from RA ○ Site Preparation ○ Supplier commissioning ○ Prototyping and Configuration ○ Update URS if necessary ○ Requirements traceability ○ Leverage the supplier's installation and commissioning work ○ User Acceptance Testing ○ Write SOPs and perform training ○ Instrumentation Logbook ○ Summary report & Authorization for use	○ Operational SOPs and Training ○ Use of Instrument Logbook ○ Trend Analysis and Monitoring ○ Preventative Maintenance Calibration & Requalification ○ Repair ○ Change Control and Configuration Management ○ Monitoring IT support ○ Periodic Review ○ Revalidation ○ Record Management/Archiving ○ Instrument/system retirement

2. AQbD et cycle de vie

Qualification instrumentale : l'intégration dans le cycle de vie

Examples of Risk-based Activities in the Integrated AISQ Life Cycle									
INTEGRATED LIFE CYCLE ACTIVITY	◀1058▶ AISQ Category of increasing risk ▶								
	APPARATUS		INSTRUMENT			SYSTEM			
	A1 No metrological function	A2 No User calibration required	B1 Firmware control	B2 In-built calculations	B3 User defined routines	C1 Non configurable application software	C2 Configurable application software	C3 Configurable application software & custom modules	
Stage 1: Specification and Selection of the apparatus/instrument/system									
URS (define intended use)					YES				
Risk Assessment (RA)					YES				
Evaluation and selection					YES				
Supplier Assessment /Qualification	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
ID Critical Inst & DI controls	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Selection Report	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Supplier SW assessment	NO	NO	NO	NO	NO	NO	CONSIDER	YES	
Purchasing specification & PO					YES				
Stage 2: Installation and Performance Qualification/ Validation									
Plan work Required from RA	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Site Preparation	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Supplier install and integration	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Supplier commissioning	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Prototyping and Configuration	NO	NO	CONSIDER	CONSIDER	CONSIDER	CONSIDER	YES	YES	
Update URS	NO	NO	CONSIDER	CONSIDER	CONSIDER	YES	YES	YES	
Requirements traceability	NO	NO	CONSIDER	CONSIDER	CONSIDER	YES	YES	YES	
User Acceptance Testing	NO	NO	CONSIDER	CONSIDER	CONSIDER	CONSIDER	YES	YES	
Write SOPs and training	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Instrumentation Log book	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Authorisation for use	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Stage 3: Continued Performance Verification									
Operational SOPs and Training	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Use of Instrument Logbook	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Trend Analysis and Monitoring	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Preventative Maintenance Calibration & Requalification	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Repair	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Change Control and Configuration Management	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Monitoring IT support	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Periodic Review	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Revalidation	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Record Management/Archiving	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	
Instrument/system retirement	NO	NO	YES	YES	YES	YES	YES	YES	

Table 1. Examples of Mapping the Integrated Life Cycle Model to the Risk Categories

2. AQbD et cycle de vie

Qualification instrumentale : l'intégration dans le cycle de vie

- **Validation des Systèmes Informatisés**

- Chaque système Informatisé utilisé dans un cadre réglementaire pour générer des données est soumis à un exercice de validation.
- La validation d'un système informatisé (VSI) correspond à la preuve documentée que le système fonctionne et fonctionnera invariablement dans son environnement selon les spécifications préétablies.
- Le choix du système informatisé devra être effectué pour être compatible avec une utilisation dans un contexte réglementaire (libératoire...), notamment concernant toutes les sécurités à mettre en place pour garantir l'intégrité des données conformément à l'Annexe 11 des BPF, la note 21 CFR part 11, Guideline Data Integrity FDA, texte OCDE n°17, GAMP 5 (ISPE) etc...

2. AQbD et cycle de vie

Qualification instrumentale : l'intégration dans le cycle de vie

- **Validation des Systèmes Informatisés**

- Une approche par les risques est recommandée par GAMP5, ISPE et annexe 11 GMP Européenne.
- Selon les risques identifiés dans l'Analyse de Risques, des actions seront mises en place pour les atténuer ou les détecter le cas échéant.
- Des opérations de tests seront à effectuer sur les environnements représentatifs du système (souvent env. test/val et env. prod).
 - A l'issue de ces opérations et en fonction des anomalies rencontrées, le système pourra être déclaré Validé Conforme, Validé Conforme avec restriction ou Non Validé.
 - La résolution des anomalies entraine souvent des mises en place de sécurités supplémentaires. Ces dernières peuvent être logicielles ou documentaires.

2. AQbD et cycle de vie

Qualification instrumentale : l'intégration dans le cycle de vie

- **Validation des Systèmes Informatisés**

- Dans les cas des Bio-essais, les systèmes ne sont pas toujours conçus pour répondre à ces besoins de Data Integrity (aux deux niveaux exploratoire et libératoire),
 - il est donc nécessaire d'effectuer une analyse des écarts (pour le cas libératoire)
 - et de mettre en place les mesures adaptées permettant de réduire la cotation finale des risques identifiés.

2. AQbD et cycle de vie

Comment trouver le juste équilibre entre développement et validation ?

Journal of Chromatography B 1233 (2024) 123946



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jchromb



Using Analytical Quality by Design to improve analytical method development in vaccines quality control: Application to an optimized quantitative high-performance anion-exchange chromatographic method

Isabelle Moineau^a, Véronique Chambon^{b,*}, Céline Perret^b, Luce Gouit^b, Isabelle Zamora^b, Mannaig Macumi^a, Stéphanie Fertier-Prizzon^b, Olivier Pitiot^b

^a AKTEHOM, Berges du Rhône, 64 avenue Leclerc, 69007 Lyon, France

^b Analytical Sciences, Sanofi, Campus Mérieux, 1541 Avenue Marcel Mérieux, 69280 Marcy l'Etoile, France

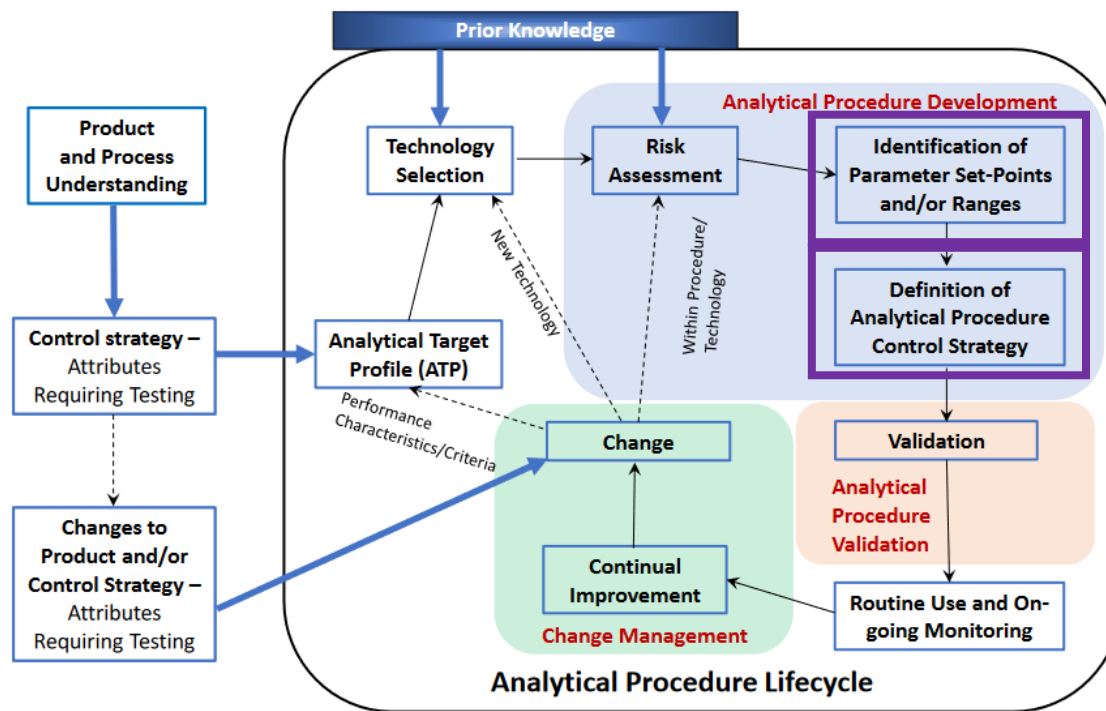
Soumission réglementaire de l'approche de développement / analyse de risque

Robustesse

3. Robustesse

Schéma extrait de
ICH Q14

Figure 1: The Analytical Procedure Lifecycle



3. Robustesse

3.1 C'est quoi ?

- "The robustness of an analytical procedure is a measure of its **capacity to meet the expected performance criteria during normal use**. Robustness is tested by deliberate variations of analytical procedure parameters" (ICH Q14)

3. Robustesse

3.1 C'est quoi ?

- Pourquoi insister sur ce concept ?
 - ICH Q2(R1): le terme "Robustness" apparait 4 fois dans le corps du texte
 - ICH Q2(R2): **14 fois !**
 - ICH Q14: **29 fois !**

Les autorités accordent une attention renouvelée à ce concept.

3. Robustesse

3.2 Quand ?

- "For most procedures, robustness evaluation is **conducted during development**. If the evaluation of robustness was already conducted during development, it does not need to be repeated during validation (as discussed in ICH Q2)". (ICH Q14)

3. Robustesse

3.2 Comment ?

- En dehors de l'HPLC/UHPLC,
- En dehors de l'utilisation de logiciels de développement :
 - Classiquement « One Factor at a Time »
 - Bien mieux : utilisation de plans d'expériences



3. Robustesse

3.2 Comment ?

- La méthode OFAT est à proscrire car elle n'explore qu'une petite partie des combinaisons des facteurs :
 - Quantité d'information récupérée faible, voire insuffisante
 - Information récupérée dépendante de la matrice de travail choisie

N° Essai	A	B	C	D	Réponse
1	-	+	+	+	Y1
2	+	-	+	+	Y2
3	+	+	-	+	Y3
4	+	+	+	-	Y4

N° Essai	A	B	C	D	Réponse
1	+	0	0	0	Y'1
2	-	0	0	0	Y'2
3	0	+	0	0	Y'3
4	0	-	0	0	Y'4
...					Y'n
8	0	0	0	-	Y'8

N° Essai	A	B	C	D	Réponse
1	+	-	-	-	Y''1
2	-	+	-	-	Y''2
3	-	-	+	-	Y''3
4	-	-	-	+	Y''4

3. Robustesse

3.2 Comment ?

- A l'aide de logiciels de traitement de plans d'expériences (NemrodW, Azurad, Design Expert, Minitab, JMP, Statgraphic...)
- A l'aide de logiciels de développement de méthodes HPLC/UHPLC (Chromsword, Fusion, Drylab, ACD Autochrom)
- A l'aide de logiciels d'évaluation statistique des méthodes d'analyse (NeoLiCy, Validat)

3. Robustesse

- **La robustesse est un élément incontournable du développement des méthodes d'analyse:**

- Dans le cadre de l'AQbD (USP <1220> et ICH Q14)
- Dans le cadre des exigences de la FDA
- Dans l'objectif de définir les conditions de routine pour la méthode
- Dans l'objectif de connaître et maîtriser les « faiblesses » de la méthode
- Dans l'objectif d'en faciliter sa validation et son utilisation future

***Une méthode non robuste n'est pas nécessairement une méthode non utilisable,
C'est une méthode dont on connaît les limites et dont on sait quels en sont les
paramètres à maîtriser, voire dans quelles limites il faut les conserver***

3. Robustesse

- **3.3 Exemple d'un test de coagulation (Cf. Commission SFSTP Robustesse)**
 - Etude de robustesse d'une méthode de dosage d'activité dans un produit biologique
 - Etude menée dans le cadre de la validation de méthode afin de préciser les conditions du mode opératoire et étudier la gestion des échantillons par l'automate de mesure

3. Robustesse

• 3.3 Exemple d'un test de coagulation (Cf. Commission SFSTP Robustesse)

- Identification des facteurs critiques à étudier:
 - Préparation des échantillons (décongélation)
 - Préparation du réactif déclenchant la coagulation (reconstitution)
 - Incubation avec réactif

7 facteurs :

- X1 : temps de décongélation échantillon (4-15min)
- X2 : temps d'attente de l'échantillon (0-60 min)
- X3 : Quantité de réactif (0,9-1,1mL de solution / 23-27 mM)
- X4 : temps d'attente réactif reconstitué (0-60 min) :
- X5: température réactif reconstitué (5°C-30°C)
- X6: Durée d'incubation (1min – 4min)
- X7: température incubation (36°C-38°C)

1 réponse :
CV %

3. Robustesse

• 3.3 Exemple d'un test de coagulation (Cf. Commission SFSTP Robustesse)

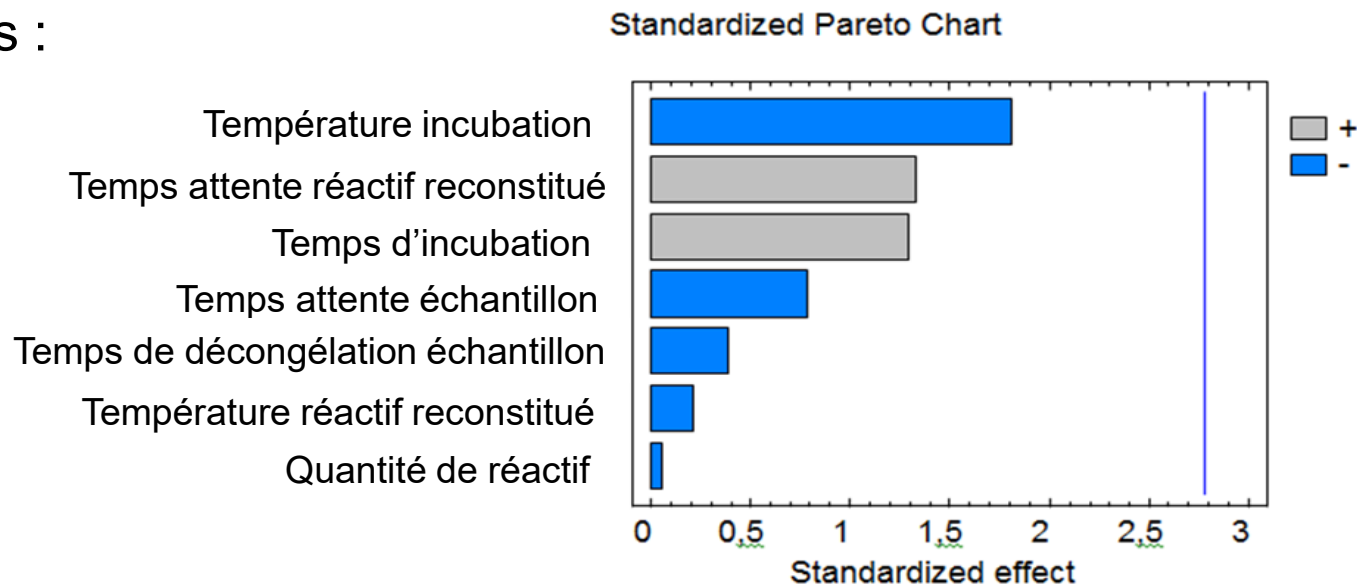
- Plan d'expérience : +1/-1

Expérience	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Facteurs												
A: Temps de décongélation au bain-marie échantillon	4mn	15mn	15mn	4mn	15mn	15mn	15mn	4mn	4mn	4mn	15mn	4mn
B: Temps d'attente échantillon	0 mn	0 mn	60mn	0 mn	60mn	60mn	0 mn	60mn	60mn	60mn	0 mn	0 mn
C: Quantité (volume) de réactif	23mM	27mM	27mM	23mM	27mM	27mM	27mM	23mM	23mM	23mM	27mM	23mM
E: Température après reconstitution du réactif	5°C	30°C	5°C	30°C	30°C	5°C	30°C	30°C	30°C	5°C	5°C	5°C
D: Temps d'attente après reconstitution réactif	0 mn	0 mn	60mn	0 mn	60mn	60mn	0 mn	60mn	60mn	60mn	0 mn	0 mn
F: Temps d'incubation	1mn	1mn	1mn	4min	1min	4min	4min	1mn	4min	4min	4min	1mn
G: température d'incubation	38°C	38°C	36°C	38°C	38°C	38°C	36°C	36°C	36°C	38°C	36°C	36°C

3. Robustesse

• 3.3 Exemple d'un test de coagulation (Cf. Commission SFSTP Robustesse)

Analyse des effets :
Diagramme de
Pareto



3. Robustesse

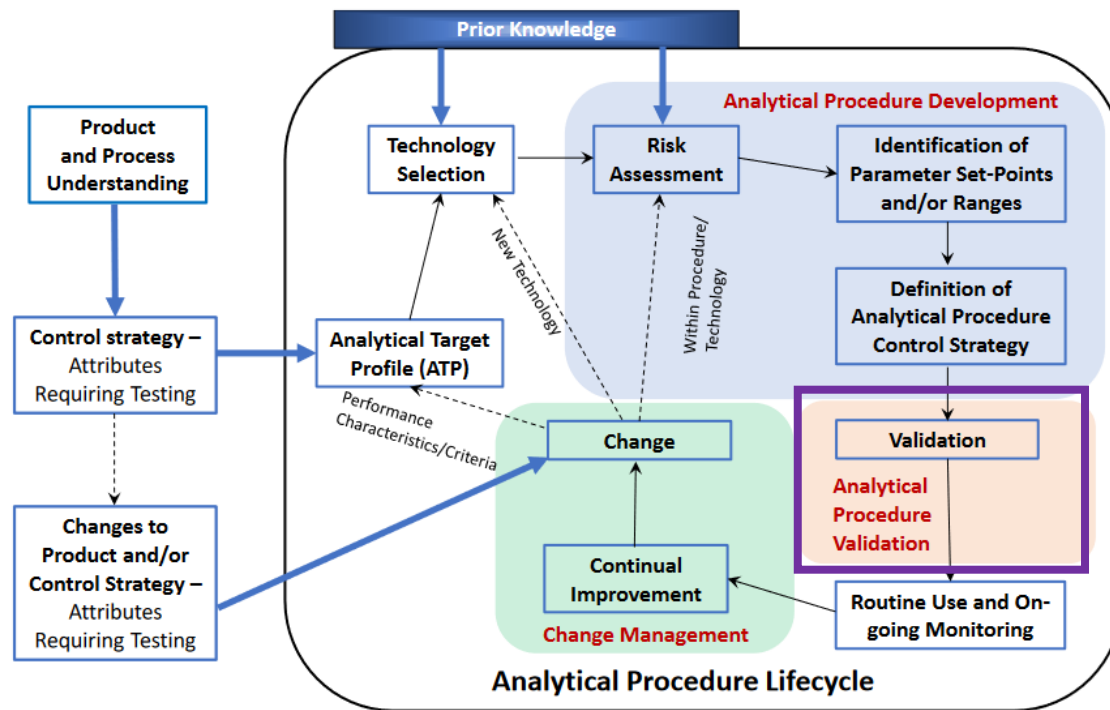
- **3.3 Exemple d'un test de coagulation (Cf. Commission SFSTP Robustesse)**
 - Conclusion :
 - Influence de la température d'incubation
 - Influence du temps d'attente du réactif reconstitué
 - Influence du temps d'incubation
 - Détailler dans le mode opératoire l'ordre de préparation des réactifs et échantillon
 - Etudes supplémentaires afin de définir le temps d'incubation limite

Validation

4. Validation

Schéma extrait de
ICH Q14

Figure 1: The Analytical Procedure Lifecycle



4. Validation

4.1 Principes généraux de schéma de validations

- Avec substance de référence:
 - Le but principal est de calculer l'erreur totale, dans laquelle la valeur du biais, sa dispersion et la dispersion des mesures sont prises en compte, puis d'estimer l'incertitude de mesure.
- Sans substance de référence:
 - Même si le biais de la méthode ne pourra pas être caractérisé en tant que valeur, l'incertitude de mesure peut toujours être estimée à partir de la dispersion du biais et de la dispersion des mesures.

4. Validation

4.1 Principes généraux de schéma de validations

- ICH M10:
 - Chromatographie :
 - étalonnage (minimum 6 niveaux avec LLOQ et ULOQ, 3 séries indépendantes)
 - exactitude et fidélité (minimum 4 niveaux, 3 séries, 5 réplicats par série et par niveau)
 - Ligand binding :
 - étalonnage (minimum 6 niveaux avec LLOQ et ULOQ, 6 séries)
 - exactitude et fidélité (minimum 5 niveaux, 6 séries, 3 réplicats par série et par niveau: LLOQ dans un intervalle de 3 fois le LLOQ, le centre du range, 75% ULOQ, ULOQ)



4. Validation

4.1 Principes généraux de schéma de validations

- Proposition pour les autres référentiels
 - 5 concentrations, 3 réplicats, 5 séries indépendantes minimum
 - Cette proposition est minimale afin d'obtenir suffisamment de données pour une exploitation statistique valide.
 - Réplicat (USP): "Multiple dilutions (concentrations) of the Standard and one or more Test samples constitute a replicate set".

4. Validation

4.1 Principes généraux de schéma de validations : Problématique des étalons

- Si Substance de référence interne se mettre en conditions de producteur de matériau de référence (caractérisation, stabilité...) ISO 17034 (2016) et ISO 33405 (2024)
 - Voir exemple des cartes de contrôle BIPEA (§7)
- Si Substance de référence externe, le certificat du fournisseur est suffisant (vérification de la stabilité dans le temps après ouverture et/ou reconstitution)
 - Eléments du certificat : titre/incertitude/péremption (DLU)

4. Validation

- **4.1 Principes généraux de schéma de validations : Gestion des effets matrices & Gestion du système d'essai**
 - En validation de process prendre en compte l'impact des impuretés à activité biologique dans les différentes matrices ou familles de matrices du process.
 - Si plusieurs matrices ou familles de matrices peuvent être impliquées au cours du process ou lors du cycle de vie du produit, leur impact sera évalué en développement pour les intégrer dans une méthode plateforme (si possible)

4. Validation

4.1 Principes généraux de schéma de validations : Stabilité des éléments d'essai

- Pour la chromatographie et ligand binding assay : voir tableau ICH M10
→ Différentes conditions de conservation.
- Pour les essais biologiques, vérifier la stabilité de l'échantillon dans des conditions de conservation et transport déterminées (comparaison des activités ou des teneurs des éléments dosés en fonction du temps).
 - Vérifier la stabilité du système d'essai (*exemple: lignée cellulaire, temps de passage des cellules...*)
 - Valider l'impact des cycles de congélation/décongélation
 - Vérification de la stabilité des analytes lors du processus d'essai.

4. Validation

4.1 Principes généraux de schéma de validations : Problématique des durées de lancement et de réalisation des essais

- Dans le cas d'essais de longue durée, il est difficile d'avoir des résultats de répétabilité: la répétabilité est alors évaluée en intra-essai sur la même préparation.
- La répétabilité « méthode » devient une composante de la variation inter-séries et ne peut plus être distinguée des effets Jour / Analyste / Equipement / Système d'essai...

4. Validation

4.1 Principes généraux de schéma de validations : Validation sans Substance de référence

- On ne peut pas accéder à la notion de biais / justesse par manque de référence mais l'acceptabilité de la méthode peut être démontrée par:
 - Une série de dilutions permettant:
 - l'obtention de valeurs de dispersion à chaque niveau de dilution.
 - une linéarité de la réponse ou une comparabilité des courbes dose/réponse obtenues dans les niveaux de dilutions.

4. Validation

4.1 Principes généraux de schéma de validations : Validation sans Substance de référence

- On ne peut pas accéder à la notion de biais / justesse par manque de référence mais l'acceptabilité de la méthode peut être démontrée par:
 - Une étude conséquente de fidélité intermédiaire permettant d'accéder à l'estimation de l'incertitude (intervalle prévisionnel de tolérance bêta à 95 ou 99% de probabilité), de préférence à plusieurs niveaux de dilution (cf. ISO 5725 et ISO 21748).
 - Les autres critères de validation restant les mêmes.

4. Validation

4.1 Principes généraux de schéma de validations : Validation avec Substance de référence

- On peut accéder directement à l'**erreur totale (Fidélité et Exactitude (Biais))** : validation classique.
- Cas particulier, l'utilisation du premier lot produit en tant que valeur de référence → Problème de stabilité du lot de référence dans le temps, le suivi de la stabilité du lot est fondamental.

4. Validation

4.1 Principes généraux de schéma de validation : Cas des Cross-validation (validation conjointe)

- Avec n laboratoires, les cross-validations apportent des données de reproductibilité obtenues entre les laboratoires, comme élément supplémentaire à la répétabilité et la fidélité intermédiaire de chaque laboratoire.
 - Cross-validation rarement utilisée, mais maintenant prévue par ICH Q2(R2).

4. Validation

4.1 Principes généraux de schéma de validations : Cas des transferts de méthodes

- Comparabilité des résultats entre laboratoire émetteur et laboratoire receveur via un protocole et un rapport de transfert.
 - Définir les paramètres à comparer avec leurs critères (les critères du laboratoire émetteur sont parfois restrictifs et plus difficilement obtenus par le laboratoire receveur). cf SFSTP 2002/2009 pour la méthodologie d'évaluation.
 - Pour certains cas (notamment lorsque des adaptations liées aux équipements sont à envisager), une revalidation par le laboratoire receveur est nécessaire.
 - Voir chapitre 6 des BPF et la ligne directrice 15 des BPF

4. Validation

4.1 Principes généraux

Quelques exemples de guides pour les méthodes chromatographiques :

4. Validation

Paramètres	Texte	Descriptif
Spécificité	FDA, 2018	• Etude des interférences possibles • Au sens de la FDA, la spécificité concerne plus les interférences possibles de composés endogènes, métabolites, analytes similaires... ➢ Critères d'acceptation : voir sélectivité
	ICH M10	• Etude des interférences possibles • Au sens de l'ICH, la spécificité concerne plus les interférences possibles de composés endogènes, métabolites, analytes similaires... ➢ Critères d'acceptation : voir sélectivité
	ICH Q2 R2	• Spécificité possible par au moins 2 méthodes : Identification, Pureté, Justesse (teneur)
Sélectivité	FDA, 2018	• Evaluée sur minimum 6 lots de matrice • Au sens de la FDA la sélectivité représente plus la non-interférence de la matrice seule ➢ Interférences $\leq 20\% \text{LOQ}$ (analyte), $\text{IS} \leq 5\%$
	ICH M10	• Evaluée sur minimum 6 lots de matrice • Au sens de l'ICH la sélectivité représente plus la non-interférence de la matrice seule ☐ Interférences $\leq 20\% \text{LOQ}$ (analyte), $\text{IS} \leq 5\%$
	ICH Q2 R2	/
Fonction d'étalonnage	FDA, 2018	• Une gamme est composée de : - Un blanc (matrice seule) - Un zéro (matrice + IS) - Au minimum 6 points d'étalonnage, incluant la LLOQ ☐ Biais des concentrations prédites compris entre ± 15 et $\pm 20\%$ à la LLOQ ☐ 75 % des niveaux et au moins 6 d'entre eux doivent répondre au critère ci-dessus ☐ Les deux requis doivent être respectés à chaque série de validation

4. Validation

Paramètres	Texte	Descriptif
	ICH M10	Une gamme est composée de : - Un blanc (matrice seule) - Un zéro (matrice + IS) - Au minimum 6 points de calibration incluant la LLOQ et la ULOQ ➤ <i>Biais des concentrations prédites compris entre ± 15 et $\pm 20\%$ à la LLOQ</i> ➤ 75 % des niveaux et au moins 6 d'entre eux doivent répondre au critère ci-dessus ➤ Les deux requis doivent être respectés à chaque série de validation (au minimum 3 séries) En cas de répétitions, au moins 50 % des biais des concentrations prédites doivent être compris entre ± 15, à chaque niveau, et $\pm 20\%$ à la LLOQ
	ICH Q2 R2	• Linéarité : Au moins 5 concentrations (dilution ou placebo) Régression avec ou sans transformation ou/et pondération Coefficient de corrélation Point d'interception Pente Courbe de régression, graphe des résidus • Range (gamme de quantification, écart d'utilisation) Établit d'après la linéarité avec ses composantes de justesse, de fidélité et de linéarité ➤ Pour une teneur : 80-120% concentration ➤ Pour uniformité de teneur : 70-130% ➤ Pour impureté : 120% de la limite établie • Limite de détection (impuretés) • Limite de quantification (impuretés)
Linéarité	FDA, 2018	Voir Fonction d'étalonnage
	ICH M10	Voir Fonction d'étalonnage
	ICH Q2 R2	Voir Fonction d'étalonnage

4. Validation

Paramètres	Texte	Descriptif
Exactitude Fidélité	FDA, 2018	• Evalué sur 4 niveaux de concentration minimum (<u>LOQ</u>, bas CQ, moyen CQ et haut CQ) en 5 réplicats minimum • 3 séries minimum, en conditions de fidélité intermédiaire - Exactitude : biais $\pm 15\%$ ($\pm 20\%$ LLOQ) de la concentration nominale Fidélité : within-run and between-runs, CV $\pm 15\%$ ($\pm 20\%$ LLOQ)
	ICH M10	• Evalué sur 4 niveaux de concentration minimum (<u>LOQ</u>, bas CQ, moyen CQ et haut CQ) en 5 réplicats minimum • 3 séries minimum sur minimum 2 jours différents, en conditions de fidélité intermédiaire ➢ Exactitude : biais $\pm 15\%$ ($\pm 20\%$ LLOQ) de la concentration nominale ➢ Fidélité : within-run and between-runs, CV $\pm 15\%$ ($\pm 20\%$ LLOQ) <i>Il est recommandé d'utiliser un plan de validation d'exactitude et fidélité qui soit le reflet des séries qui seront effectuées en routine</i>
	ICH Q2 R2	Approche combinée (évaluation de l'erreur totale analytique) est proposée à l'aide d'intervalle de prédiction ou de tolérance Exactitude : Justesse exprimée en % de récupération. Au moins 9 résultats (3 concentrations avec 3 préparations). Par rapport à la référence (teneur, activité). Dans certains cas (absence d'étalon ...), peut être déduit de la fidélité, la fonction de réponse et la spécificité. Comparaison de l'intervalle de confiance de la moyenne avec des spécifications pour évaluer le biais. Fidélité : Exprimée en écart type, CV et intervalle de confiance. • Répétabilité : Au moins 3 concentrations avec 3 préparations ou au moins 6 mesures d'une concentration à 100% de la teneur voulue. • Fidélité intermédiaire :

4. Validation

Paramètres	Texte	Descriptif
		Doit être obtenue au travers d'une étude pertinente des conditions dans lesquelles la procédure sera utilisée (Jour/Analyste/Système/Conditions environnementales...) L'utilisation de plan d'expériences est encouragée L'étude doit être menée à chaque niveau du domaine de travail ou à la valeur cible
Contamination inter-échantillons	FDA, 2018	<i>Contamination inter-échantillons $\leq 20\%$ de la LLOQ pour l'analyte</i>
	ICH M10	Contamination inter-échantillons $\leq 20\%$ de la LLOQ pour l'analyte, IS $\leq 5\%$
	ICH Q2 R2	/
Effet matrice	FDA, 2018	/
	ICH M10	- Évalué sur minimum 6 lots de matrice 2 niveaux de concentration (bas CQ et haut CQ) 3 réplicats par niveau et par lot ☐ Biais entre $\pm 15\%$ sur les 6 lots individuels de matrice ☐ CV $\leq 15\%$ sur les 6 lots individuels de matrice
	ICH Q2 R2	/
Rendement d'extraction	FDA, 2018	Évalué sur 3 niveaux de concentration (bas CQ, moyen CQ, haut CQ) d'un échantillon dopé par rapport à un étalon
	ICH M10	Évalué sur 3 niveaux de concentration (bas CQ, moyen CQ, haut CQ) d'un échantillon dopé par rapport à un étalon
	ICH Q2 R2	/
Dilution	FDA, 2018	5 réplicats par facteur de dilution ☐ Biais compris entre $\pm 15\%$; Fidélité comprise entre $\pm 15\%$
	ICH M10	5 réplicats par facteur de dilution ☐ Biais compris entre $\pm 15\%$; Fidélité comprise entre $\pm 15\%$
	ICH Q2 R2	/

Pause

Pause Déjeuner

Reprise à 14h15

4. Validation

4.2 Exploitation statistique des données de validations

Les intervalles prévisionnels de tolérance

- Un intervalle de prévisionnel de tolérance est un intervalle statistique pour lequel la probabilité que **le(s) prochain(s) résultat(s)** y tombe(nt) est $\geq P$.
 - SFSTP (2003-2006), norme NF V03-110, ISO TS-22176 et USP<1210> (PF40(5)) décrivent tous trois le calcul de l'intervalle prévisionnel de tolérance β ($P = \beta$).
 - ISO 16269-8 et USP <1210> se réfèrent tous deux à la même définition d'un intervalle de prédiction qui, avec une confiance statistique donnée, doit ne doit pas contenir moins d'un nombre souhaité des futurs résultats.

4. Validation

4.2 Exploitation statistique des données de validations

L'intervalle prévisionnel de tolérance bêta

$$\bar{x}_k \pm t_{\left(v_{eff}, \frac{(1+\beta)}{2}\right)} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{p \cdot n \cdot B_k^2} \cdot SIP_k} \quad \text{avec} \quad B_k = \sqrt{\frac{R_k + 1}{n \cdot R_k + 1}}$$

Diagram illustrating the components of the prediction interval formula:

- $t_{\left(v_{eff}, \frac{(1+\beta)}{2}\right)}$ is the t-value of Student bilateral for $\alpha = 1 - \beta$ and v_{eff} degrees of freedom.
- B_k is the penalty (capacity of reproduction of the result).
- R_k is calculated as $R_k = \frac{S_{gk}^2}{S_{rk}^2}$.
- v_{eff} is calculated as $v_{eff} = \frac{(R_k + 1)^2}{\frac{\left(R_k + \frac{1}{n}\right)^2}{p - 1} + \frac{1 - \frac{1}{n}}{p \cdot n}}$.

Cette méthodologie nécessite un plan de validation équilibré

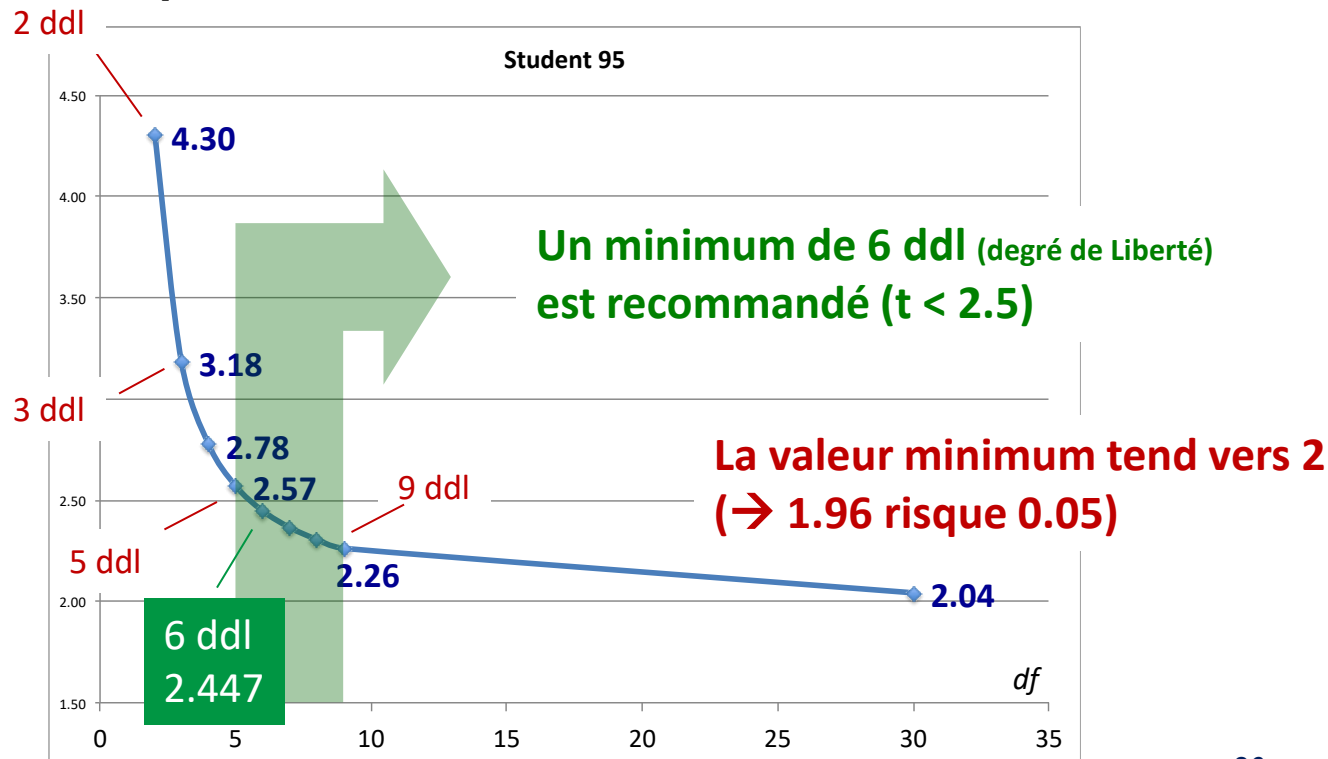
L'impact des effets inter-séries est pris en compte,

Le plan de validation doit lui aussi être bâti par rapport à cet effet

4. Validation

4.2 Exploitation statistique des données de validations

Ce qu'il faut retenir ici
de la Loi de Student



4. Validation

4.2 Exploitation statistique des données de validations

- Evolution du nombre de ddl en fonction de la structure de variance

$CV_r=4.0\%$, $CV_{ip}=7.4\%$, $R=2.39$		
p (series)	n (repetitions)	DDL
3	3	2.8
3	5	3.1
3	10	3.3
5	2	5.1
7	2	7.7
15	2	17.9

4. Validation

4.2 Exploitation statistique des données de validations

- Evolution du nombre de ddl en fonction de la structure de variance

$CV_r=6.0\%$, $CV_{IP}=6.0\%$, $R=0.00$		
p (series)	n (repetitions)	DDL
3	3	7.7
3	5	13.6
3	10	28.6
5	2	8.9
7	2	12.9
15	2	29.0

4. Validation

4.2 Exploitation statistique des données de validations

- L'intervalle prévisionnel de tolérance β :
 - L'impact des effets inter-séries est pris en compte,
 - Le plan de validation doit lui aussi être bâti par rapport à cet effet

Proposition	Nbe Séries – Nbe Réplicats, par niveau de concentration	Intervalle des valeurs du nombre effectif de degrés de liberté
Type ICH Q2	3 – 3	2 – 8
Bioanalyse (FDA/ICH)	3 – 5 (Chrom) 6 – 3 (Ligand binding)	2 – 14 5 – 17
NF V03-110 / ISO TS 22176	5 – 2	4 – 9
NF T90-210	6 – 2	4 – 9
Gaudin <i>et al.</i>	6 – 3	5 – 17
Hartmann <i>et al.</i>	8 – 2	7 – 15
Ajustement progressif	1 – 3 3 réplicats par série pendant un nombre suffisant de séries	(p-1) – (3p-1)

4. Validation

4.2 Exploitation statistique des données de validations

- Et l'incertitude dans tout ça ?
 - L'incertitude de mesure utilise la somme de la variance de fidélité et de celle du biais :
 - Conformément à la proposition ISO 21748 de 2017
 - Conformément à la proposition SFSTP de 2017
 - Conformément à la proposition du stimuli USP de 2018 (USP PF 44(1)):

$$u_c = \sqrt{u_R^2 + u_{IP}^2}$$

STIMULI TO THE REVISION PROCESS

Stimuli articles do not necessarily reflect the policies of the USPC or the USP Council of Experts

Measurement Uncertainty for the Pharmaceutical Industry

ML Jane Weitzel, [a](#) Juris Meija, PhD, [b](#) David LeBlond, PhD, [c](#) Steven Walfish [d](#)

Avec u_R^2 , la variance des biais (recouvrements) et u_{IP}^2 , la variance de fidélité intermédiaire

4. Validation

4.2 Exploitation statistique des données de validations

- Et l'incertitude dans tout ça ?
 - Une étude de fidélité intermédiaire, menée sur un échantillon unique et homogène :
 - permet d'obtenir l'estimation de l'incertitude de mesure à cette teneur :

$$u_c(z) = \sqrt{s_{IP}^2 + u^2(b)} = \sqrt{s_{IP}^2 + \frac{s_{IP}^2 - \left(1 - \frac{1}{n}\right) \cdot s_r^2}{p}}$$

4. Validation

4.2 Exploitation statistique des données de validations

- Et l'incertitude dans tout ça ?
 - L'intervalle prévisionnel de tolérance β :
 - Permet d'estimer directement l'incertitude de mesure à chaque niveau de l'étude d'exactitude sur l'intervalle de mesure :

- Incertitude-type

$$u_c(z_k) = s_{TI_k} = \sqrt{1 + \frac{1}{p \cdot n \cdot B_k^2}} \cdot s_{IP_k}$$

- Facteur d'élargissement

$$k_p = t_{(v_{eff}; p)}$$

- ou $k_{0.95} = 2$ ou $k_{0.99} = 3$

- Incertitude élargie

$$U = k_p \cdot u_c(z_k)$$

- Un profil d'incertitude sur l'intervalle de mesure peut alors être tracé et l'incertitude modélisée



Valeurs aberrantes

5. Valeurs aberrantes

- **Traitement des éventuelles valeurs aberrantes : Traité dans l'USP <1032>**

- Certaines remarques sur les valeurs aberrantes sont fournies dans l'USP <1032> dans le contexte des essais biologiques pour souligner ou compléter les informations contenues dans le chapitre <1010> (Analytical data – Interpretation and treatment).
- On peut s'attendre à ce que l'essai biologique soit le plus sujet aux données aberrantes par rapport aux essais chimiques et physiques.
- Les tests statistiques de normalité peuvent ne pas être utiles.
- Les écarts importants par rapport à la normalité peuvent souvent être atténués par une transformation appropriée (exemple: changement à échelle logarithmique).

5. Valeurs aberrantes

- **Traitement des éventuelles valeurs aberrantes :**

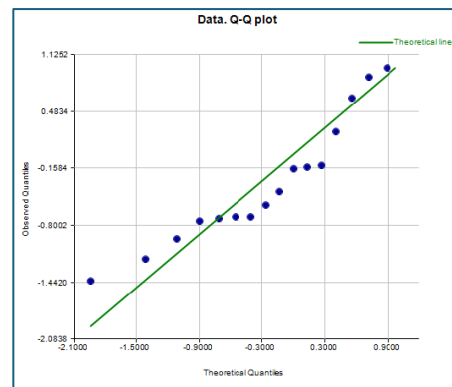
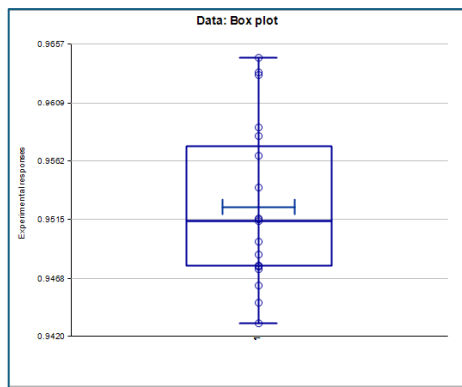
- La gestion des valeurs aberrantes est appropriée, avec les données de l'essai biologique, à au moins deux niveaux :
 - Donnée individuelle ou groupe de données (par exemple, pour l'échantillon et la concentration).
 - Les estimations de l'activité relative d'un essai qui peuvent être vérifiées par rapport à d'autres estimations indépendantes de l'activité de la même substance (par exemple valeurs habituelles collectées dans les suivis de tendance).

5. Valeurs aberrantes

- **Traitement des éventuelles valeurs aberrantes :**

- Plusieurs approches:
 - L'inspection visuelle

Schéma de répartition des valeurs (Box-Whisker, diagramme de normalité ou quantile-quantile). Une valeur aberrante peut avoir une cause distincte et identifiable, telle qu'une erreur dans le système de mesure.



5. Valeurs aberrantes

- **Traitement des éventuelles valeurs aberrantes :**
 - Une valeur inhabituelle par rapport à la variabilité habituellement observée peut apparaître sans cause identifiable.
 - **Dans ce cas, si la valeur inhabituelle provient de la même population, alors la donnée doit être considérée comme une valeur obtenue par hasard qui doit être maintenue.**

5. Valeurs aberrantes

- **Traitement des éventuelles valeurs aberrantes :**

- Si la valeur aberrante est due à une erreur humaine ou à un dysfonctionnement de l'instrument, alors la valeur doit être écartée des calculs.
- Le chapitre général USP <1010> Analytical Data – Interpretation and Treatment aborde :
 - La détection (visuelle ou Box-Whisker...),
 - L'identification (test de recherche de valeurs aberrantes),
 - Et le rejet des valeurs aberrantes.

5. Valeurs aberrantes

- **Traitement des éventuelles valeurs aberrantes :**
 - Approche statistique:
 - Trois aspects importants de la gestion des résultats aberrants sont la prévention, la détection et l'identification.
 - La **prévention** vient par des procédures analytiques dont les risques d'erreurs sont identifiés durant leur développement et maîtrisés. L'erreur devient alors une aberrance.
 - La **détection** consiste en l'examen des données.
 - Si une cause peut être assignée, la donnée peut être écartée,
 - **L'absence de preuves évidentes concernant la cause d'une observation aberrante ne signifie pas nécessairement que l'utilisation des tests statistiques d'aberrance soit le plus adapté.**

5. Valeurs aberrantes

- **Traitement des éventuelles valeurs aberrantes :**

- Approche statistique:

- Trois aspects importants de la gestion des résultats aberrants sont la prévention, la détection et l'identification.

- **L'identification** des valeurs aberrantes consiste à utiliser des règles pour confirmer que les valeurs sont incompatibles avec le modèle statistique connu ou supposé.

- En présence de valeurs aberrantes sans justification apparente, il peut être tentant d'utiliser des tests d'aberrance.

L'élimination de données uniquement en raison de considérations statistiques devrait être un évènement rare.

Dans un cadre réglementaire, le traitement des valeurs aberrantes doit être procédé.

Exemples

6. Exemples

6.1 Analyse cellulaire: cytométrie (FACS)

6.2 Analyse cellulaire: imagerie

6.3 Analyse quantitative par ELISA

6.4 Analyse microbiologique d'antibiotique

6.5 Analyses quantitatives par PCR

6.5.1 ADN génomique résiduel par qPCR

6.5.2 Vecteurs viraux par dPCR

6.5.3 ARN viral par qPCR Taqman

6.5 Analyse quantitative par HPLC/MS



6. Exemples

6.1 Essais cellulaires : cytométrie (différenciation cellulaire)

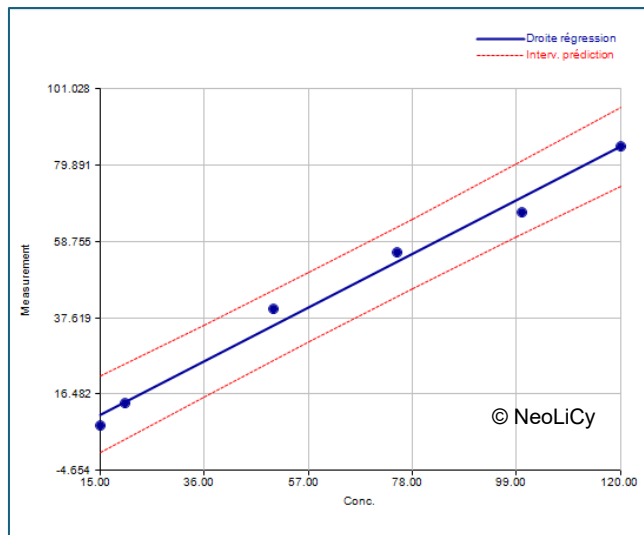
- Unités formant colonies après traitement génétique.
- Contexte: identification et comptage de 2 populations cellulaires de morphologie cellulaire différente



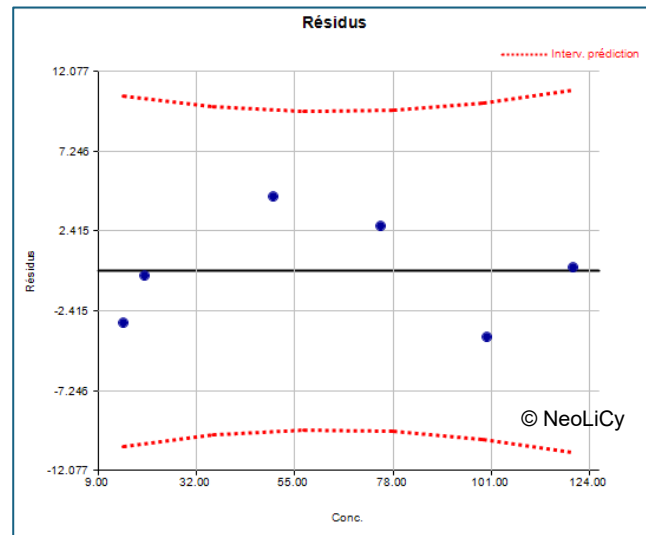
6. Exemples

6.1 Essais cellulaires : cytométrie (différenciation cellulaire)

- Unités formant colonies après traitement génétique.
- Linéarité de la dilution d'un standard : 5 niveaux, 1 répétition



Courbe de calibrage

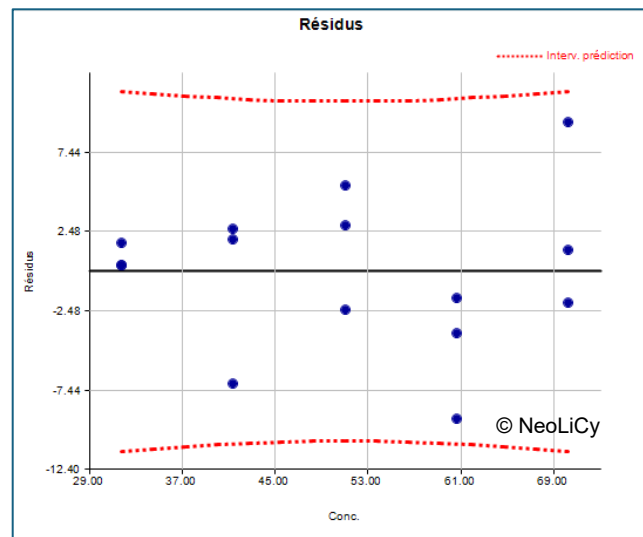
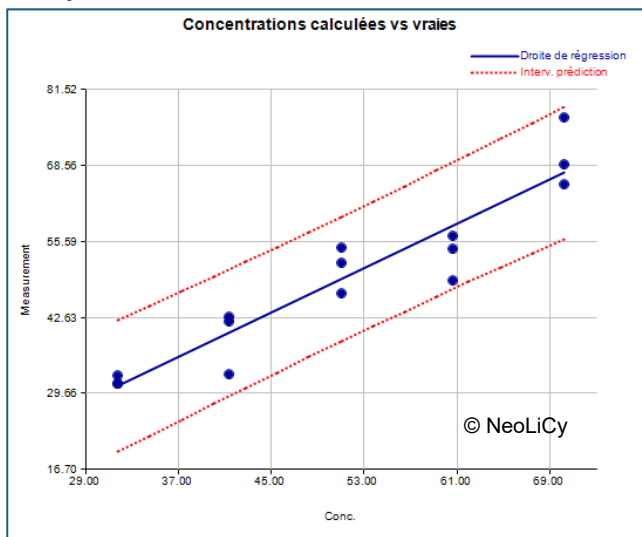


Tracé des résidus

6. Exemples

6.1 Essais cellulaires : cytométrie (différenciation cellulaire)

- Unités formant colonies après traitement génétique.
 - Justesse exprimée en cell count mesurées vs cell count attendues : 5 niveaux, 3 répétitions

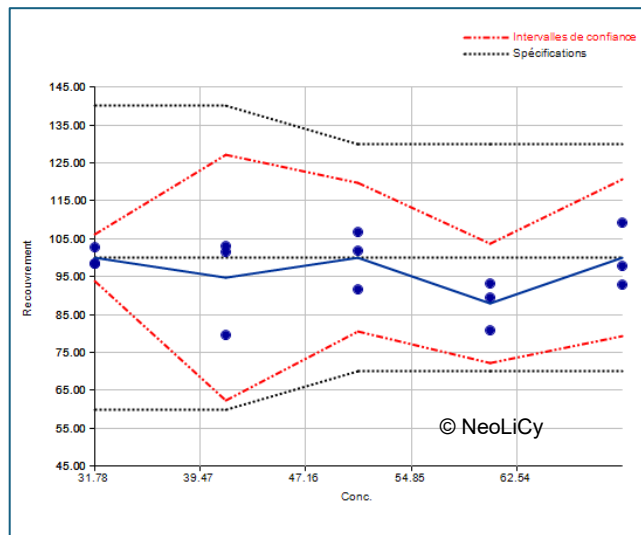


Graphique des CFU mesurées en fonction des CFU attendues et graphique des résidus

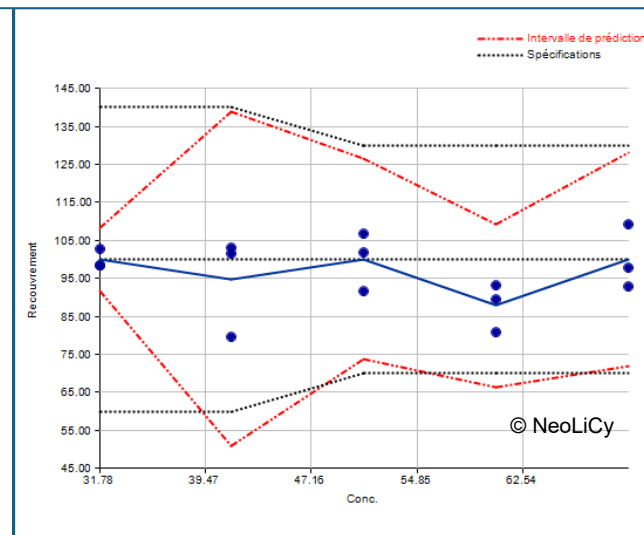
6. Exemples

6.1 Essais cellulaires : cytométrie (différenciation cellulaire)

- Unités formant colonies après traitement génétique.
 - Justesse exprimée en CFU mesurées vs CFU attendues : 5 niveaux, 3 répétitions



Intervalles de confiance



Intervalles de prédiction (USP <1210>)

6. Exemples

6.1 Essais cellulaires : cytométrie (différenciation cellulaire)

- Unités formant colonies après traitement génétique.
 - Justesse exprimée en CFU mesurées vs CFU attendues : 5 niveaux, 3 répétitions
 - Avec 3 points de données par niveau, la construction de l'intervalle de prédiction n'est pas pertinente (nombre de degrés de liberté trop faible)
 - Mais 3 points de données seulement à cause de la durée d'obtention de la mesure (plusieurs semaines) et du nombre de donneurs disponibles

6. Exemples

6.1 Cytométrie (différenciation cellulaire)

Fidélité :

4 niveaux

2 séries/niveau

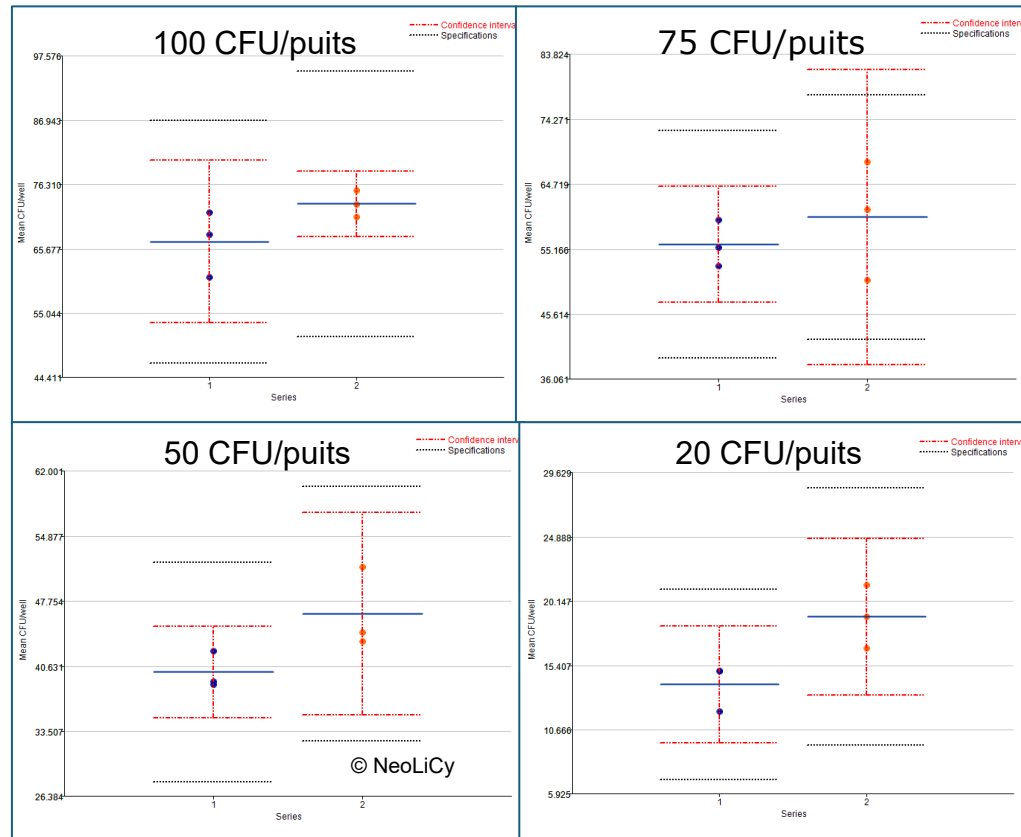
3 répétitions

Niveau (CFU/puit)	CV% Répét.	CV% Fid. Inter.
100	5,90	7,92
75	11,45	11,45
50	8,01	12,34
20	12,45	23,72

Spécifications

CV répétabilité: 30%

CV fidélité intermédiaire: 30%



6. Exemples

6.1 Essais cellulaires : cytométrie (différenciation cellulaire)

- Unités formant colonies après traitement génétique.
 - Fidélité exprimée en CFU/puit : 4 niveaux, 2 séries/niveau, 3 répétitions
 - 2 séries uniquement du fait de la sortie du 3^{ème} donneur
 - Résultats malgré tout dans le cadre acceptable de 30% (répétabilité et fidélité intermédiaire),

6. Exemples

6.1 Essais cellulaires : cytométrie (différenciation cellulaire)

- Unités formant colonies après traitement génétique.
 - Conclusion:
 - Malgré un plan de validation restreint en raison des contraintes expérimentales (nombre de donneurs, durée de l'essai), les performances démontrées peuvent être considérées comme acceptable.
 - Cet exemple montre la difficulté d'une interprétation statistique basée sur trop peu de données.

6. Exemples

6.2 Essais cellulaires : Viabilité (temps de doublement)

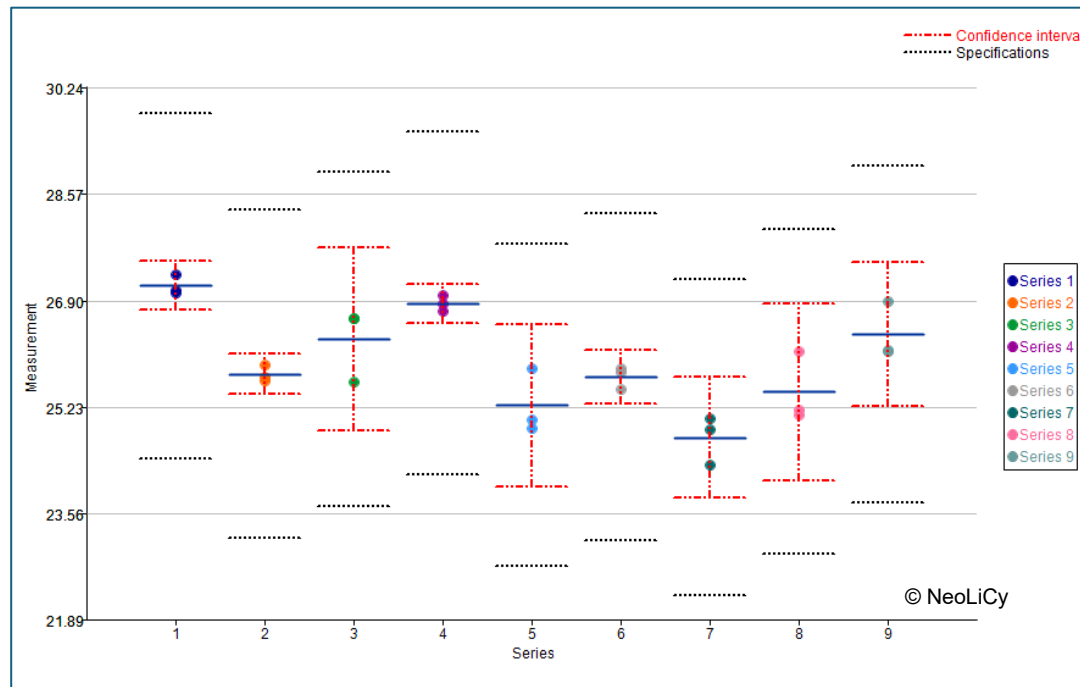
- Mesure du temps de doublement avec comptage d'un nombre de cellules par imagerie après marquage
- **Contexte: nouveau lot de réactif utilisé pour la culture de cellules**
 - Estimation de la fidélité intermédiaire, sur un échantillon unique :
 - 5 « jours »
 - 2 opérateurs
 - 5 conditions de culture cellulaire
 - 9 séries indépendantes de 3 déterminations

6. Exemples

6.2 Essais cellulaires : Viabilité (temps de doublement)

Spécifications :
Répétabilité : 10%
Fidélité intermédiaire : 15%

Résultats :
Répétabilité : 1,49%
Fidélité intermédiaire : 3,21%
Aucune série ne présente un IC au-delà de 10%



6. Exemples

6.2 Essais cellulaires : Viabilité (temps de doublement)

- Conclusion:
 - Malgré des effets inter-séries non négligeables ($CV\%_r=1.49$, $CV\%_{FI}=3.21$), le fait d'avoir 9 séries garantit un nombre de DDL raisonnable et une bonne estimation des variances et permet une bonne estimation de l'incertitude de mesure
 - $U(x) = 7.42\%$ ($k=2.208$), tout à fait acceptable pour un bio-essai.

6. Exemples

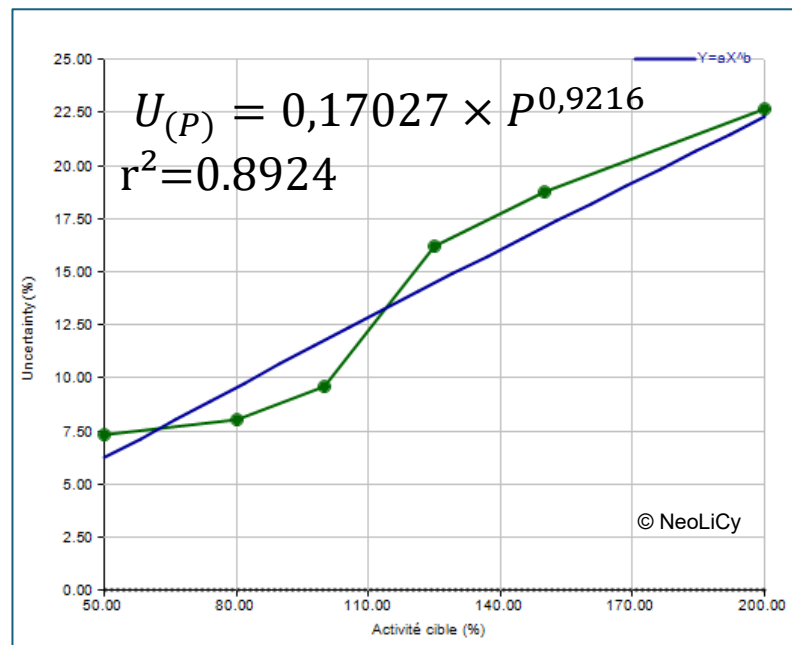
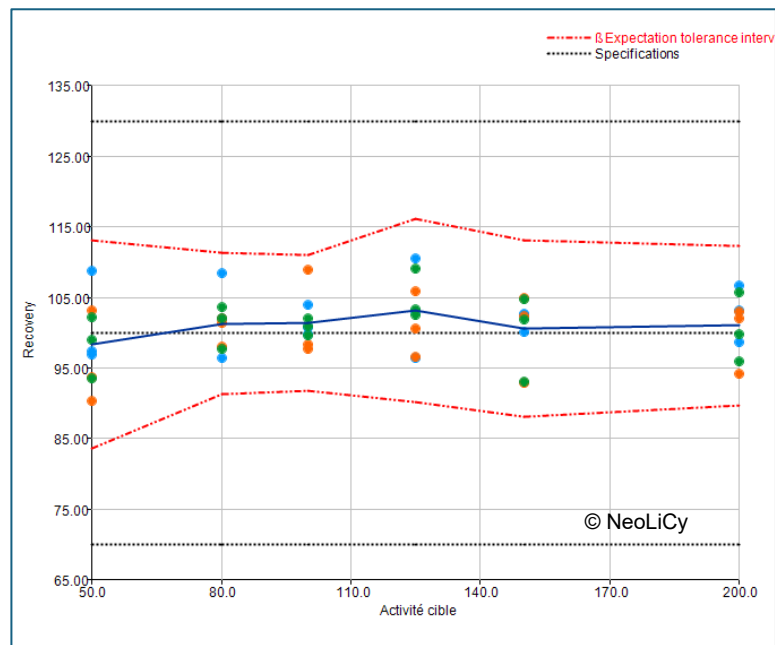
6.3 Immuno-essais (ELISA)

- Mesure de concentration d'un lot d'anticorps monoclonal (Content assay)
 - Données brutes: résultats obtenus après calibration 4 paramètres
 - 6 niveaux de concentrations testés (50, 80, 100, 125, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$)
 - 3 séries par niveau
 - 3 répétitions par séries

6. Exemples

6.3 Immuno-essais (ELISA)

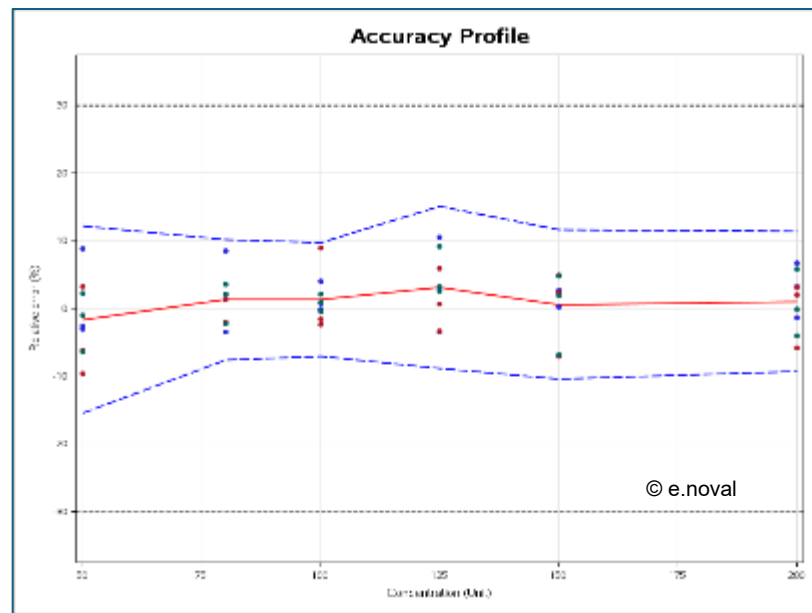
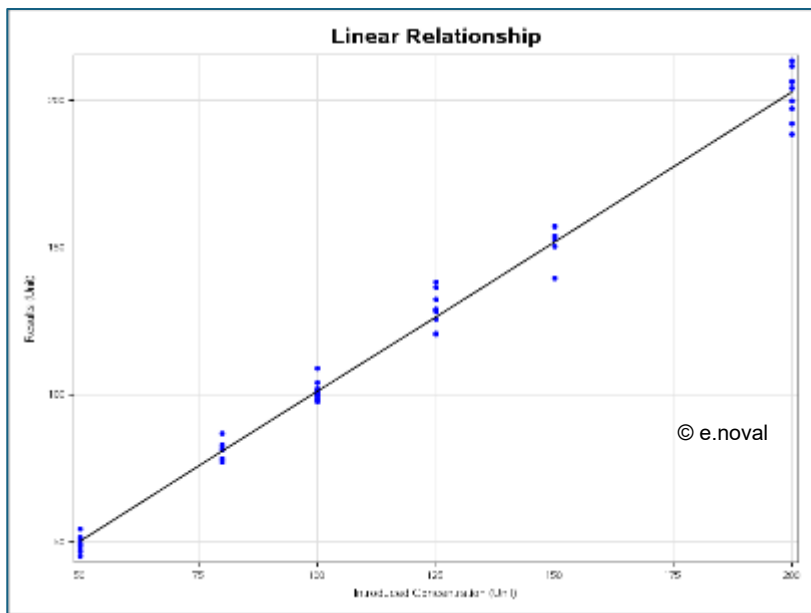
- Mesure de concentration d'un anticorps monoclonal
 - Profils d'exactitude et d'incertitude



6. Exemples

6.3 Immuno-essais (ELISA)

- Mesure de concentration d'un anticorps monoclonal
 - Linéarité méthode et profil d'exactitude



6. Exemples

6.3 Immuno-essais (ELISA)

- Mesure de concentration d'un anticorps monoclonal
 - Conclusion:
 - Bien que seulement 3 séries aient été réalisées: la fidélité intermédiaire est égale à la répétabilité à tous les niveaux:
 - l'absence d'effets inter séries observés ne pénalise pas l'exploitation statistique de la méthode et permet une bonne connaissance de ses performances
 - La méthode est applicable en l'état

6. Exemples

6.4 Méthodes biologiques : Titrage microbiologique d'antibiotique

- Dosage microbiologique d'un antibiotique versus une substance de référence selon USP <81>
- Test compendial/ test de référence
 - Etalonnage par mesure du diamètre d'inhibition à partir de 5 solutions étalon d'antibiotique (exprimées en µg/capsule)
 - Validation par l'étude des concentrations prédites inverses (concentrations recalculées sur la droite – vs – concentrations vraies des étalons)
 - Fidélité sur 3 séries de mesures au centre du range
 - Exactitude sur 3 niveaux de concentration, 3 mesures/niveau

6. Exemples

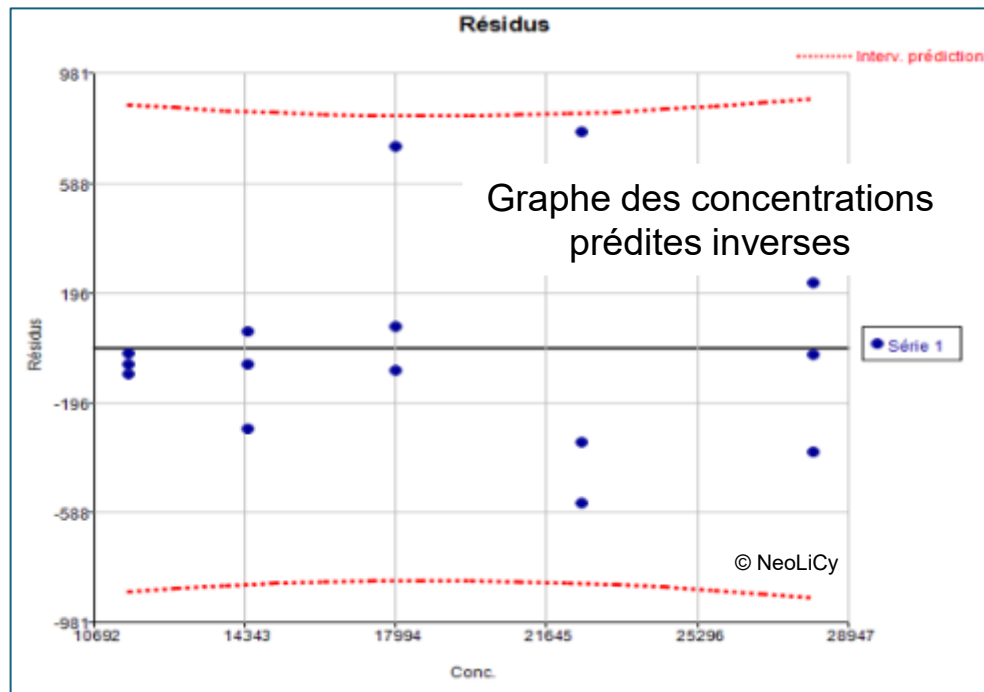
6.4 Méthodes biologiques : Titrage microbiologique d'antibiotique

Linéarité

Etalonnage:

5 niveaux, 3 répétitions

Intervalle de prédiction à
97.50 % pour les résidus



6. Exemples

6.4 Méthodes biologiques : Titrage microbiologique d'antibiotique

Fidélité, à une concentration cible (100% de la spécification) :
3 séries, 6 répétitions

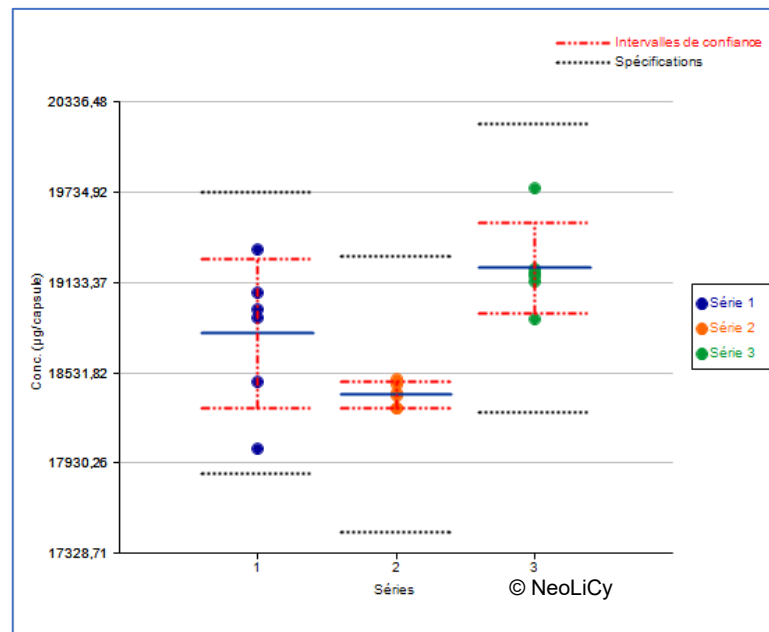
Intervalles de confiance (max. : 5% de la moyenne)

CV%, répétabilité : 1.72%

CV%, fidélité intermédiaire : 2.75%

Incertitude de mesure :

$U(\%) = 8.26\%$ ($k=2.720$)



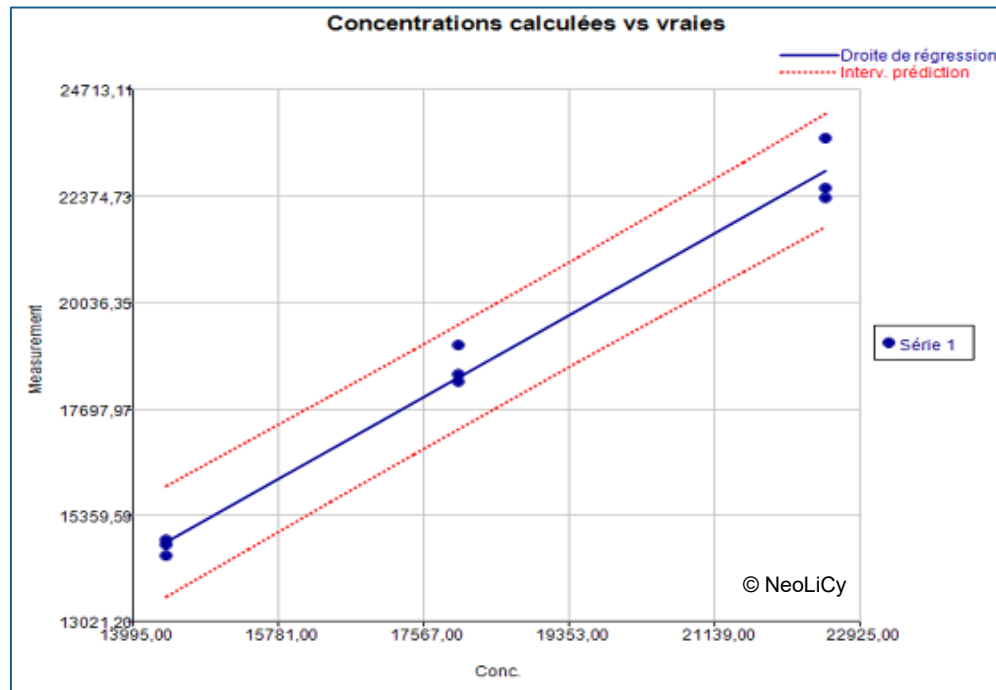
6. Exemples

6.4 Méthodes biologiques : Titrage microbiologique d'antibiotique

Exactitude (ICH):
3 niveaux, 3 répétitions

Graphe des concentrations
calculées en fonction des
concentrations vraies

Seuil de confiance
pour la droite de calibrage : 97,50



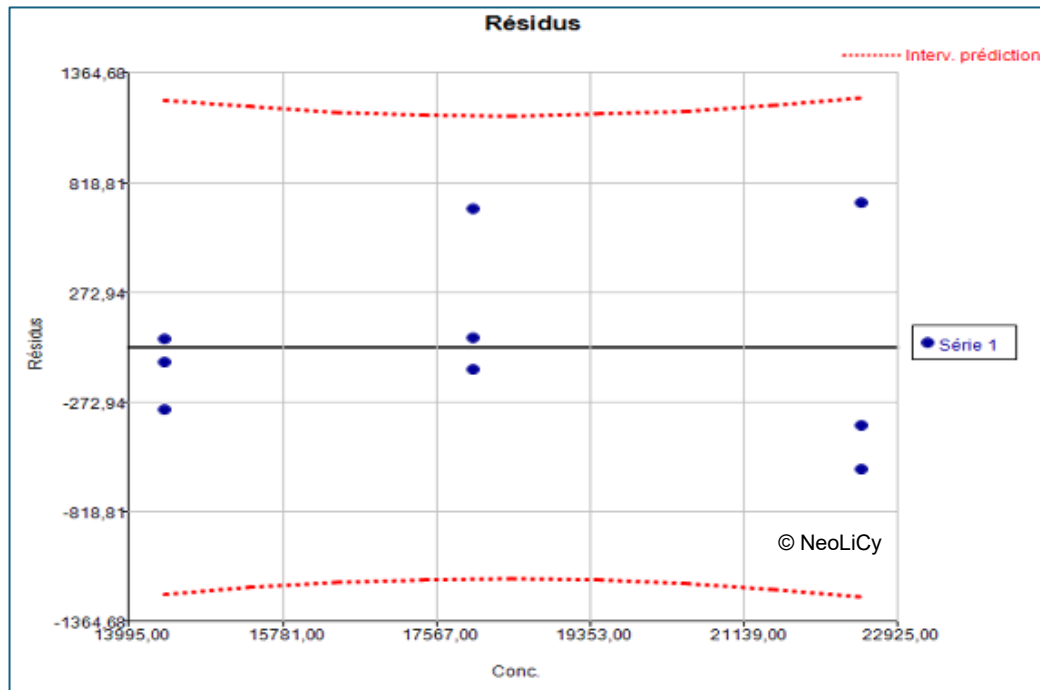
6. Exemples

6.4 Méthodes biologiques : Titrage microbiologique d'antibiotique

Exactitude (ICH):
3 niveaux, 3 répétitions

Tracé des Résidus

Intervalle de prédiction
pour les résidus : 97,50%



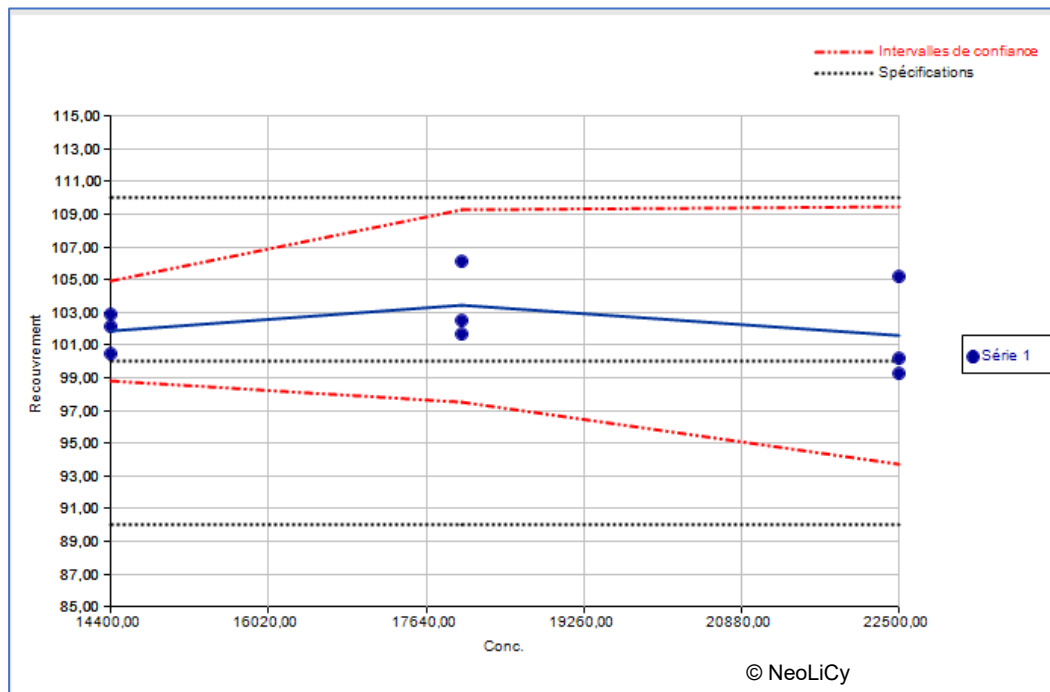
6. Exemples

6.4 Méthodes biologiques : Titrage microbiologique d'antibiotique

Exactitude:
3 niveaux, 3 répétitions

Intervalle de confiance : Graphe

Les résultats sont en
accord avec les spécifications



6. Exemples

6.4 Méthodes biologiques : Titrage microbiologique d'antibiotique

Exactitude:

3 niveaux, 3 répétitions

Intervalles de prédiction : Graphe

Les résultats ne sont pas en accord avec les spécifications :

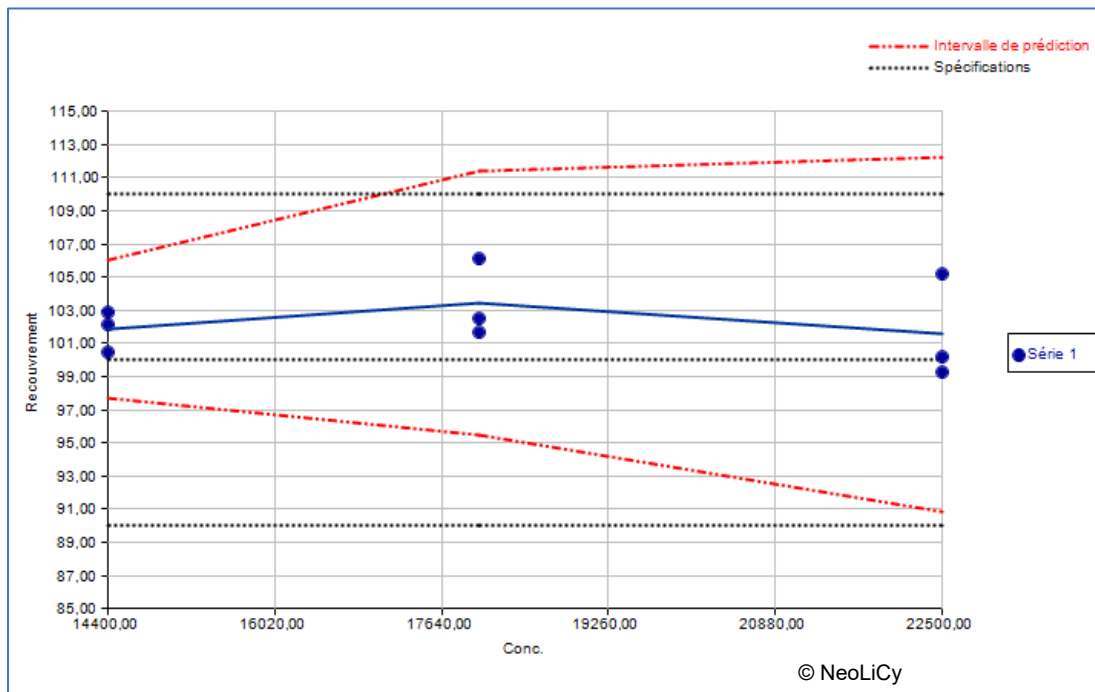
3 valeurs par niveau !

Mais :

Homogénéité des variances
Intervalle de mesures 80-120%



Intervalle de prédiction USP <1210> :
97.87% - 106.67% sur les 9 recouvrements



6. Exemples

6.4 Méthodes biologiques : Titrage microbiologique d'antibiotique

- Conclusion
 - L'étude de justesse réalisée avec 3 mesures par niveau, montre l'absence d'un biais significatif mais ne permet pas une exploitation raisonnable de l'intervalle de prédiction par niveau.
 - L'intervalle de prédiction calculé sur l'ensemble de l'intervalle de mesure (9 recouvrements) est en accord avec les spécifications
 - L'étude de fidélité menée au centre de la spécification avec 3 séries de 6 mesures démontre des performances en accord avec les spécifications
 - CV% de répétabilité et fidélité intermédiaire
 - Incertitude de mesure

6. Exemples

6.5 Analyses quantitatives par PCR

6.5.1 ADN génomique résiduel par qPCR

6.5.2 Vecteurs viraux par dPCR

6.5.3 ARN viral par qPCR Taqman

6. Exemples

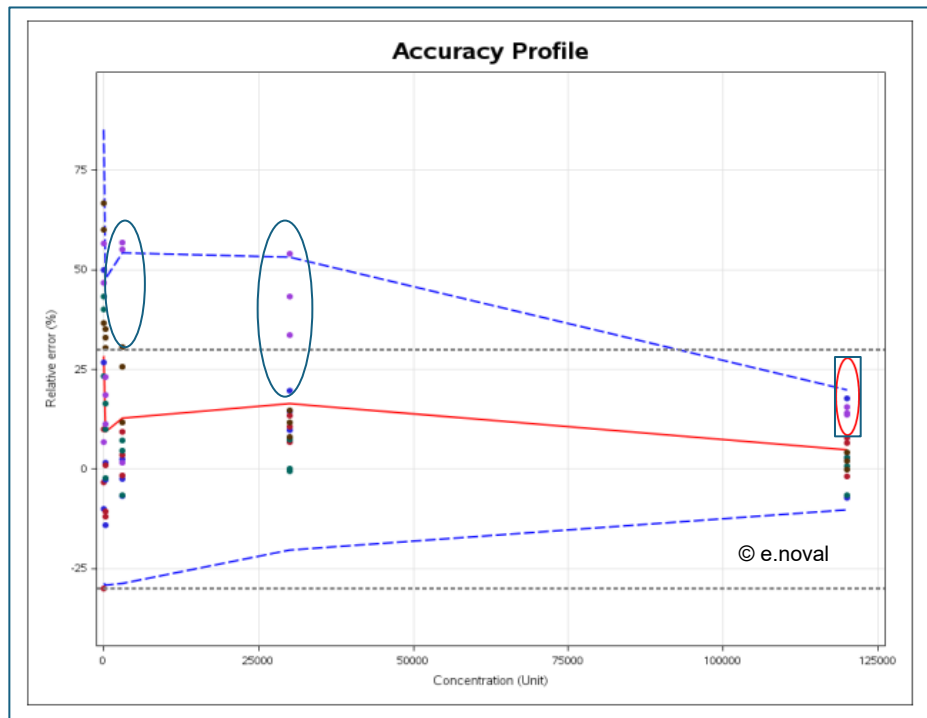
6.5 Analyses quantitatives par PCR

6.5.1 Analyse quantitative d'ADN génomique résiduel (Enzyme)

- Méthode
 - Moyenne de triplicats
 - Exclusion d'une valeur si Delta Cq > 0,5
 - Préconisation: validation des standards (dont stabilité / efficacité,...)
- Plan expérimental
 - 5 niveaux = 30/300/3000/30000/120000 copies/μg enzyme
 - 2 opérateurs + jours différents (répétabilité intra essais + opérateurs/jours)
 - Profil exactitude attendu => 30% (prévalidation)

6. Exemples

6.5.1 Dosage ADN génomique résiduel (enzyme)

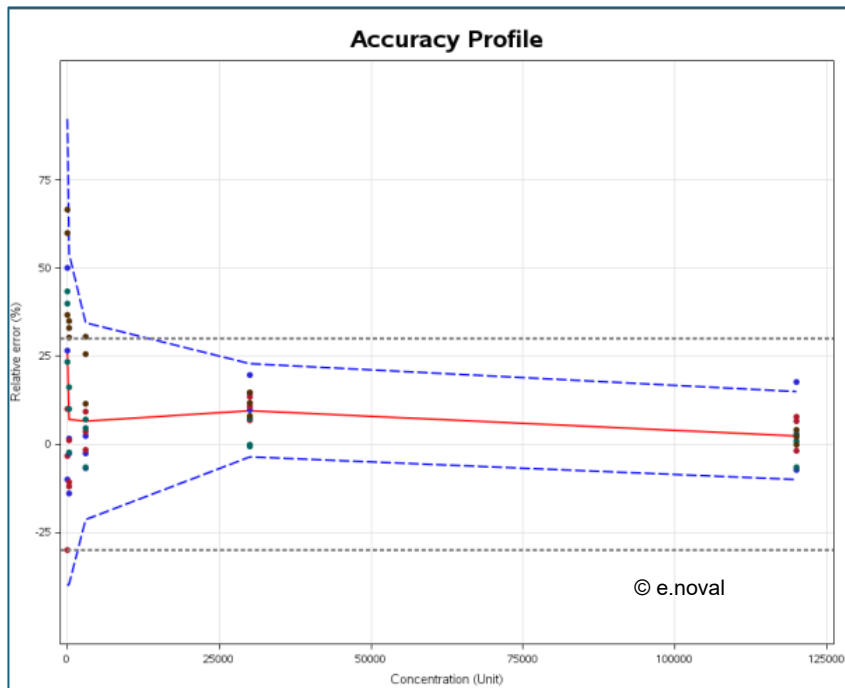


Valeurs aberrantes / Opérateur 2 ?

→ enquête labo permettant d'invalider les résultats (pipettage)

6. Exemples

6.5.1 Dosage ADN génomique résiduel (enzyme)



après exclusion données
issues opérateur 2
=> +/- 30%

6. Exemples

6.5.1 Dosage ADN génomique résiduel (enzyme)

- Conclusion/ préconisations
 - Ajouts de points intermédiaires entre 300 et 30000
 - Avec un opérateur reformé :
 - Design validation « complète »
 - 6 concentrations (30, 300, 3000, **6000**, 30000, 120000)
 - X 3 répéta intra essais (runs) X 2 opérateurs X 2 jours différents

6. Exemples

6.5 Analyses quantitative par PCR

6.5.2 Titrage de vecteurs viraux par digital PCR

Concentration du produit, nombre de copies de génomes viraux exprimé en (copies/ml)

- Méthode
 - Pour chaque mesure, procédure de dilution, extraction et dPCR (24000 partitions analysés selon la loi de Poisson)
- Plan expérimental
 - 5 dilutions = 5 quantités testés 1, 5, 25, 125, 625
 - 3 extractions indépendantes par dilution
 - 2 opérateurs
 - 3 jours différents



6. Exemples

6.5.2 Titrage de vecteurs viraux par dPCR :

	Assay #1			Assay #2			Assay #3		
	Extraction rep #1	Extraction rep #2	Extraction rep #3	Extraction rep #1	Extraction rep #2	Extraction rep #3	Extraction rep #1	Extraction rep #2	Extraction rep #3
Dilution 1	5,05E+10	5,48E+10	5,43E+10	4,23E+10	3,68E+10	3,65E+10	4,11E+10	4,04E+10	3,96E+10
Dilution 2	4,86E+10	5,38E+10	5,51E+10	4,19E+10	3,62E+10	3,99E+10	4,57E+10	4,69E+10	4,47E+10
Dilution 3	4,23E+10	4,96E+10	4,77E+10	3,88E+10	4,01E+10	3,81E+10	4,59E+10	4,57E+10	3,83E+10
Dilution 4	5,10E+10	5,27E+10	5,75E+10	5,22E+10	4,30E+10	3,89E+10	4,28E+10	4,43E+10	3,94E+10
Dilution 5	5,69E+10	5,86E+10	5,48E+10	5,18E+10	3,42E+10	6,42E+10	5,97E+10	5,14E+10	3,34E+10

	Valeur théorique	69000000000 copies/mL	10,83884909 log(copies/mL)	s					
	Assay #1			Assay #2			Assay #3		
	Extraction rep #1	Extraction rep #2	Extraction rep #3	Extraction rep #1	Extraction rep #2	Extraction rep #3	Extraction rep #1	Extraction rep #2	Extraction rep #3
Dilution 1	10.70	10.74	10.73	10.63	10.57	10.56	10.61	10.61	10.60
Dilution 2	10.69	10.73	10.74	10.62	10.56	10.60	10.66	10.67	10.65
Dilution 3	10.63	10.70	10.68	10.59	10.60	10.58	10.66	10.66	10.58
Dilution 4	10.71	10.72	10.76	10.72	10.63	10.59	10.63	10.65	10.60
Dilution 5	10.75	10.77	10.74	10.71	10.53	10.81	10.78	10.71	10.52

6. Exemples

Impact dilution?

6.5.2 Titration de vecteurs viraux par dPCR :

Exactitude:

- Chaque niveau correspond aux dilutions (pas de 5)
- Pour chaque niveau, concentration corrigée par le facteur de dilution
- Utilisation des résultats transformés en Log10
- En considérant 5 dilutions et 3 séries de 3 mesures par dilution

Table 4:1. Relative Intermediate Precision and Repeatability

Concentration level (Unit)	Mean introduced Concentration (Unit)	Repeatability (RSD%)*	Intermediate precision (RSD%)*
1	10.84	0.2220	0.7227
2	10.84	0.2368	0.6109
3	10.84	0.3132	0.4345
4	10.84	0.3988	0.6067
5	10.84	0.9526	0.9526

* The RSD% for Repeatability and Intermediate precision has been obtained by dividing the corresponding SD by the "Mean Introduced Concentration".

Table 3:1. Trueness

© seelva

Concentration level (Unit)	Mean introduced Concentration (Unit)	Mean results (Unit)	Absolute bias (Unit)	Relative bias (%)	Recovery (%)	95% Confidence Interval of Recovery (%)
1	10.84	10.64	-0.1999	-1.844	98.16	[97.67 , 98.64]
2	10.84	10.66	-0.1808	-1.668	98.33	[97.92 , 98.75]
3	10.84	10.63	-0.2079	-1.918	98.08	[97.77 , 98.40]
4	10.84	10.67	-0.1719	-1.586	98.41	[97.98 , 98.85]
5	10.84	10.70	-0.1358	-1.252	98.75	[98.02 , 99.48]

6. Exemples

6.5.2 Titration de vecteurs viraux par dPCR :

Exactitude:

- Chaque niveau correspond aux dilutions (pas de 5)
- Pour chaque niveau, concentration corrigée par le facteur de dilution
- Utilisation des résultats transformés en Log10
- En considérant 5 dilutions et 3 séries de 3 mesures par dilution

Table 6:1. Method accuracy

Concentration level (Unit)	Mean introduced Concentration (Unit)	Beta-expectation tolerance limit (Unit)	Relative Beta-expectation tolerance limit (%)	Total Error (%)	Risk* (%)
1	10.84	[10.40 , 10.88]	[-4.074 , 0.3859]	2.567	3.022
2	10.84	[10.46 , 10.85]	[-3.465 , 0.1290]	2.279	1.607
3	10.84	[10.52 , 10.74]	[-2.921 , -0.9146]	2.352	0.1231
4	10.84	[10.51 , 10.83]	[-3.054 , -0.1185]	2.193	0.4712
5	10.84	[10.50 , 10.91]	[-3.129 , 0.6238]	2.205	0.3226

* Risk of having measurements falling outside of the acceptance limits.

© seelva

Impact dilution?

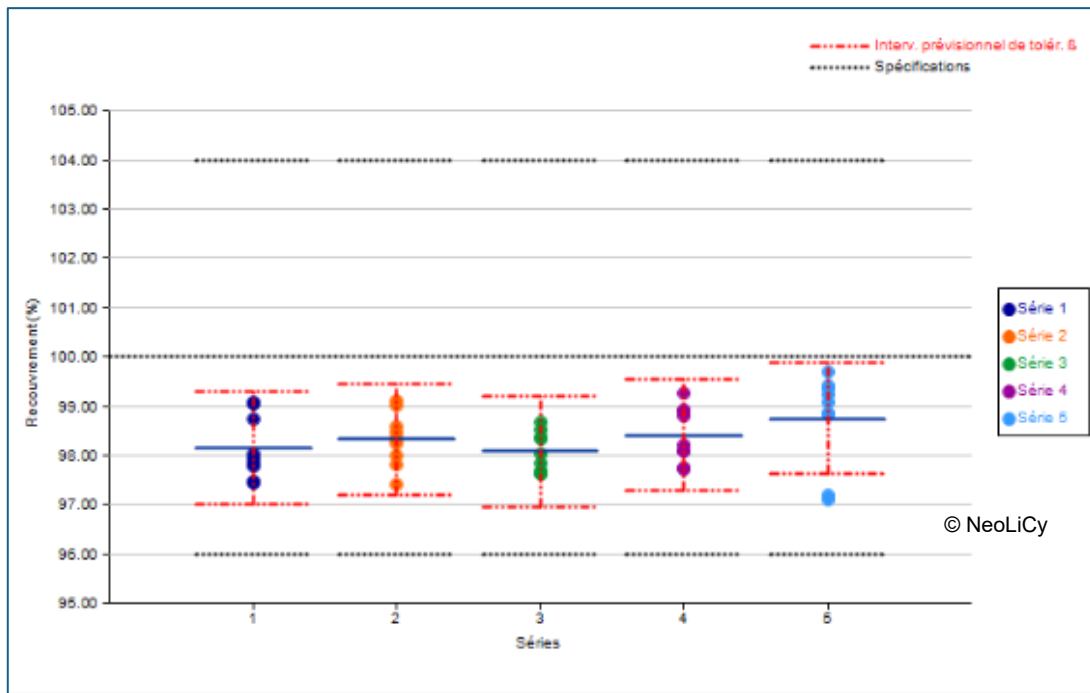
Exactitude:

Utilisation des résultats transformés en Log10

En considérant **5 dilutions et 9 mesures par dilution**

$$CV_r = 0,66\%$$

CVfi = 0,67%



6. Exemples

Impact extraction?

6.5.2 Titrage de vecteurs viraux par dPCR :

Exactitude:

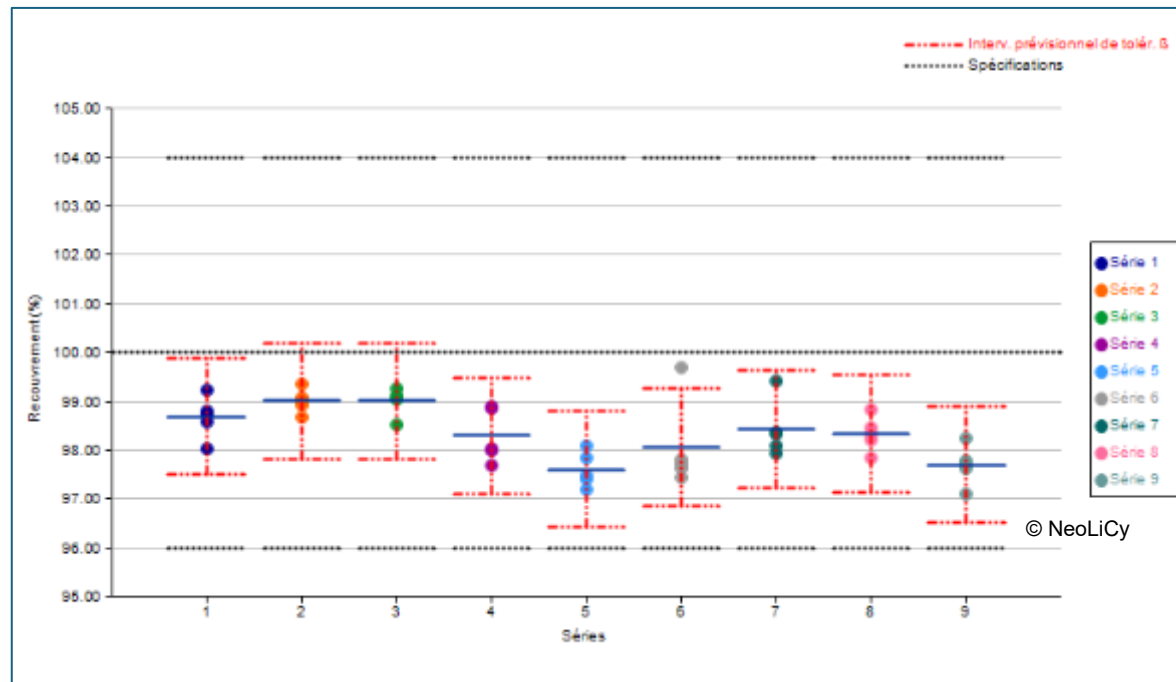
Chaque niveau correspond aux dilutions

Utilisation des résultats transformés en Log10

En considérant **9 extractions par 5 dilutions**

CVr = 0,51%

CVfi = 0,68%



6. Exemples

6.5.2 Titrage de vecteurs viraux par dPCR :

Exactitude:

Chaque niveau correspond aux dilutions
Utilisation des résultats non transformés
En considérant 5 dilutions et 3 séries de 3
mesures par dilution

Exactitude:

Chaque niveau correspond aux dilutions
Utilisation des résultats non transformés
En considérant 5 dilutions et 9 mesures par
dilution
CVr = 15,91%
CVfi = 16,68%

Table 4:1. Relative Intermediate Precision and Repeatability

Concentration level (Unit)	Mean introduced Concentration (Unit)	Repeatability (RSD%)*	Intermediate precision (RSD%)*
1	6.9000E+10	3.419	11.90
2	6.9000E+10	3.863	10.05
3	6.9000E+10	4.901	6.787
4	6.9000E+10	6.686	10.38
5	6.9000E+10	15.75	15.75

* The RSD% for Repeatability and Intermediate precision has been obtained by dividing the corresponding SD by the "Mean Introduced Concentration".

© seelva

Exactitude:

Chaque niveau correspond aux dilutions
Utilisation des résultats non transformés
En considérant 9 extractions par 5 dilutions
CVr = 12,94%
CVfi = 16,86%

6. Exemples

6.5.2 Titrage de vecteurs viraux par dPCR :

- Conclusion
 - Pas d'erreur significative provenant de la dilution, de l'extraction et de l'analyse qPCR
 - L'utilisation de la transformation logarithmique permet de compenser la variabilité naturellement importante de mesures de l'ordre de 10^{E+6} à 10^{E+10}
 - Le biais significatif avec la valeur théorique s'explique par l'obtention de celle-ci via une autre méthode de mesure non spécifique (fluorimétrie).
 - LLOQ est déterminée comme la moyenne des résultats de la plus forte dilution (soit 6 copies par réaction). A l'aide des 5 facteurs de dilutions validés, toutes les valeurs biologiquement réalisables pourront être titrées.

6. Exemples

6.5 Essais PCR

6.5.3 qPCR

- Quantification d'acide nucléique viral (Taqman)
 - Utilisation: vérifier l'efficacité de candidats vaccin sur modèle in vivo
 - Un étalon à partir de souche virale quantifiée pour définir l'intervalle de mesure ($4,2 \cdot 10^6$ à $4,2 \cdot 10^2$ copies/ μ L)
 - Spécimen : pool d'extraits d'ARN issus d'écouvillons nasaux (chien) :
 - 3 séances de 5 dilutions (1 à 10^{-4} par pas de 10, soit $1,8 \cdot 10^5$ à 18 copies/ μ L), 3 opérateurs différents, 3 jours différents, 2 réplicats par dilution/séance
 - Points de dilution utilisés pour vérifier la LLOQ en dessous 420 copies/ μ L (18 et 180 copies/ μ L)

6. Exemples

6.5 Essais PCR

6.5.3 qPCR: Norme NF-U47-600 2015

"Exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale"

- Recommandations :
 - 3 méthodologies:
 - 1. Spécimens
 - 2. Matrices dopées par pathogène ou pathogène dosé
 - 3. Matrice dopées par ARN/ADN
 - Nécessité d'avoir un Acide nucléique cible (génomé purifié ou synthétique) dosé
 - L'étalon pour la quantification absolue
 - Standard: efficacité de PCR (75-125%), régression linéaire, LLOQ (dernier point avec précision/linéarité/exactitude, Biais ≤ 0.25 LOG).
- Diagnostic
- Détection, quantification d'agents infectieux à partir d'animaux
- Géotypage

"En pratique" STD vérifié à chaque séance et normes établies

6. Exemples

6.5 Essais PCR

6.5.3 qPCR: Norme NF-U47-600

- **LLOD**: plus petite quantité Ac nucléaire détectée dans $\approx 95\%$ des cas/expérimentale ou statistique (modèle Probit+ confirmation expérimentale en fidélité intermédiaire)
 - Min: 3 séances, 1 opérateur, 8 replicats/dilutions
- **Spécificité** in silico+ **expérimentale** (exclusivité/inclusivité)
"En pratique": surcharge sur matrice négative et calcul d'un recouvrement
- Justesse et fidélité intermédiaire **par profil d'exactitude** ou par niveau de charge

Tableau 10 — Plan d'expérience pour la validation de la méthode complète

Conditions de validation	Nombre de séries indépendantes (<i>I</i>)	Nombre minimum de niveaux de charge (<i>K</i>)	Nombre de répétitions (<i>J</i>)
Intra laboratoires	≥ 3	≥ 3	≥ 2
Inter laboratoires	≥ 8	≥ 3	≥ 2

6. Exemples

• 6.5.3 qPCR : Profil d'exactitude

- Données par dilution et réplicat d'un pool positif de spécimen (volume échantillon individuel insuffisant)

PUR		10-1		10-2		10-3		10-4	
Théorique	Mesuré	Théorique	Mesuré	Théorique	Mesuré	Théorique	Mesuré	Théorique	Mesuré
5,253	5,284	4,253	4,353	3,253	3,402	2,253	2,386	1,253	1,198
	5,306		4,346		3,348		2,321		1,291
	5,187		4,272		3,272		2,271		0,999
	5,201		4,260		3,283		2,161		0,889
	5,294		4,333		3,345		2,300		1,243
	5,223		4,338		3,358		2,120		0,965

6. Exemples

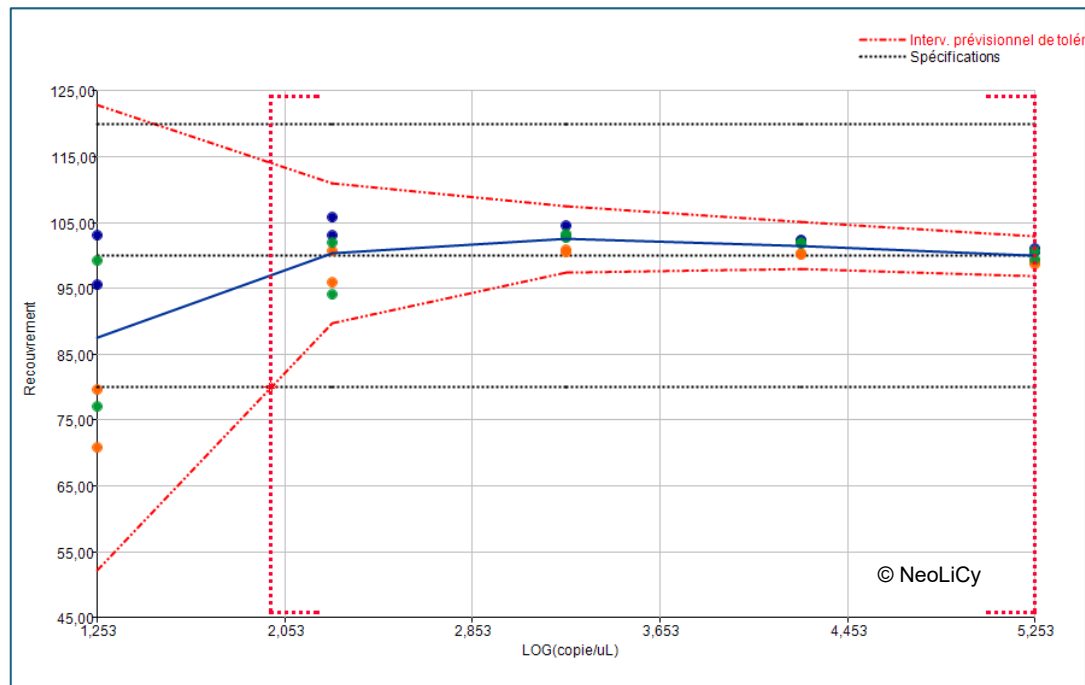
• 6.5.3 qPCR : Profil d'exactitude

Exactitude:

Chaque niveau correspond
aux dilutions

Utilisation des résultats
transformés en Log10

La LLOQ se situe entre les
dilutions 10^{-3} et 10^{-4} (valeur
1,99 en échelle Log10).
Décision de fixer la LLOQ au
dernier point exact (dilution
 10^{-3} , soit 2,23 en Log10)

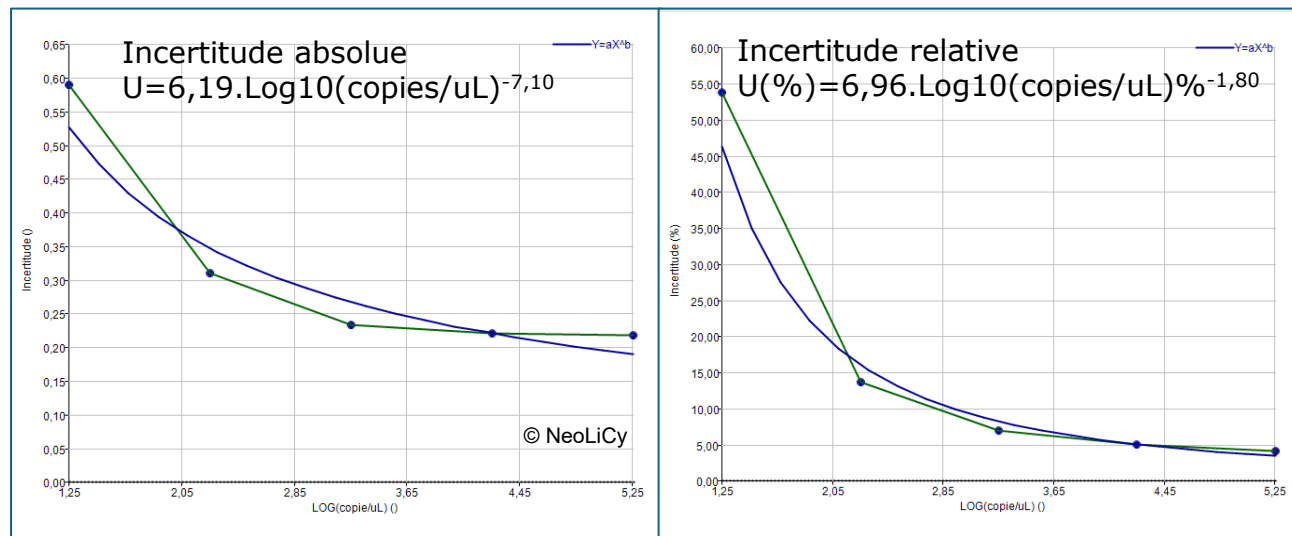


6. Exemples

- 6.5.3 qPCR : Profil incertitude

Exactitude:

Le profil d'exactitude permet d'accéder à l'estimation de l'incertitude de mesure pour chaque dilution



6. Exemples

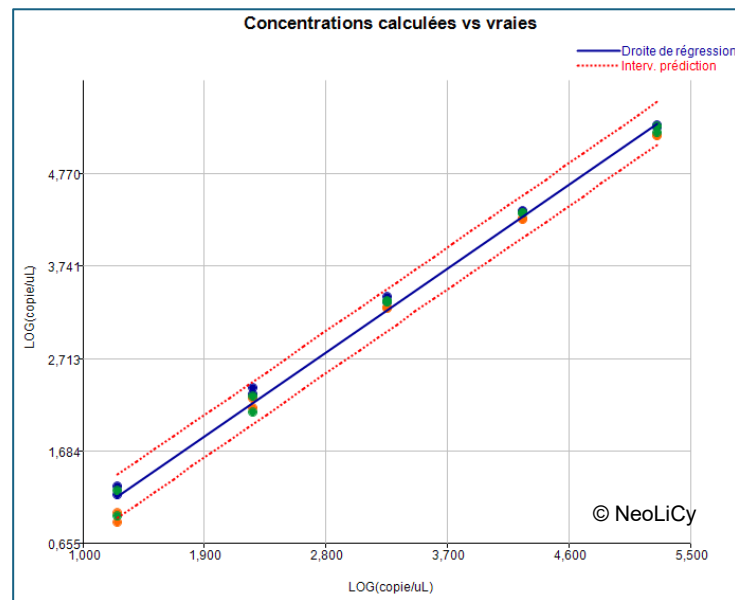
- **6.5.3 qPCR : Linéarité méthode**

- De l'erreur de s'arrêter à la linéarité méthode

- Droite des mesures vs référence

- $r^2 = 0,995409$

- Mais.....



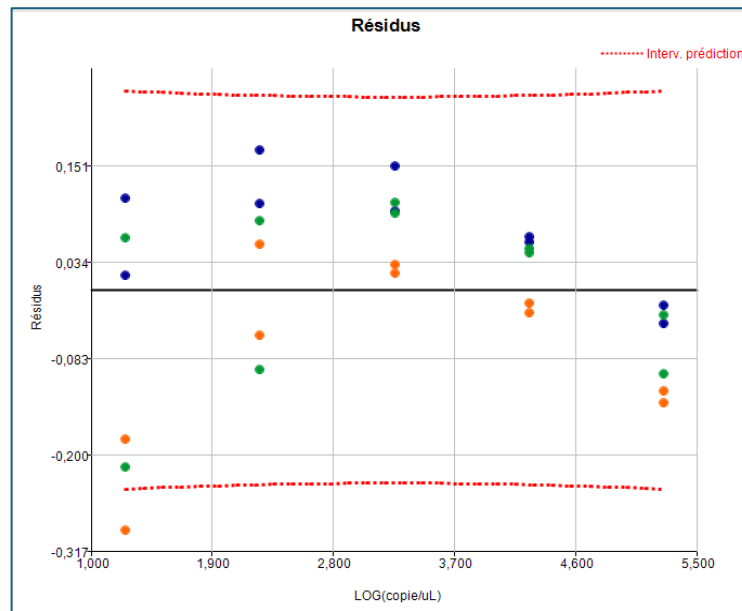
6. Exemples

- 6.5.3 qPCR : Linéarité méthode

- De l'erreur de s'arrêter à la linéarité méthode
 - Droite des mesures vs référence
 - $r^2 = 0,995409$

- Mais.....

r^2 est-il un bon paramètre ?



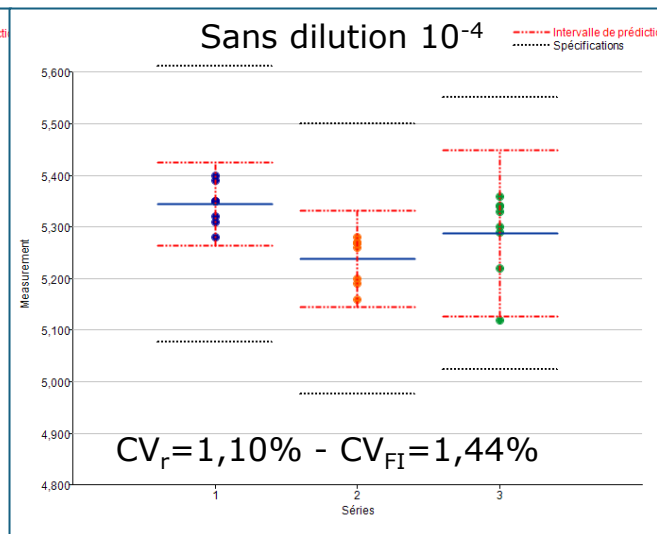
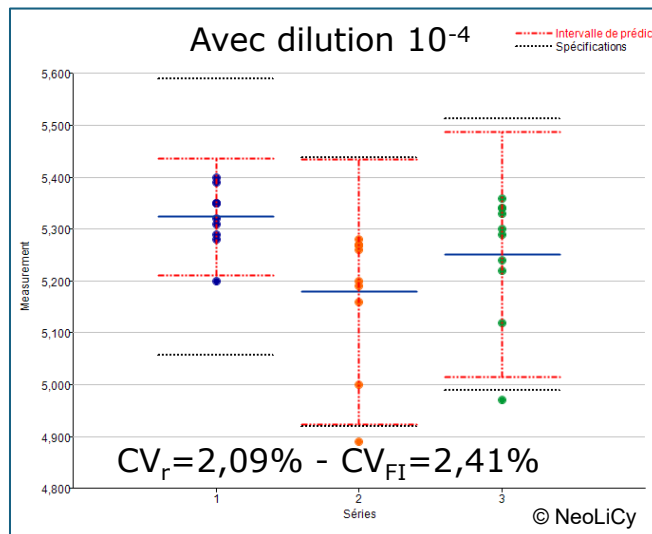
6. Exemples

- **6.5.3 qPCR : Impact de la dilution 10^{-4} sur la dispersion**
 - Les données sont traitées par séance, avec les valeurs Log10 normalisées sur la dilution 1/1
 - 3 séances de 10 mesures pour 5 dilutions/séance
 - 3 séances de 8 mesures pour 4 dilutions/séance

6. Exemples

- 6.5.3 qPCR : Impact de la dilution 10^{-4} sur la dispersion

Intervalles de prédiction (USP <1210>) pour 90% de probabilité, La dilution 10^{-4} impacte fortement la dispersion des mesures et justifie le choix d'une LLOQ à une dilution de 10^{-3} .



6. Exemples

- **6.5.3 qPCR : Conclusions**

- Le profil d'exactitude permet une évaluation fine des performances de la procédure sur l'ensemble de son intervalle de mesure,
 - Le profil d'exactitude permet une estimation de la LLOQ de manière expérimentale, entre les dilutions 10^{-3} et 10^{-4} (valeur 1,99 en échelle Log10) qui permet de confirmer la LLOQ expérimentale
-
- **Le r^2 est un paramètre de corrélation, pas de linéarité !**
 - **Impact de la dilution 10^{-4} sur la dispersion**
 - La dispersion des mesures obtenue pour la dilution 10^{-4} confirme l'obligation de quantifier dans un intervalle de 180 à $4,2 \cdot 10^6$ copies/ μL

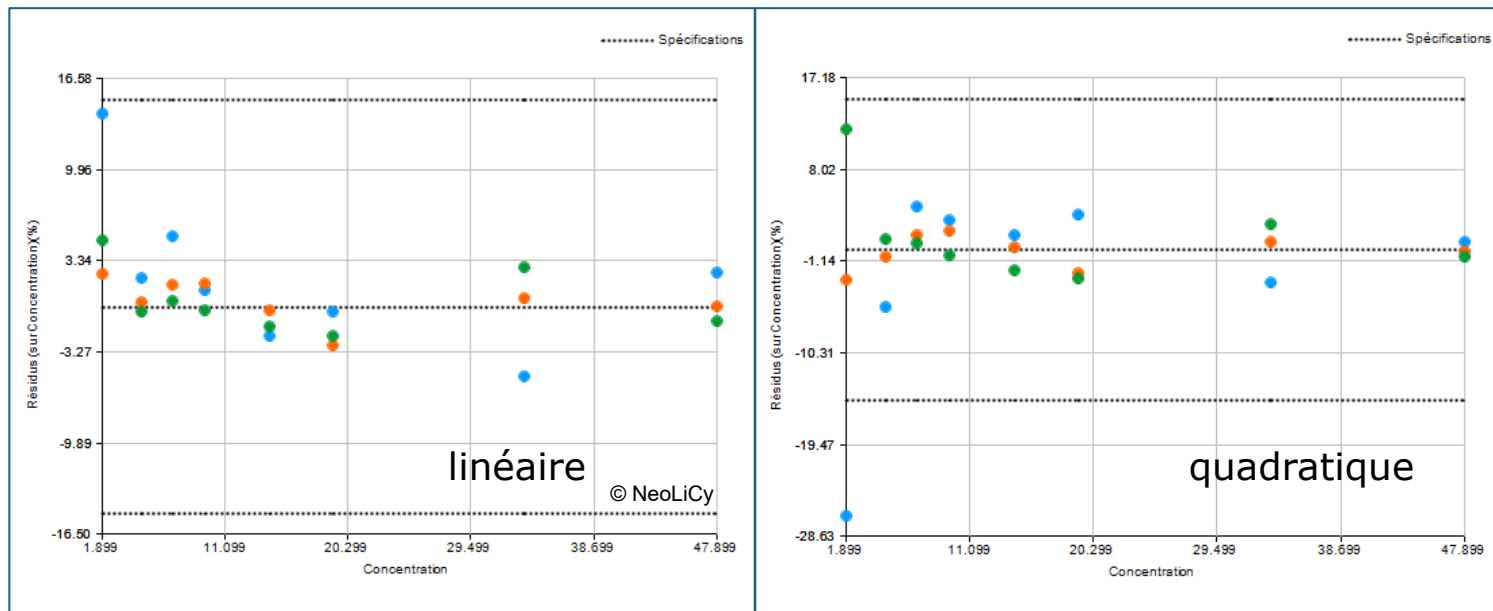
6. Exemples

- **6.6 Analyse quantitative par UHPLC/MS (ICH M10)**

- Quantification d'un actif (antiparasitaire) dans un milieu biologique prélevé par compresse (unité : $\mu\text{g}/\text{comprime}$); résidu salivaire de la molécule administrée
 - UHPLC/MS (simple quadrupole)
 - Etalonnage interne
 - Etude de fonction de réponse (8 niveaux, 3 séries, 1 répétition)
 - Exactitude multi-modèles (4 niveaux, 3 séries, 5 répétitions)

6. Exemples

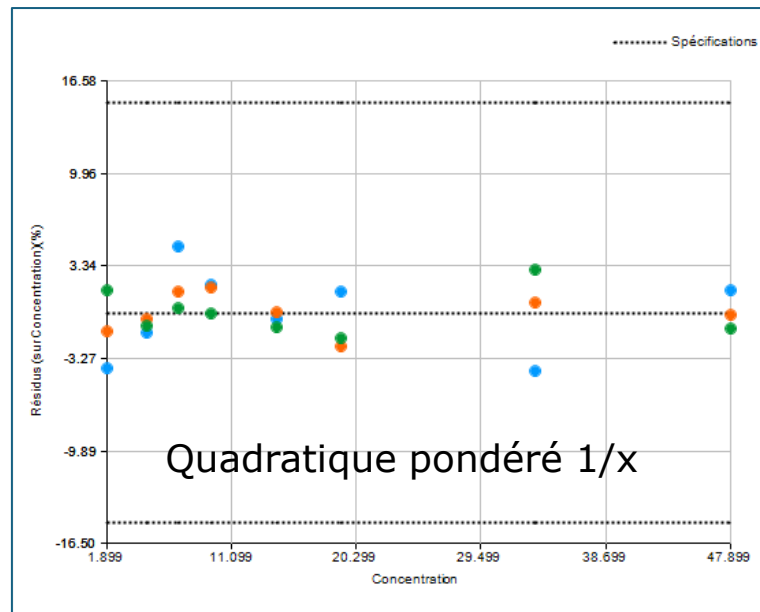
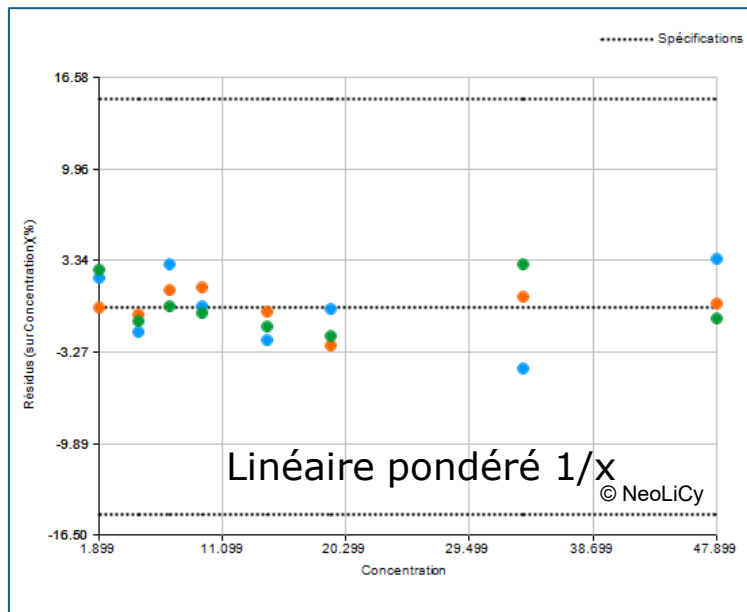
- 6.6 Analyse quantitative par UHPLC/MS (QDa)
 - Analyse de l'étalonnage



6. Exemples

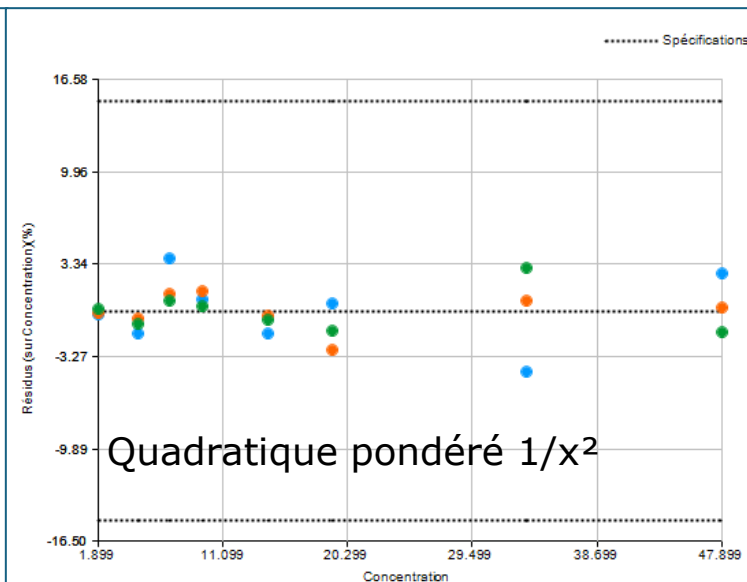
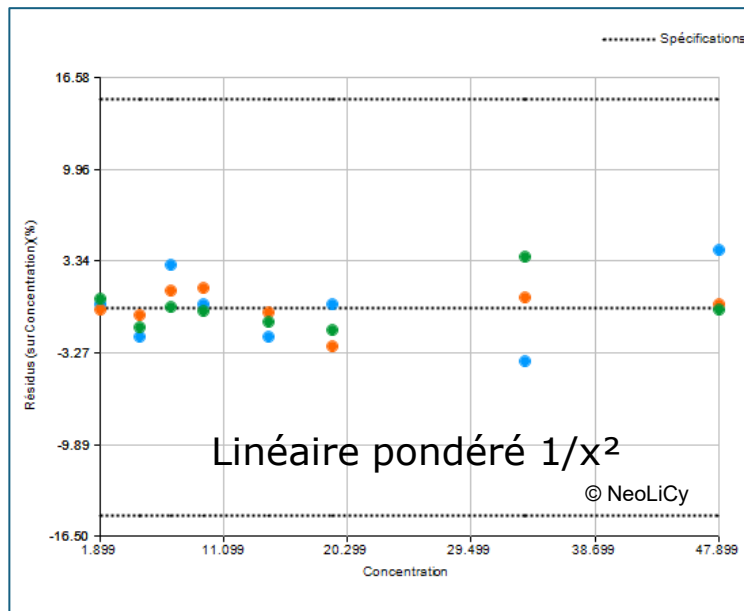
6.6 Analyse quantitative par UHPLC/MS (QDa)

Analyse de l'étalonnage



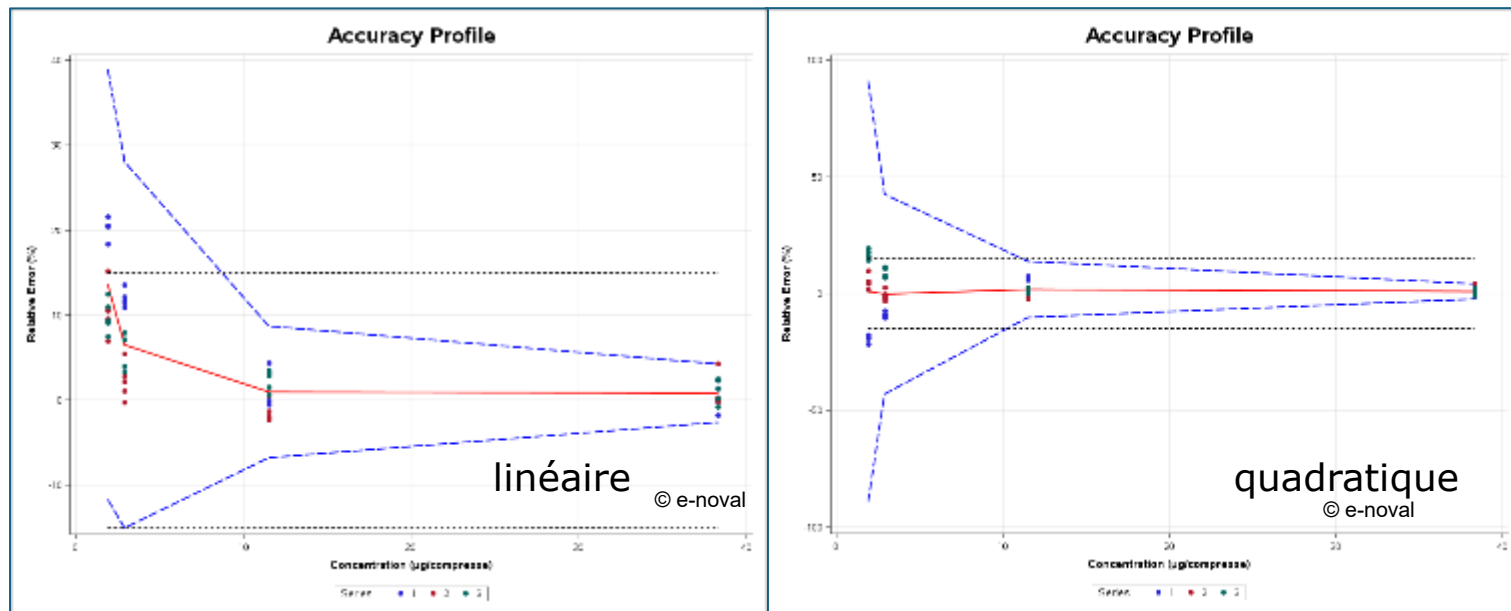
6. Exemples

- 6.6 Analyse quantitative par UHPLC/MS (QDa)
 - Analyse de l'étalonnage



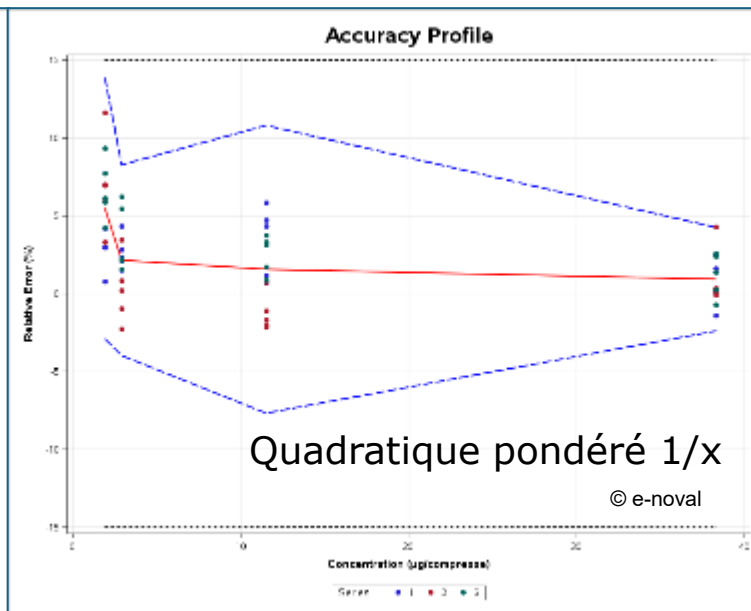
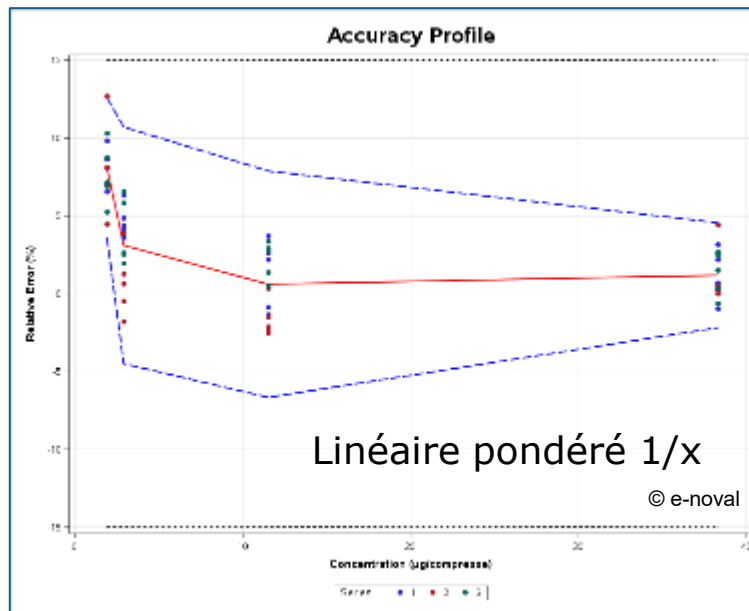
6. Exemples

- 6.6 Analyse quantitative par UHPLC/MS (QDa)
 - Profils d'exactitude



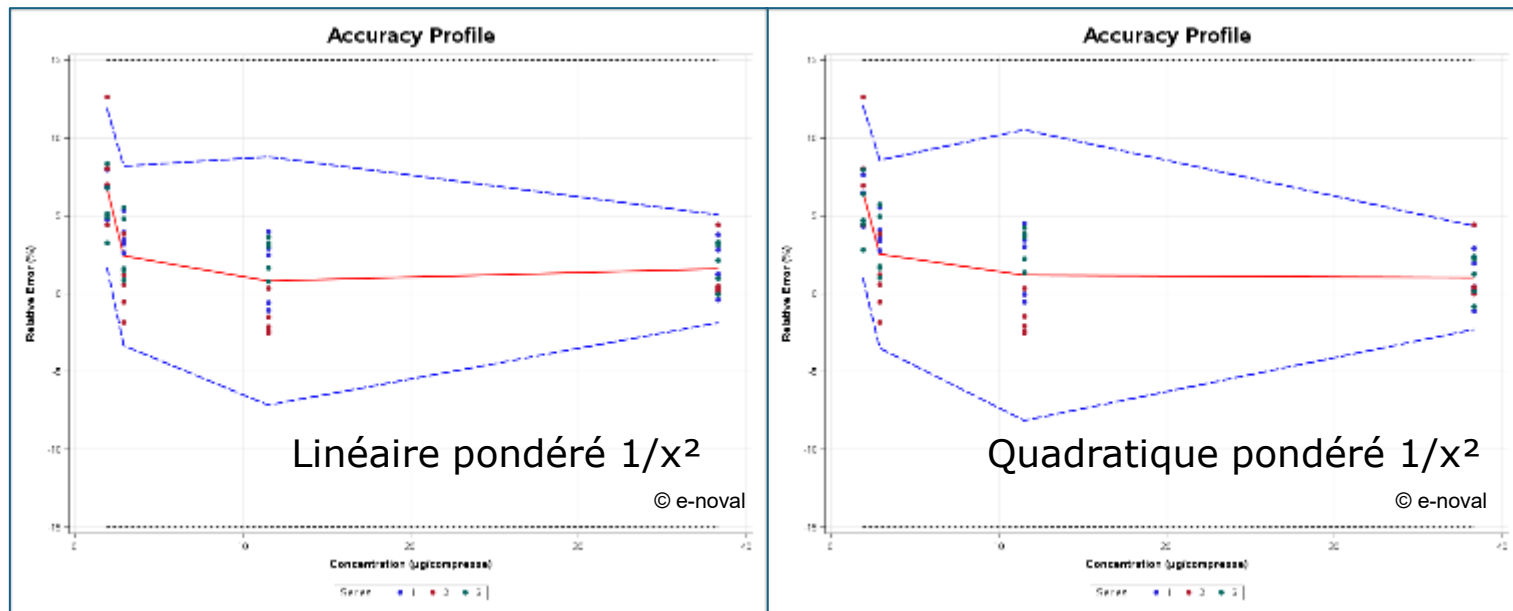
6. Exemples

- 6.6 Analyse quantitative par UHPLC/MS (QDa)
 - Profils d'exactitude



6. Exemples

- 6.6 Analyse quantitative par UHPLC/MS (QDa)
 - Profils d'exactitude



6. Exemples

- **6.6 Analyse quantitative par UHPLC/MS (QDa)**

- Conclusion

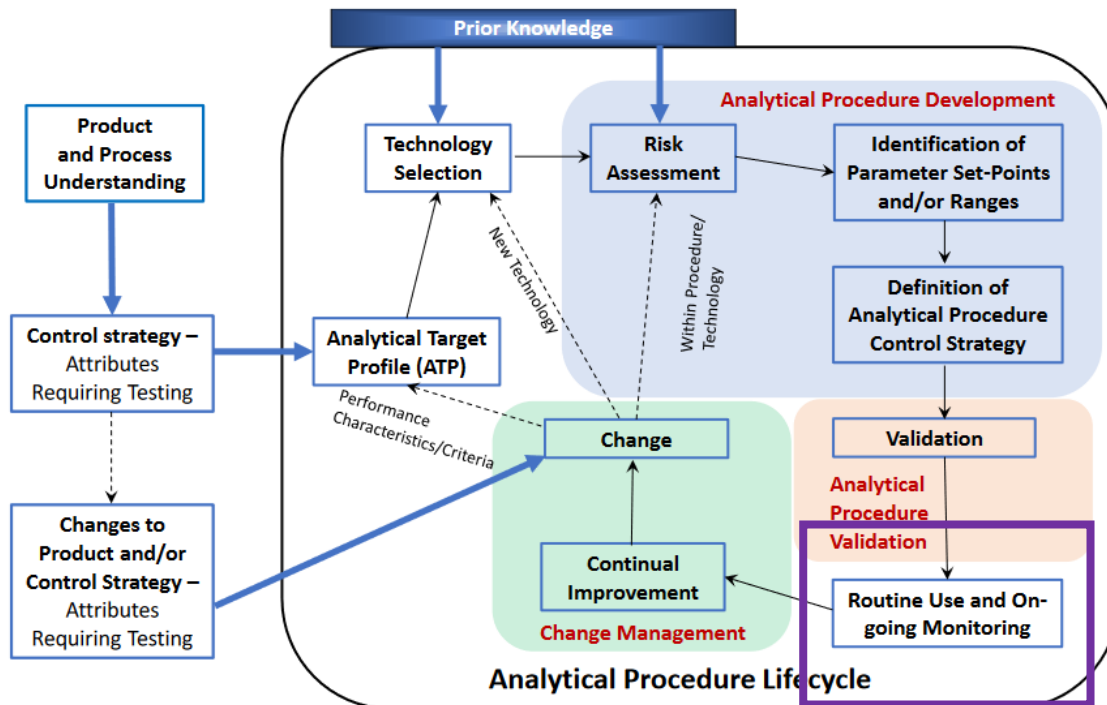
- Les modèles linéaire (biais et dispersion) et quadratique (dispersion) sont à proscrire à cause des résultats obtenus dans les bas niveaux.
 - FDA 2018: « fit for purpose response »
 - Les modèles linéaire et quadratique pondérés sont très comparables en termes de profils d'exactitude :
 - Le modèle quadratique pondéré n'apporte rien de plus,
 - Le choix se fera entre linéaire pondéré en $1/x$ et $1/x^2$

Suivi des performances

7. Suivi des performances

Schéma extrait de
ICH Q14

Figure 1: The Analytical Procedure Lifecycle



7. Suivi des performances

- Suivi des performances des procédures analytiques incluant la gestion des OOT/OOE
 - Utilisation d'un échantillon de contrôle ou standard avec une valeur cible
 - Détermination des limites de contrôle
 - Suivi des valeurs
 - carte de contrôle de la moyenne et de l'écart-type ou étendue
 - utilisation de règles d'interprétation type Western Electric/Nelson (ISO 7870) ou Westgard (pour les cartes de Levey-Jennings)
 - Voir : ISO 7870 Parties 1 et 2 (cartes de contrôles de Shewhart), Partie 4 (cartes CUSUM) et Partie 6 (cartes EWMA)

7. Suivi des performances

- Suivi des performances des méthodes : carte de contrôle
 - Exemple de règles d'interprétation (règles Western Electric/Nelson)

Règle 1: une mesure au delà de la zone +3s ou -3s (**zone A**)

Règle 2 : neuf mesures de suite dans la même zone +1s ou -1s (**zone C**), ou du même côté de la ligne centrale

Règle 3 : six mesures successives augmentant ou diminuant de manière régulière

Règle 4 : quatorze mesures successives alternativement sur et sous la ligne centrale (tout comportement non aléatoire)

Règle 5 : deux mesures sur trois (successives) dans la zone +3s ou -3s (**zone A**), ou au-delà, d'un côté de la ligne centrale

Règle 6 : quatre mesures sur cinq (successives) dans la zone +2s ou -2s (**zone B**), ou au-delà, d'un côté de la ligne centrale

Règle 7 : quinze mesures successives alternativement dans la zone +1s et -1s (**zone C**)

Règle 8 : huit mesures successives des deux côtés de la ligne centrale, aucune d'elles dans la zone +1s ou -1s (**zone C**)



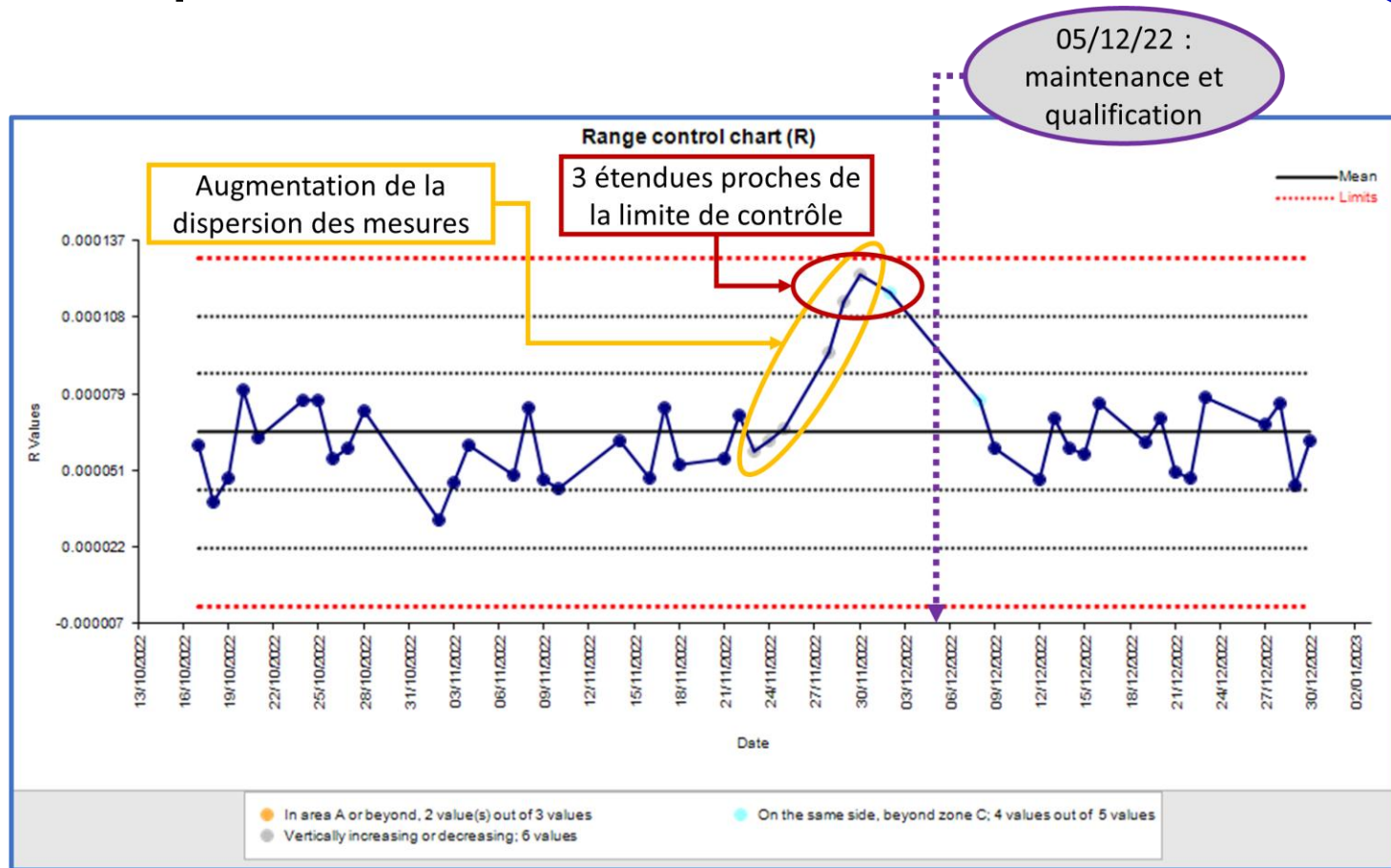
- 



7. Suivi des performances

Exemple de carte de contrôle de l'étendue (suivi d'un facteur de réponse relatif en HPLC)

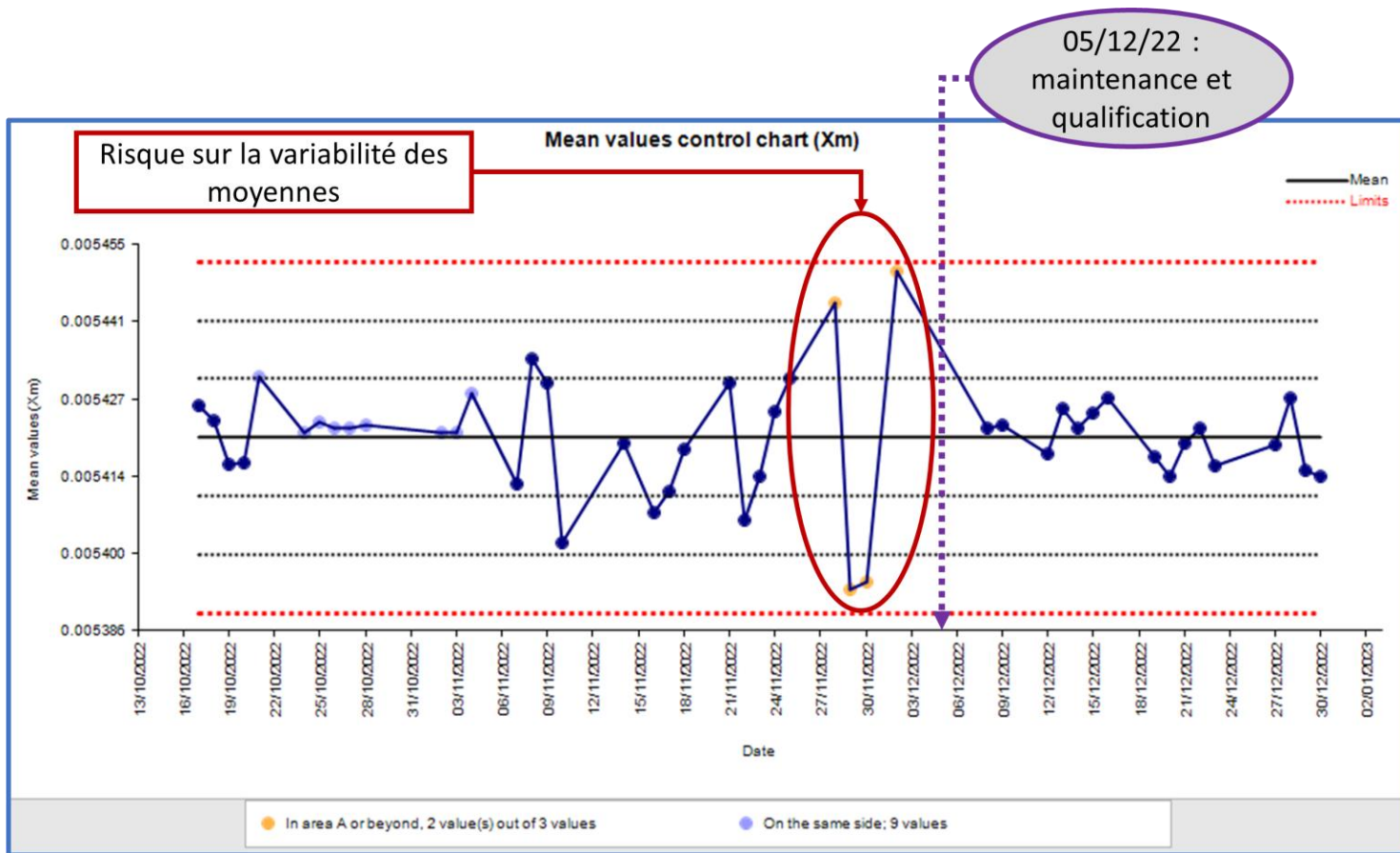
Graphes selon USP
<1221> (USP PF 51(4))



7. Suivi des performances

Exemple de carte de contrôle de l'étendue (suivi d'un facteur de réponse relatif en HPLC)

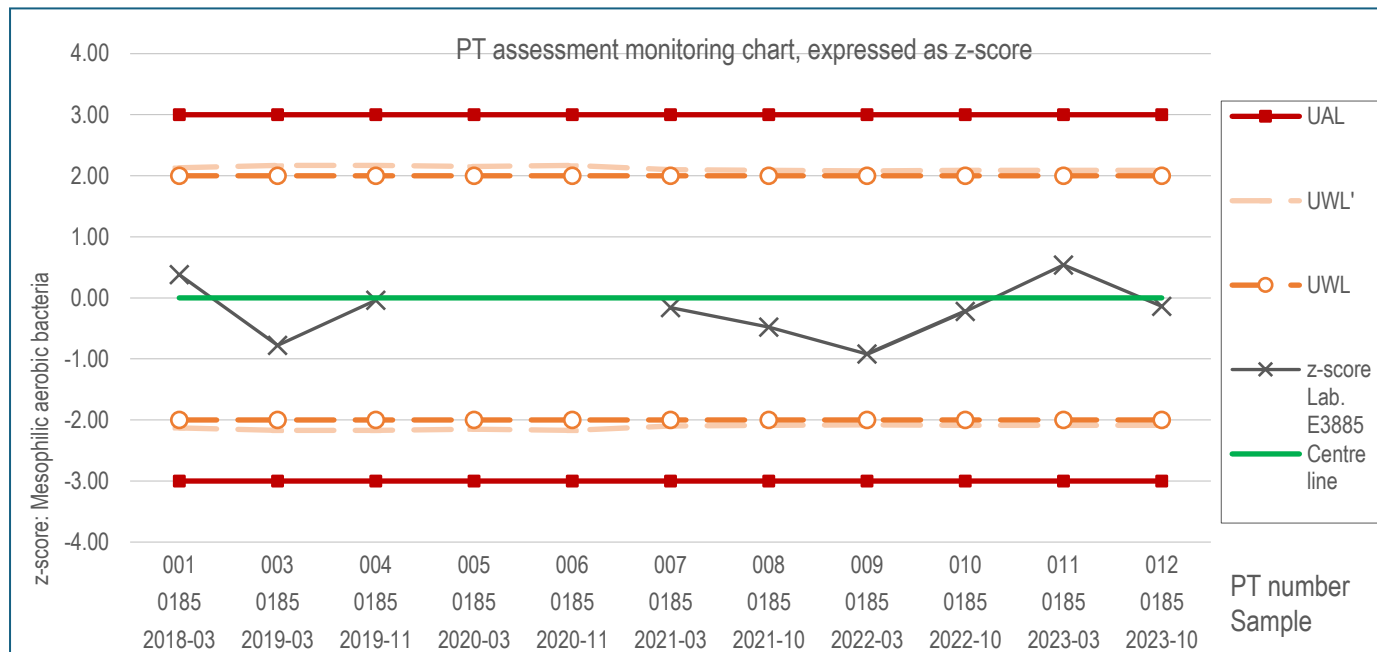
Graphique selon USP <1221> (USP PF 51(4))



7. Suivi des performances

Exemple de carte de contrôle de la moyenne (suivi du z-score d'un laboratoire lors d'un circuit inter-laboratoires)

Cas 1 : Laboratoire sous contrôle

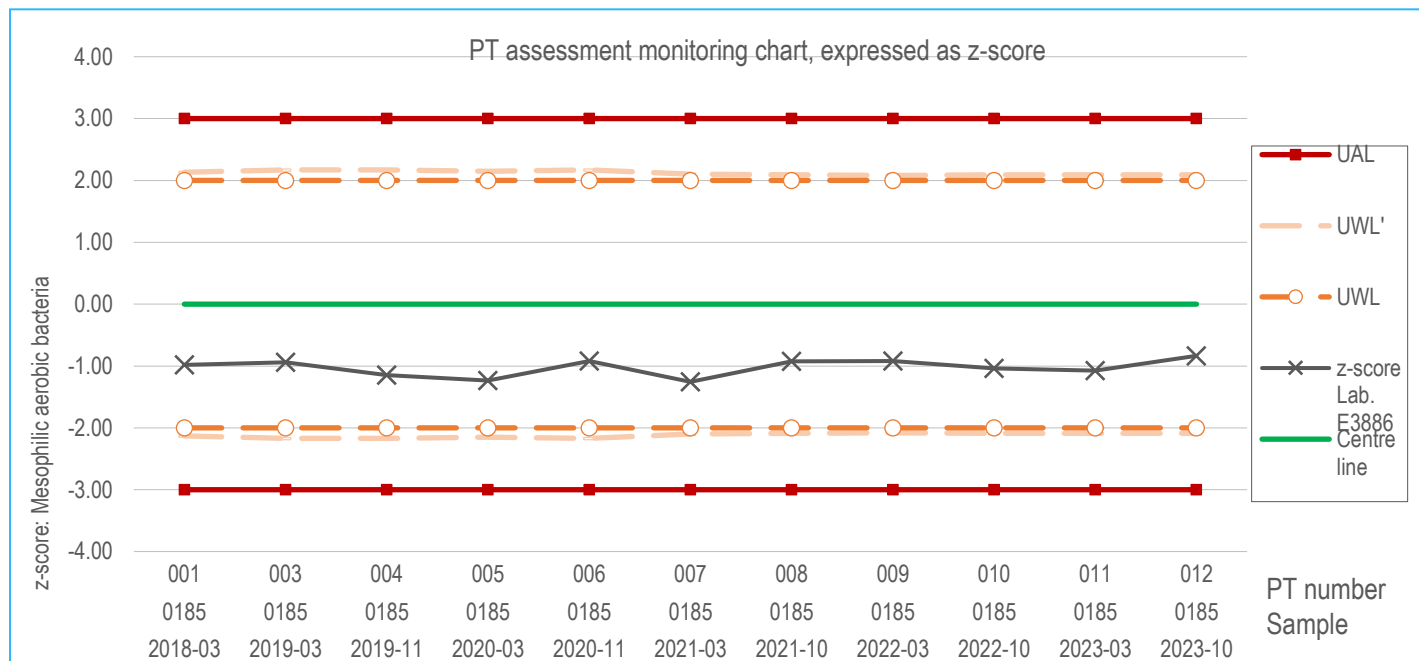


Valeur centrale : valeur de consensus du test
Limites : $\pm 2s$ (limites d'alerte) et $\pm 3s$ (limites d'action)

7. Suivi des performances

Exemple de carte de contrôle de la moyenne (suivi du z-score d'un laboratoire lors d'un circuit inter-laboratoires)

Cas 2 : Laboratoire présentant un biais constant par rapport à la valeur de consensus



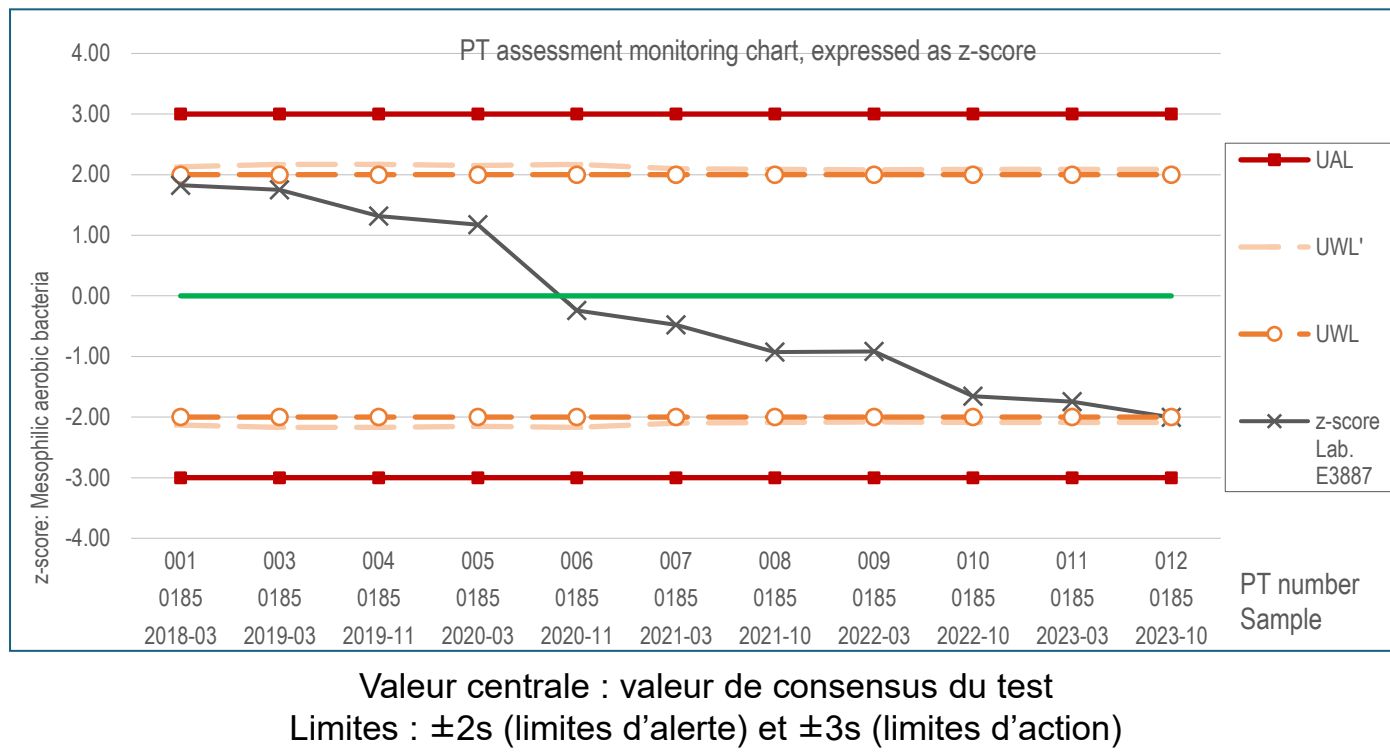
Valeur centrale : valeur de consensus du test

Limites : $\pm 2s$ (limites d'alerte) et $\pm 3s$ (limites d'action)

7. Suivi des performances

Exemple de carte de contrôle de la moyenne (suivi du z-score d'un laboratoire lors d'un circuit inter-laboratoires)

Cas 3 : Laboratoire présentant une dérive des résultats



Conclusion

Conclusion

- Le but de cette commission était de décrire les méthodologies permettant de conduire les validations des Bio-essais de type **essais chromatographiques, essais de ligands, essais in vitro sur cellules, essais PCR...**, de présenter différents exemples d'application ainsi que l'exploitation statistique des données obtenues.
- La commission s'est attachée à développer les différentes problématiques de la validation d'une méthode de mesure d'un Bio-essai et donc du **contrôle qualité des produits biologiques**.

Conclusion

- Le but de la validation d'une méthode est de s'assurer de la **fiabilité des résultats obtenus et donc de la qualité et de la pertinence des informations obtenues par son application** (dosages des principes actifs, activité, essais limites, impuretés...).
- Les différents éléments des validations des Bio-essais pour les analyses chromatographiques et les essais de ligands ont été résumés par la commission conformément aux dispositions de:
 - **ICH Q2(R2) (2023)**
 - **ICH M10: Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis (2022)**
 - **FDA: Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry (May 2018).**

Conclusion

- Pour les bio essais *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* (cell base assays) seules des recommandations sont mentionnées pour les paramètres de validations à évaluer et les règles statistiques à appliquer dans les textes **USP <1032>**, **<1033>** et **<1034>**. L'ICH Q2(R2) mentionne très succinctement l'évaluation des activités des produits testés.
- La commission a indiqué ses propositions de plan expérimental de validation.
 - Les différents exemples proposés ont permis de démontrer que la fiabilité des méthodes est assurée par une bonne exploitation statistique.
 - Pour mener à bien ces exploitations statistiques, **l'utilisation du profil d'exactitude est fortement recommandée**, ainsi que l'estimation de l'incertitude de mesure.

Conclusion

- Les différents exemples développés ont montré les difficultés de réalisation ainsi **que les insuffisances de certaines stratégies de validation** pour permettre la bonne évaluation des méthodes.
- La commission a également évoqué le **traitement des éventuelles valeurs aberrantes obtenues lors des validations des Bio-essais, évidemment plus fréquentes du fait de la variabilité de la réponse des modèles biologiques.**
- Enfin la commission a abordé quelques éléments d'évaluation des méthodes pour satisfaire aux nouvelles exigences des ICH Q12 et ICH Q14 (robustesse et suivi des performances des méthodes tout au long du cycle de vie des médicaments biologiques).

Conclusion

- Les outils existent pour une exploitation statistique pertinente de données de validation.
- Il ne faut pas perdre de vue que le plan de validation sera directement dépendant de l'importance d'éventuels effets inter-séries.
 - La commission recommande l'utilisation de plans expérimentaux de validation permettant l'ajout de séries complémentaires pour palier l'impact de ces effets sur la performance de la méthode.
 - Une étape de prévalidation, pour sa partie d'évaluation de la fidélité, permet d'identifier ces effets délétères.

ICH Q14 et Q2(R2) insistent sur la valorisation des données obtenues lors du développement :

“Suitable data derived from development studies can be used as part of validation data”

Points clés

Les bio-essais posent des contraintes du fait

- d'une plus grande variabilité des échantillons et de la réponse biologique
- de volumes d'échantillons souvent faibles et stabilité d'échantillons réduites

Une validation analytique de bio-essais par **exploitation de l'erreur totale est recommandée** comme pour les essais physico-chimiques et repose:

- sur un **plan expérimental équilibré** (effets inter-série)
- un **développement de méthode rationnel** (AQbD)
- une étude de **robustesse basée sur une analyse de risque** (pour chaque méthode / procédure analytique)
- une **maîtrise du cycle de vie de la méthode**: *method life cycle management* (carte de contrôles)



Commission SFSTP AQbD 2026

La commission SFSTP Analytical Quality by Design (AQbD) souhaite combler ce manque et lance le Baromètre AQbD 2026, une analyse terrain représentative de la profession.

Objectifs.

Produire la première photographie factuelle de l'implémentation d'ICH Q14 sur le terrain européen;
Mesurer la proportion réelle de dossiers déposés avec une approche MODR;
Identifier les freins concrets qui ralentissent encore sa mise en œuvre.



[Baromètre AQbD 2026 Implémentation opérationnelle d'ICH Q14 sur le terrain](#)

USP trainings...

<https://www.usp.org/events-training/course/usp-1221-ongoing-procedure-performance-verification-live-webcast>



USP 1221 Ongoing Procedure Performance Verification (Live Webcast)

Event • Live Webcast MC • 4 hours • \$475.00 | 475.00 Training Units

Course Description:

This course provides an understanding of *USP* General Chapter <1221>, focusing on the principles and application of Ongoing Procedure Performance Verification (OPPV). Participants will learn how to ensure the reliable performance of analytical procedures during routine use by confirming their ability to consistently meet the requirements defined in the Analytical Target Profile (ATP) and deliver fit-for-purpose reportable results.

Through proactive monitoring of performance-related data and trends, the course emphasizes identifying potential issues early, implementing timely corrective actions, and prioritizing continuous improvement. By the end of the course, participants will be equipped with practical strategies to maintain analytical integrity and support robust quality systems.

Upon completion of this course, you will be able to:

- Verify that analytical procedures perform as expected, meet the Analytical Target Profile (ATP) or Critical Quality Attribute (CQA) requirements, and are fit for purpose.
- Collect and analyze performance data systematically to detect issues or adverse trends, enabling timely corrective actions and continuous improvement.
- Define and apply appropriate performance metrics for ongoing monitoring of analytical procedures.
- Identify and classify levels of precision to support reliable performance assessment.
- Develop and utilize control charts to monitor procedure performance effectively.
- Assess risk associated with decisions based on results generated by analytical procedures.

Who Should Participate:

Note: Participants taking this course must have 2-3 years experience in pharmaceutical analytics and/or quality control. It is highly recommended that participants complete eLearning: Analytical Procedure Life Cycle and Application of the AQBd Approach (CM-1220-01) prior to attending this course (CM-1221-01).

- Compendial Liaison
- QA manager
- QA staff
- QC chemist
- QC manager
- R&D
- Regulator
- Production Personnel



USP workshop...

<https://www.usp.org/events-training/analytical-instrument-and-system-qualification>

USP Workshop: Analytical Instrument and System Qualification (AISQ)

June 23, 2026 | June 26, 2026

A banner for the USP Virtual Workshop. The background is a blurred image of laboratory glassware. The text is white and orange. The USP logo is in the bottom right corner.

USP Virtual Workshop
Analytical Instrument and System Qualification (AISQ)
Tuesday, June 23 to Thursday, June 25, 2026 | 8:00 a.m to 2:45 p.m.

US Pharmacopeial Convention
12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852

usp®

Register

Agenda

Annexe

- **Traitement des éventuelles valeurs aberrantes:**
 - Deux approches de l'évaluation statistique des données aberrantes sont basées sur la réplication et sur le modèle.
 - APPROCHES BASÉES SUR LA RÉPLICATION
 - Lorsque des réplicats sont effectués, un critère de "variabilité supplémentaire" (EV : extra-variability) peut être utilisé pour détecter les valeurs aberrantes.

Annexe

- **Traitement des éventuelles valeurs aberrantes:**
 - APPROCHES BASÉES SUR LA RÉPLICATION
 - L'historique des données peut être analysé pour déterminer l'étendue de la variabilité généralement observée parmi les réplicats, et cette étendue peut être utilisée pour établir une étendue maximale qui pourrait signaler une valeur aberrante. Les mesures qui peuvent être utilisées sont l'étendue simple (valeur maximale moins valeur minimale), l'écart type, le CV ou le RSD entre les réplicats.

Annexe

- **Traitement des éventuelles valeurs aberrantes:**
 - APPROCHES BASÉES SUR LA RÉPLICATION
 - Si le dosage biologique présente une hétérogénéité de variabilité, les hypothèses de dispersion uniforme des données ne sont pas étayées. L'analyste peut alors utiliser un critère variable entre les niveaux de l'essai biologique, ou effectuer une transformation des données qui permette de retrouver une homogénéité de la variabilité

Annexe

- **Traitement des éventuelles valeurs aberrantes:**
 - APPROCHES BASÉES SUR LA RÉPLICATION
 - Dans une série de 2 réplicats, il ne sera pas toujours évident de savoir lequel des réplicats est aberrant, et lequel le laboratoire doit éliminer de la suite du traitement. Si plus de deux réplicats sont réalisés pour chaque dilution, le laboratoire peut choisir d'adopter une stratégie permettant d'identifier lequel des extrêmes peut être aberrant.
 - Il peut également choisir d'éliminer les données de la dilution de la suite du traitement.

Annexe

- **Traitement des éventuelles valeurs aberrantes:**
 - APPROCHES BASÉES SUR DES MODÈLES
 - Ces approches utilisent les résidus de l'ajustement d'un modèle approprié (par exemple, modèle de régression non paramétrique (lissage)).
 - Une alternative à l'élimination des données aberrantes consiste à utiliser des méthodes robustes qui sont moins sensibles à l'influence des observations aberrantes (par exemple, utilisation de la médiane plutôt que de la moyenne pour décrire le centre des données).

Questions Réponses



Philippe Le Mignot,
Président de la commission, **SFSTP**
Associate Director – CMC Analytical
R&D, **GSK Vaccines Belgique**



Nicolas Pointereau,
Responsable des opérations
analytiques, **QUALILAB**



Alexandra Cervantès,
Responsable Méthodes et Modèles
immunologiques
précliniques, **Virbac**



Elodie Ribert,
Head of Analytical Development
and Validation, **Clean Cells**



Isabelle Eynard,
Responsable R&D
Bioanalyse, **Virbac**



Jean-Marc Roussel,
Consultant en développement et
validation de méthodes
analytiques



Philippe Le Mignot

Président de la commission, **SFSTP**

Associate Director – CMC Analytical
R&D, **GSK Vaccines Belgique**

Contact philippe.x.lemignot@gsk.com

Validation des bio-essais



Philippe Le Mignot,
Président de la commission, **SFSTP**
Associate Director – CMC Analytical
R&D, **GSK Vaccines Belgique**



Nicolas Pointereau,
Responsable des opérations
analytiques, **QUALILAB**



Alexandra Cervantès,
Responsable Méthodes et Modèles
immunologiques
précliniques, **Virbac**



Elodie Ribert,
Head of Analytical Development
and Validation, **Clean Cells**



Isabelle Eynard,
Responsable R&D
Bioanalyse, **Virbac**



Jean-Marc Roussel,
Consultant en développement et
validation de méthodes
analytiques