

# **Chimie analytique II**

# Sommaire

<b>Méthode qualitative</b> .....	
<b>Méthode quantitative</b> .....	

<b>1. Démarche de validation</b> .....	
1.1 Expression du besoin (cahier des charges du client/prescripteur) .....	
1.2 Caractérisation.....	
1.2.1 Caractérisation par approche modulaire .....	
1.2.2 Approche globale versus approche par caractéristique par caractéristique.....	
1.2.3 Caractérisation absolue versus caractérisation relative .....	
1.2.4 Caractérisation intra-laboratoire versus interlaboratoires .....	
1.3 Validation.....	
<b>2. Caractérisation des performances des méthodes</b> .....	
2.1 Prérequis statistiques.....	
2.1.1 Données qualitatives .....	
2.1.1.1 Type de données .....	
2.1.1.2 Tableau de contingence.....	
2.1.2 Méthodes quantitatives .....	
2.2 Les supports de caractérisation .....	
2.2.1 Types de supports de caractérisation.....	
2.2.1.1 Qualité .....	
2.2.1.2 Représentativité .....	
2.2.2 Les supports de caractérisation « positifs » .....	
2.2.3 Les supports de caractérisation « négatifs » .....	
2.2.3.1 Les négatifs ou blancs .....	
2.2.3.2 Les analytes non cibles.....	
2.3 Caractéristiques de performance à déterminer selon le type de méthode.....	
2.4 Modalités pratiques de caractérisation .....	
2.4.1 Spécificité .....	
2.4.2 Sensibilité .....	

2.4.3	Fonction d'étalonnage/Efficacité (PCR)	.....
2.4.4	Linéarité.....	.....
2.4.5	Justesse .....	.....
2.4.6	Fidélité.....	.....
2.4.7	Répétabilité.....	.....
2.4.8	Fidélité intermédiaire .....	.....
2.4.9	Reproductibilité.....	.....
2.4.10	Exactitude.....	.....
2.4.11	Limites .....	.....
2.4.11.1	Limite de détection .....	.....
2.4.11.2	Limite de quantification .....	.....
2.4.12	Autres types de limites .....	.....
2.5	Outils de calculs pour la validation .....	.....
<b>3.</b>	<b>Adéquation de la performance et validation .....</b>	<b>.....</b>
3.1	La démarche.....	.....
3.2	Modèle de méthode d'analyse .....	.....
3.3	Rapport de validation.....	.....
<b>4.</b>	<b>Incertitude.....</b>	<b>.....</b>

**Méthode qualitative** : méthode qui, à partir d'une quantité déterminée d'échantillon, permet la mise en évidence de la présence d'un analyte et fournit une réponse en termes de présence/absence.

**Méthode quantitative** : méthode d'analyse qui mesure la quantité ou la fraction pondérale d'un analyte de manière à pouvoir l'exprimer sous forme de valeur numérique dans les unités appropriées.

## 1. Démarche de validation

La validation d'une méthode d'analyse correspond à une reconnaissance de son aptitude à satisfaire à l'usage attendu en routine. Elle s'effectue en confrontant des valeurs observées de ses caractéristiques de performance avec les valeurs des critères de validation pour les conditions dans lesquelles la méthode est utilisée. Le cas échéant, les caractéristiques de mise en œuvre pourront également être prises en compte pour la validation d'une méthode.

La démarche de validation repose donc sur 3 grandes étapes :

- la définition des critères de validation, ou caractéristiques de performance ciblées, en tant que traduction de l'expression des besoins du client/prescripteur ;
- la caractérisation de la méthode ;
- la validation *stricto sensu*.

### 1.1 Expression du besoin (cahier des charges du client/prescripteur)

Parmi les missions des laboratoires figure le développement ou l'optimisation de méthodes d'analyse et l'appui scientifique et technique.

Partant du principe que les méthodes (officielles) doivent être aptes à l'usage attendu en routine pour pouvoir être validées, la phase de concertation préalable entre le LNR et le prescripteur est une phase indispensable à la réussite de tout projet analytique. Il convient, lors de cette première étape, de définir précisément les attentes explicites et implicites du client, qui peuvent souvent se déduire de l'utilisation prévue pour la méthode. À titre d'exemples, on peut citer les méthodes suivantes :

- ✓ utilisées pour des analyses en gestion de foyers de maladies animales ou végétales, ou pour l'investigation de toxi-infections alimentaires, par des laboratoires de 1<sup>ère</sup> intention, et qui pourront être adaptées à ces usages si elles permettent d'obtenir des résultats rapides, de façon peu onéreuse, et si l'objectif est de pouvoir obtenir des résultats sur des grands nombres d'échantillons et rapidement afin de définir le périmètre d'infection ;
- ✓ utilisées à l'import, pour la détection d'un organisme nuisible de quarantaine non présent sur le territoire ; elles devront être les plus sensibles possible pour éviter l'introduction d'un organisme de quarantaine et donner des résultats relativement rapides pour permettre une libération des lots de marchandises consignées ;
- ✓ utilisées exclusivement pour des analyses de confirmation ou de caractérisation plus poussée des agents pathogènes, elles devront alors présenter les meilleures caractéristiques de performance possibles (telles que limite de détection ou quantification, sensibilité / spécificité), même si le coût analytique est élevé ou si la mise en œuvre requiert

un haut niveau de technicité dans les laboratoires de référence.

Ce travail de concertation entre le client/prescripteur et le prestataire vise donc à traduire les besoins du client / prescripteur en objectifs précis de performance de la méthode, notamment en ce qui concerne les taux de faux négatifs (sensibilité) et faux positifs (spécificité), limites de détection / quantification, exactitude acceptable *a priori*, et d'aboutir ainsi à la formalisation d'un « cahier des charges de la méthode ».

Toutefois, comme les exemples précédents ont pu le montrer, au-delà des caractéristiques de performance techniques, d'autres caractéristiques (rapidité, coûts, délais, simplicité...) entrent en ligne de compte dans la définition de l'aptitude d'une méthode à son usage. Cet usage peut d'ailleurs orienter le Laboratoire vers une méthode plus qu'une autre, dans un contexte où il est souvent amené à faire un choix et un compromis entre plusieurs caractéristiques (ex : sensibilité vs. spécificité).

Souvent, en se fondant sur sa connaissance du pathogène, de l'épidémiologie, le Laboratoire est en mesure de traduire les besoins de son commanditaire sans qu'une discussion formelle soit nécessaire. Dans ce cas, il est néanmoins recommandé que le Laboratoire obtienne un accord du commanditaire sur le « cahier des charges ». L'aptitude des méthodes à atteindre les limites et critères définis dans la réglementation constitue nécessairement un besoin implicite du prescripteur que constituent les autorités compétentes.

D'autres aspects peuvent être envisagés dans la revue de contrat comme les contraintes de délais, les ressources nécessaires et disponibles. Cependant, ils ne sont pas considérés dans ce guide.

## 1.2 Caractérisation

Plusieurs approches sont possibles mais l'évaluation des caractéristiques de performance est généralement réalisée « critère par critère » ou de façon « globale ». Il existe également la possibilité de faire une approche dite « modulaire », c'est-à-dire des validations par étapes du processus analytique, comme d'abord l'étape d'extraction puis l'étape de détection.

### 1.2.1 Caractérisation par approche modulaire

En règle générale, pour satisfaire aux besoins de son client, le laboratoire est amené à devoir caractériser un processus analytique dans son intégralité, i.e. depuis la réception de l'échantillon jusqu'au résultat final. Dans ce cas, la méthode couvre l'intégralité des étapes du processus analytique et la caractérisation portera sur ce périmètre (taux de faux positifs/négatifs, teneur en analyte,...).

Dans certains domaines et certains cas, il peut être intéressant de procéder à une caractérisation des étapes du processus de manière séparée. Cette approche sera particulièrement utile par exemple lorsque plusieurs analyses font appel à une même technique sur un même échantillon à la suite d'une étape de préparation commune. C'est l'approche dite « modulaire », au sens « par module » (Holst-Jensen and Berdal, 2004).

Par exemple, pour un échantillon, réaliser une extraction d'ADN de  $p$  prises d'essai, puis  $n$  PCR sur chaque extrait d'ADN : dans ce cas, le module « extraction » pourra être évalué / caractérisé spécifiquement avant évaluation / caractérisation de chaque système PCR pour ce type d'extrait.

À signaler que cette approche modulaire, pour tentante qu'elle soit, peut présenter des risques ; les étapes pouvant interagir, au sens des interactions rencontrées dans les plans d'expérience. Donc, dans l'hypothèse où un laboratoire applique ce type d'approche, il convient de procéder si possible

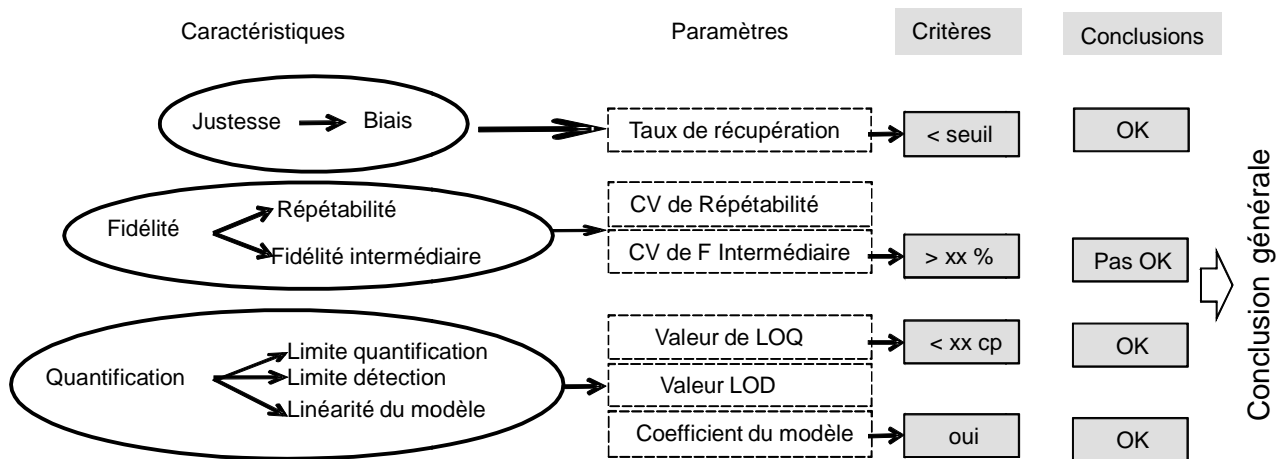
à une vérifier la compatibilité des modules entre eux et ainsi de valider globalement le processus analytique retenu.

### *1.2.2 Approche globale versus approche par caractéristique par caractéristique*

Ce document présente les modalités de détermination des caractéristiques de performance d'une méthode. Un plan d'expérience unique au laboratoire peut permettre la détermination simultanée de plusieurs caractéristiques de performance. La possibilité de les traiter séparément existe également.

Plusieurs textes réglementaires ou normatifs définissent une approche de caractérisation fondée sur des caractéristiques de performance et leurs valeurs limites, sans toutefois préciser les moyens pour obtenir ces caractéristiques. Cette approche consiste à traiter séparément chaque caractéristique et elle peut être qualifiée de méthodologie « caractéristique par caractéristique ». Des textes normatifs (des normes internationales) décrivent les approches statistiques utilisées pour estimer ces caractéristiques de performances.

La figure 1, ci-dessous, illustre une telle démarche :

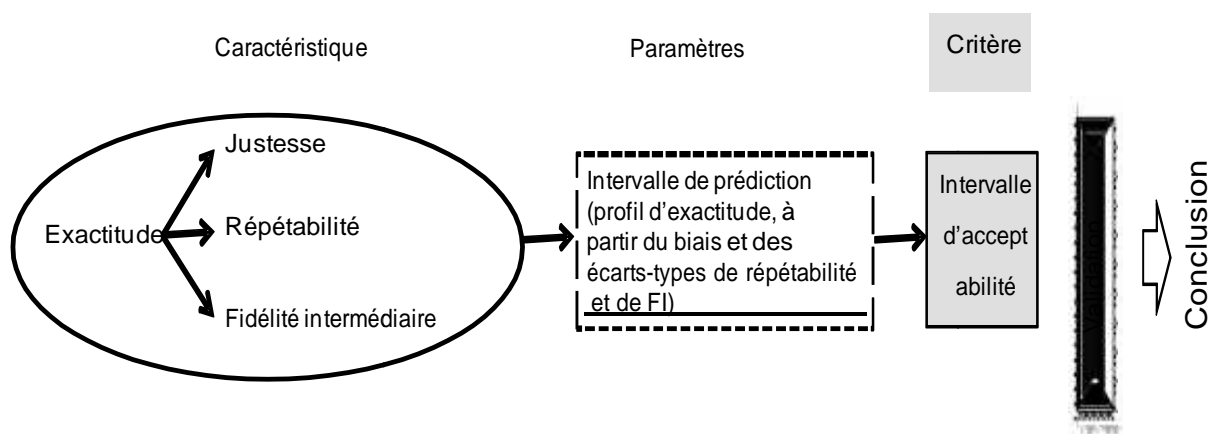


**Figure 1 - Illustration de la méthodologie de caractérisation des caractéristiques de performance étudiées séparément.**

(Communication personnelle de Max Feinberg, modifiée par le GT Val 2)

Cette approche fournit des informations intéressantes mais elle présente parfois comme inconvénient majeur de déboucher sur des conclusions contradictoires. Par exemple, certaines caractéristiques sont valides alors que d'autres ne le sont pas et il devient difficile de statuer sur la validation globale de la méthode analytique.

Par opposition, une caractérisation globale peut être réalisée sur une seule caractéristique de performance et la validité de la méthode sera statuée par rapport à un intervalle d'acceptabilité (figure 2). La caractéristique de performance majeure pour cette approche est l'exactitude. En effet, cette caractéristique est une combinaison de la justesse (erreur systématique) et de la fidélité (erreurs aléatoires). De plus, elle satisfait généralement à la demande du client qui veut un résultat le plus exact possible. D'un simple point de vue métrologique, on peut signaler la concomitance entre le concept d'exactitude et le paramètre bien connu d'incertitude.



**Figure 2 - Illustration de la méthodologie de caractérisation des caractéristiques de performance basée sur un critère unique.**

(Approche globale, communication personnelle de Max Feinberg modifiée par le GT Val 2)

Pour les méthodes quantitatives, il existe un outil qui permet graphiquement de vérifier l'adéquation de l'exactitude des niveaux étudiés et l'intervalle d'acceptabilité : le profil d'exactitude. Sa construction repose sur la détermination classique des paramètres de performance mais qui sont combinés pour faciliter la prise de décision sur la validité de la méthode. Le profil d'exactitude est un outil de prédiction pour la réalisation des mesures en routine, mais également un outil de diagnostic des sources d'erreurs à contrôler en routine.

Il est important de souligner que l'approche globale permet de prendre en compte la totalité des processus de la méthode, comme cela se passera en routine.

En parallèle, une approche globale peut être appliquée pour les méthodes qualitatives. Elle est fondée sur la limite ou la probabilité de détection (LOD / POD).

### *1.2.3 Caractérisation absolue versus caractérisation relative*

S'agissant plus spécifiquement du terme « relatif », cet adjectif est utilisé pour qualifier une caractéristique de performance d'une méthode dite alternative calculée par rapport à celle fournie par une méthode de référence et non par rapport à un statut connu des échantillons (approche déclinée pour les caractéristiques de performance concernés).

Note 1 : Lorsqu'une caractéristique de performance est calculée par rapport à celle d'une méthode de référence sur des échantillons de statuts incertains, les désaccords éventuellement observés entre les deux méthodes ne sont pas nécessairement liés à des inexactitudes de la méthode alternative ; le calcul de caractéristiques de performance relatives peut pénaliser des méthodes plus performantes que la méthode de référence en vigueur.

Note 2 : Les calculs de sensibilité / spécificité sont fondés sur des pourcentages de concordance entre les résultats attendus avec la méthode de référence et les résultats obtenus. Il est possible de vérifier que la distribution des valeurs observées n'est pas purement aléatoire à l'aide de tests statistiques.

### *1.2.4 Caractérisation intra-laboratoire versus interlaboratoires*

La méthodologie de la caractérisation des critères de performance d'une méthode comporte deux étapes qui peuvent être effectuées l'une à la suite de l'autre, ou une seule en fonction des objectifs et, le cas échéant, du degré d'urgence de la validation.

La première étape est normalement de caractériser au niveau intra-laboratoire les paramètres de performance de la méthode à évaluer : la sensibilité (relative), la spécificité (relative), l'exactitude (relative), la limite de détection (relative), la fidélité (répétabilité, reproductibilité intra-laboratoire = fidélité intermédiaire).

La seconde étape repose sur l'organisation d'un essai inter-laboratoires pour vérifier les paramètres de performance obtenus en intra-laboratoire et tester également la reproductibilité, et selon les besoins d'autres caractéristiques telles que la robustesse de la méthode, certaines composantes de sa « délégabilité » ou « transférabilité » (ex : facilité d'utilisation)...

D'autres paramètres et critères de performance (coût, durée, justesse...) peuvent également être calculés en fonction des besoins du client.

## **1.3 Validation**

L'étape de validation consiste à confronter les valeurs des paramètres de performances obtenues pour les caractéristiques étudiées, soit par critère, soit de manière globale aux critères de validation prédéterminés tels que définis lors de la revue de contrat.



## 2. Caractérisation des performances des méthodes

Selon les méthodes analytiques étudiées, quantitatives ou qualitatives, il sera associé, à chaque caractéristique de performance, un ou des paramètres qui seront l'expression de la grandeur à estimer à partir de la série de mesures. Par exemple, la justesse aura pour paramètres le biais ou le taux de recouvrement ; la fidélité sera exprimée par un écart-type ou un coefficient de variation.

Note : Les valeurs des caractéristiques de performance peuvent varier selon le plan d'expérience appliqué et la méthode utilisée pour la calculer. Il convient donc, dans tout rapport de caractérisation (ou dans les publications rédigées), de bien préciser le plan d'expérience et la méthodologie de calcul.

### 2.1 Prérequis statistiques

Les analyses statistiques et en particulier l'utilisation de tests statistiques requièrent des hypothèses fondamentales sur les variables observées. Ce chapitre décrit les hypothèses de bases pour les variables utilisées dans les méthodes quantitatives et qualitatives. Il couvre également les notions nécessaires à la réalisation des plans d'expériences.

Note : les échantillons utilisés pour la caractérisation des performances des méthodes doivent être préparés de façon indépendante.

#### 2.1.1 Données qualitatives

##### 2.1.1.1 Type de données

Dans le domaine des méthodes d'analyses qualitatives, deux types de variables sont rencontrés : les variables qualitatives nominales et les variables qualitatives ordinales.

Les variables qualitatives nominales sont des variables qualitatives dont la modalité ne permet pas de connaître la modalité suivante. Par exemple, les variables présence / absence, ou les variables +/-, sont des variables qualitatives nominales.

Les variables qualitatives ordinales ou les variables « semi-quantitatives », sont des variables qualitatives ordonnées. La modalité permet de connaître la modalité suivante. Par exemple, une classification 0, 1, 2, 3 ou bien une variable issue de dilution 1/256, 1/128, 1/64, 1/32, 1/16 sont des variables qualitatives ordonnées.

Ces variables n'ont pas de loi de distribution, et de façon classique, il est recommandé, quand cela est possible, de les transformer en variable quantitative discrète ou continue, par exemple en nombre de présents ou absents, en pourcentages etc. Après transformation, les hypothèses de normalité, indépendance et homogénéité des variances sont applicables.

##### 2.1.1.2 Tableau de contingence

Le calcul de certaines caractéristiques de performance des méthodes qualitatives fait appel aux notions d'accords / désaccords positifs et négatifs. Ces notions sont matérialisées par un tableau de contingence (tableau 1).

**Tableau 1 - Synthèse des résultats obtenus sous forme de tableau de contingence.**

		Statut de l'échantillon	
		Positif	Négatif
Résultat donné par la méthode à caractériser	Positif	PA = accords positifs = vrais positifs	PD = déviations positives = faux positifs
	Négatif	ND = déviations négatives = faux négatifs	NA = accords négatifs = vrais négatifs
Sommes		N+	N-

### 2.1.2 Méthodes quantitatives

Trois hypothèses doivent être respectées quand les variables sont quantitatives continues (concentration, quantité, valeur de Ct, logarithme du nombre d'unité formant colonie, réponse instrumentale...) : normalité, indépendance, homogénéité des variances.

## 2.2 Les supports de caractérisation

### 2.2.1 Types de supports de caractérisation

Les supports de caractérisation comprennent les témoins positifs, les témoins négatifs, les matériaux de référence ou tout autre échantillon utilisé pour caractériser la méthode.

Les valeurs calculées pour les différentes caractéristiques d'une méthode et donc les conclusions de la validation sont directement liées au choix des supports utilisés pour réaliser l'étude de caractérisation. C'est pourquoi le choix de ces supports doit être judicieusement déterminé selon leur qualité et représentativité.

#### 2.2.1.1 Qualité

Les matériaux de référence utilisés pour la caractérisation des méthodes doivent être de qualité adaptée, et leurs qualités intrinsèques connues. Ainsi, de manière générale, dans la mesure où ils existent et sont accessibles, le laboratoire utilisera par ordre de préférence des matériaux de référence certifiés externes, des matériaux de référence externes (par exemple issus d'études interlaboratoires) ou internes ou des échantillons de statut connu.

Rappel de définitions (issues du glossaire) :

- ✓ Matériau de référence (MR) : Matériau, suffisamment homogène et stable quant à une ou plusieurs propriétés spécifiées, qui a été préparé pour être adapté à son utilisation prévue dans un processus de mesurage.
- ✓ Matériau de référence certifié (MRC) : matériau de référence caractérisé par une procédure métrologiquement valide applicable à une ou plusieurs propriétés spécifiées et accompagné d'un certificat qui donne la valeur de la propriété spécifiée, son incertitude associée, et une expression de la déclaration de traçabilité métrologique.

Note : Les matériaux biologiques peuvent être issus des collections internationales ou nationales.

- ✓ Matériau de référence externe (MRE) : matériau de référence dont la (les) valeur(s) de consensus a (ont) été déterminée(s) à la suite d'études interlaboratoires.
- ✓ Matériau de référence interne (MRI) : matériau de référence dont la valeur de référence est attribuée par l'utilisateur : par comparaison aux valeurs certifiées ou aux valeurs de consensus des MRC ou MRE; par ajout d'une quantité connue de l'analyte à la matrice exempte de cet analyte.

Note : Par extension, sont inclus dans cette catégorie les échantillons de routine dont le statut a été précédemment déterminé par une ou plusieurs méthodes.

#### Remarques :

- (1) Des supports de statut inconnu peuvent également dans certains cas être utilisés lors d'études de caractérisation mais sont théoriquement réservés aux études réalisées par comparaison (ex : méthode alternative à une méthode de référence).
- (2) Le laboratoire doit intégrer la portée et les limites des certificats des matériaux utilisés. À titre d'exemple, dans le domaine des OGM, les témoins positifs sont certifiés pour une cible et un certain pourcentage mais non certifiés pour l'absence d'autres cibles, ce qui peut entraîner des problèmes de spécificité lors des tests de caractérisation.
- (3) Il existe aussi des contrôles qualité internes constitués de la prise d'essai à analyser préparée spécifiquement et uniquement pour une série analytique. Ce type d'échantillon ne nécessite pas obligatoirement d'étude de stabilité et d'homogénéité. La valeur cible peut être la valeur nominale de la supplémentation.

#### 2.2.1.2 Représentativité

Comme toute étude statistique, une étude de caractérisation ne peut pas nécessairement porter sur tous les objets / individus... du domaine d'application souhaité et étudié. Les supports de comparaison, en tant qu'échantillons au sens statistique du terme, devront donc être choisis (nature, caractéristique, concentration) afin d'être les plus représentatifs possibles des matrices à analyser de sorte que les conclusions dressées à l'issue de la caractérisation soient valides pour l'ensemble du domaine de validation (voir ci-dessous supports de comparaison « positifs » et « négatifs »).

Dans le cas des études de caractérisation, en revanche, la représentativité des échantillons n'est souvent pas basée sur un tirage aléatoire au sein de la population d'étude mais selon des critères de choix (stratification).

ex :

- prendre des eaux plates et gazeuses pour étudier les eaux embouteillées ;
- prendre des espèces représentatives au sein d'un genre (bactérien, animal, végétal,...)
- ...

#### 7.2.2 Les supports de caractérisation « positifs »

Les supports de comparaison « positifs » sont ceux choisis pour leur propriété connue (ou supposée) de contenir l'analyte cible. Deux cas sont à considérer :

- o les matrices naturellement contaminées ;

- o les matrices (blanches ou non : voir ci-dessous) supplémentées d'une quantité connue (si possible) de l'analyte.

Lors d'études de caractérisation, les matrices naturellement contaminées seront généralement privilégiées mais les secondes seront envisagées dès lors que les premières ne sont pas disponibles.

Par ailleurs, plus les sources de variabilité (analyte, matrice...) sont importantes plus il faut augmenter le nombre d'échantillons. Pour une variabilité liée à l'analyte, 10 échantillons positifs au minimum sont en général requis. Toutefois dans le cas d'analytes dont les échantillons sont rares, ce nombre pourra être réduit sans toutefois pouvoir être nul. Pour une variabilité liée aux matrices, il est recommandé de tester des matrices d'origines biologiques différentes.

Lorsque plusieurs échantillons de référence sont disponibles, le laboratoire les choisira de manière à avoir la plus grande variabilité intra spécifique possible : origines géographiques variées, plantes hôtes différentes, dates de prélèvements éloignées etc.

### *2.2.3 Les supports de caractérisation « négatifs »*

#### *2.2.3.1 Les négatifs ou blancs*

La notion de blanc, d'échantillon témoin et de témoins négatifs est définie dans de nombreuses lignes directrices, de référentiels européens ou nationaux et dans des réglementations. Dans la norme NF ISO T90-210 (2009), la définition du blanc est la suivante : « essai réalisé en l'absence de matrice (blanc réactif) ou sur une matrice qui ne contient pas l'analyte (blanc matrice). Il est indispensable que le laboratoire précise de quel blanc il s'agit ». Cette définition précise l'existence de plusieurs types de blanc : le blanc réactif et le blanc matrice.

À ces deux types de blanc, il convient d'en ajouter un troisième : le « blanc instrumental » résultant du bruit de fond de l'appareillage utilisé.

L'estimation du blanc est primordiale car il est souvent utilisé pour déterminer la limite de détection selon le domaine analytique. Dans ce cas, le blanc utilisé est le blanc matrice et à défaut le blanc réactif.

Note 1 : Dans certains cas, il n'est pas possible d'avoir de « vrai » blanc, c'est-à-dire un blanc ayant un bruit de fond négligeable lié à la présence du contaminant étudié (chimique, microbiologique, etc.).

Note 2 : Dans certains types de méthodes, l'appareil utilisé définit un bruit de fond (exemple : PCR temps réel et baseline, absorbance pour le « témoin tampon »...); il appartient à l'utilisateur de préciser si la valeur de ce dernier doit être retirée ou non des mesures pour les échantillons.

#### *2.2.3.2 Les analytes non cibles*

Les analytes non cibles sont également des supports de caractérisation « négatifs » au sens où ils ne contiennent pas l'analyte cible et donc que la réponse attendue avec la méthode caractérisée est négative. Ils se distinguent des « blancs » précédemment définis par le fait qu'ils contiennent un ou plusieurs analytes distincts de celui ou ceux étudiés mais dont l'interférence éventuelle avec le test doit être évaluée (cf. spécificité).

*Critères de choix des analytes non cibles :*

Les échantillons seront choisis de façon à ce que les analytes soient le plus proche possible de l'analyte cible (même sous-genre, genre ou famille). Le plus grand nombre possible d'analytes proches sera testé. Les analytes les plus éloignés mais susceptibles d'être rencontrés fréquemment dans les conditions de prélèvement (par exemple mêmes espèces hôtes, même marchandise, même région géographique...) seront également sélectionnés.

Pour chaque analyte proche, plusieurs échantillons seront testés si possible, en retenant les mêmes critères de choix que pour les échantillons positifs.

### 2.3 Caractéristiques de performance à déterminer selon le type de méthode

Les caractéristiques de performance des méthodes qualitatives et quantitatives sont résumées dans le tableau 2. Ces caractéristiques ne doivent pas être systématiquement étudiées et documentées mais l'absence d'une ou plusieurs caractéristiques doit être justifiée dans le rapport de caractérisation et de validation de méthode d'analyse.

Tableau 2 - Caractéristiques de performance à déterminer pour les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives.

Étape du processus de validation	Caractéristique		Caractéristique de performance à déterminer en fonction du type de méthode	
			Qualitative	Quantitative
Caractérisation Intra labo	Spécificité		X	X
	Sensibilité		X	(X)
	Fonction d'étalonnage/efficacité (PCR)			X
	Fidélité	Répétabilité	(X)	X
		Fidélité intermédiaire	X	X
	Justesse		sans objet	X
	Exactitude (justesse + fidélité) <sup>a</sup>		sans objet	X
	Linéarité		sans objet	X
	Limite de	quantification	sans objet	X
		détection	X	(X)
Domaine de validité		X	X	
Caractérisation interlaboratoires	Reproductibilité		X	X
	Répétabilité		(X)	X
	LOD		(X)	sans objet
	LOQ		sans objet	(X)
	Spécificité <sup>b</sup>		X	sans objet
	Sensibilité <sup>c</sup>		X	sans objet
	Autres caractéristiques non techniques à définir selon les points critiques et le cahier des charges (délai, rapidité, efficacité, coût .....)		X	X

sans objet : caractéristique non pertinente (x) : les caractéristiques inscrites entre parenthèses sont recommandées.

a : pour les méthodes analytiques quantitatives, l'exactitude représente toujours la combinaison de la justesse et de la fidélité.

b : ou taux de faux positifs dans certains référentiels

c : ou taux de faux négatifs dans certains référentiels

Note : les caractéristiques listées dans le tableau ci-dessus sont au minimum requises pour une caractérisation complète de la méthode. Toutefois, selon les référentiels applicables au domaine concerné, d'autres caractéristiques pourront être exigées (ex : robustesse, exactitude relative,...).

Note : si la méthode doit être appliquée à un ensemble de matrices et que les critères de validation n'ont pas été atteints pour la totalité des matrices alors le laboratoire peut conclure en proposant une aptitude de la méthode dans un domaine de validité plus restreint que celui initialement envisagé (domaine de validation).

Le domaine d'application « possible » est défini à partir du domaine de validité et par la justification de la représentativité des supports de caractérisation par rapport à l'ensemble des matrices sur laquelle la méthode sera appliquée. Ce domaine d'application possible issu de l'étude de caractérisation / validation est ensuite utilisable comme étant celui de la méthode rédigée et proposée (voir modèle de méthode – ANSES/PR3/7/01-04). Les laboratoires utilisateurs de cette méthode devront la mettre en œuvre dans le domaine d'application établi.

Les caractéristiques de performance non techniques font également partie de la décision finale pour la validation de la méthode. En effet la facilité de la mise en œuvre, la faisabilité et l'efficacité sont des caractéristiques qui sont à prendre en compte.

## **2.4 Modalités pratiques de caractérisation**

### *2.4.1 Spécificité*

La spécificité d'une procédure analytique quantitative est la capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents. Une procédure d'analyse est dite « spécifique » lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser ou qu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physico-chimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substance(s) dans l'échantillon.

Selon cette définition, il s'agit bien de démontrer que la ou les substance(s) quantifiée(s) au sein de la matrice sont bien le ou les analyte(s) recherché(s). Très souvent, la spécificité se fonde sur une absence d'interférences. Elle peut être démontrée par différents moyens. C'est ainsi qu'elle peut être inhérente à la technique (par exemple : identification par spectrométrie infrarouge ou spectrométrie de masse), elle peut être obtenue par séparation préalable (par exemple : chromatographie), de façon mathématique (par exemple : résolution d'équations simultanées) ou de façon biochimique (réactions à l'aide d'enzymes).

Dans le domaine des méthodes qualitatives, deux types de spécificité sont classiquement définis : la spécificité analytique et la spécificité diagnostique. La différence entre ces deux spécificités repose sur l'origine du support utilisé. Pour la spécificité analytique, les supports sont des supports de référence et pour la spécificité diagnostique, les supports sont issus du terrain. Dans le domaine de la microbiologie des aliments, le terme « exclusivité » est également utilisé quand le calcul est réalisé sur des souches pures, et le terme « spécificité » est utilisé lorsqu'il est réalisé sur des supports de type aliments.

La spécificité correspond au pourcentage de résultats négatifs trouvés parmi les négatifs attendus. Les calculs sont fournis dans l'annexe « Spécificité ».

Dans tous les cas, la spécificité vise à évaluer la capacité de la méthode soumise à validation à ne pas donner de réponse quand la cible n'est pas présente.

#### *2.4.2 Sensibilité*

Comme pour la spécificité, deux types de sensibilité sont généralement définis : la sensibilité analytique et la sensibilité diagnostique. La différence entre ces deux sensibilités repose là-encore sur l'origine du support utilisé. Pour la sensibilité analytique, les supports sont des supports de référence et pour la sensibilité diagnostique, les supports sont issus du terrain. Dans le domaine de la microbiologie des aliments, le terme « inclusivité » est utilisé quand le calcul est réalisé sur des souches pures, et le terme « sensibilité » est utilisé lorsqu'il est réalisé sur des supports de type aliments.

La sensibilité correspond au pourcentage de résultats positifs trouvés parmi les résultats positifs attendus. Les calculs sont fournis dans l'annexe « Sensibilité ».

Dans tous les cas, la sensibilité vise à évaluer la capacité de la méthode soumise à validation à donner une réponse positive quand la cible est présente.

#### *2.4.3 Fonction d'étalonnage/Efficacité (PCR)*

Pour un grand nombre de méthodes quantitatives, la quantification se fait à l'aide d'une fonction étalonnage. C'est un élément important de la mesure car la fonction d'étalonnage doit être établie de façon exacte et doit permettre de sélectionner un modèle d'étalonnage qui sera utilisé en routine. Le modèle doit décrire au mieux la relation entre la variable dépendante Y, généralement une réponse instrumentale, et la variable X qui représente la quantité d'analyte et qui est une variable indépendante génératrice de la réponse Y.

#### *2.4.4 Linéarité*

Le terme « linéarité » concerne la relation entre les concentrations calculées à l'aide de la fonction d'étalonnage et les concentrations théoriques. Il peut exister une confusion car la linéarité peut aussi être évaluée pour la fonction d'étalonnage lorsqu'il s'agit d'un modèle linéaire. Dans le contexte de la validation, l'étude de la linéarité porte sur la proportionnalité entre les concentrations calculées par la fonction d'étalonnage et les concentrations théoriques. L'étude de la linéarité est en fait une évaluation du biais de justesse.

#### *2.4.5 Justesse*

La justesse exprime la différence entre un ensemble de valeurs mesurées à l'infini et une valeur de référence. La vraie valeur de la justesse est déterminée par rapport à un matériau de référence certifié (MRC). Dans le cas d'absence de MRC, une valeur qui est acceptée comme une valeur conventionnellement vraie peut être utilisée.

La justesse est étudiée pour chaque niveau de concentration avec ou sans la matrice. Ces niveaux sont communément appelés « standards de validation ». Il existe plusieurs modes d'expression de

la justesse car le paramètre de validation qui la caractérise est le biais, qui peut être exprimé de façon absolue ou relative.

#### 2.4.6 Fidélité

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'essai d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. La fidélité peut être évaluée à trois niveaux (figure 3) : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra-laboratoire) et la reproductibilité (interlaboratoires).

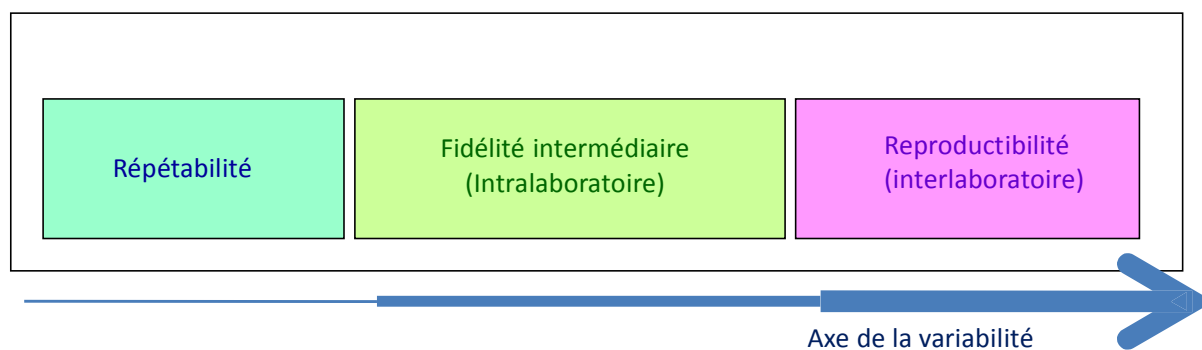


Figure 3 - Composantes croissantes de la variabilité : répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité.

La fidélité traduit uniquement la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée. La mesure de fidélité est calculée à partir de l'écart-type des résultats d'essais et peut être exprimée sous forme de coefficient de variation (CV).

Il convient si possible d'étudier simultanément la répétabilité et la fidélité intermédiaire, même si ces caractéristiques sont décrites séparément dans les normes, réglementations ou référentiels.

#### 2.4.7 Répétabilité

La répétabilité est définie par les conditions de répétabilité qui regroupent les facteurs intra-séries (mêmes conditions opératoires, dont même technicien, et court intervalle de temps entre les répétitions). Il est nécessaire d'avoir des répétitions par niveau pour identifier et quantifier les sources d'erreur. Le nombre de répétitions minimal par niveau est de 2, mais il peut être porté à 3 si le nombre de niveaux étudiés est faible ( $n \leq 3$ ).

Le nombre de séries et le nombre de répétitions par niveau sont liés et dépendent de la variabilité de la méthode. De plus, si la variabilité issue de la répétabilité est faible par rapport à celle générée par la fidélité intermédiaire, le plan d'expérience devra, par exemple, inclure plus de séries et simplement un nombre minimal de 2 répétitions par niveau. Selon les domaines, le nombre de répétitions et le nombre de séries peuvent être définis dans des lignes directrices, normes ou réglementations.

Une étude pilote ou de pré-validation est conseillée pour pouvoir optimiser le plan expérimental en fonction des sources de variations.



#### 2.4.8 Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire (appelée reproductibilité intra-laboratoire en microbiologie des aliments, cf. ISO/TS 19035 sur l'incertitude de mesure) est estimée par la répétition des séries, afin de pouvoir quantifier la contribution de cette source d'erreur sur la variabilité totale (maximiser les sources de variations dans un même laboratoire, dont différents techniciens, pour effectuer les répétitions). Le nombre minimal de séries est de 3, quel que soit le nombre de niveaux étudiés.

Le nombre de séries et le nombre de répétitions par niveau sont liés et dépendent de la variabilité de la méthode. Selon les domaines, le nombre de répétitions et le nombre de séries peuvent être définis dans des lignes directrices, normes ou réglementations.

Une étude pilote ou de pré-validation est conseillée pour pouvoir optimiser le plan expérimental en fonction des sources de variations.

#### 2.4.9 Reproductibilité

L'étude de la reproductibilité permet de caractériser la variabilité totale incluant la variabilité liée aux laboratoires utilisant la méthode. Cette caractérisation se fait au moyen d'un essai inter-laboratoires de validation. Il ne faut pas confondre ce type d'essai inter-laboratoires avec un essai inter-laboratoires d'aptitude qui permet d'évaluer l'aptitude des laboratoires. Les six fascicules de la norme NF ISO 5725 décrivent les processus et les calculs statistiques à mener.

#### 2.4.10 Exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur vraie ». L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématiques et aléatoires, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la combinaison de la justesse et de la fidélité. De ce fait, c'est la caractéristique de performance majeure qui est étudiée dans une approche globale.

Cette étude peut se faire par l'utilisation d'un outil graphique qui repose sur une approche statistique fondée sur le calcul d'un intervalle de dispersion. Cet outil est le profil d'exactitude et il permet de statuer sur la validation de la performance de la méthode.

#### 2.4.11 Limites

Les limites de détection (LOD) et/ou de quantification (LOQ) sont des valeurs systématiquement rapportées dans les dossiers de validation. Les définitions sont nombreuses et il en a été recensé plus d'une cinquantaine (Currie, 2004).

#### 2.4.11.1 Limite de détection

De nombreuses réglementations, lignes directrices ou normes proposent des méthodes d'estimation de la LOD. Toutefois, toutes visent à déterminer la limite en-dessous de laquelle l'analyte est considéré comme « non détecté ». Pour ce faire, toutes se fondent sur l'analyse d'échantillons contenant l'analyte à différents niveaux de concentration, mais des différences portent sur :

- le nombre de niveaux (1, 3, 5...) et de répétitions par niveaux (3, 6, 10, 60...);
- le critère de décision, notamment la probabilité de détection associée ou son intervalle de confiance :  $LOD_{50\%}$ ,  $LOD_{95\%}$ ,
- les modalités d'exploitation des résultats issus de ces plans d'expérience avec des interprétations :
  - o fondées sur le ratio entre le nombre de répétitions donnant une réponse positive et le nombre total de répétitions, par niveau : ex : 10+/20 ;
  - o graphiques fondées sur une modélisation de la probabilité de détection en fonction de la concentration de l'analyte (ex : POD).

Dans tous les cas, il convient qu'un laboratoire amené à déterminer une LOD pour une méthode, précise les modalités selon lesquelles la valeur a été obtenue et la probabilité de détection associée.

Note 1 : Pour les méthodes qualitatives, en l'absence de réglementation, lignes directrices ou de norme applicable au domaine analytique considéré, le GT propose de calculer la LOD selon la norme NF EN ISO16140-2, utilisant l'approche fondée sur la probabilité de détection (POD, modèle linéaire généralisé).

Note 2 : Pour les méthodes quantitatives, en l'absence de réglementation, lignes directrices ou de norme applicable au domaine analytique considéré, le GT propose d'utiliser préférentiellement soit une méthode de calcul de la LOD fondée sur le rapport signal sur bruit ou bien une estimation à partir de la fonction d'étalonnage.

#### 2.4.11.2 Limite de quantification

Il n'existe pas de définition précise de la limite de quantification (LOQ). Généralement, la LOQ représente la plus faible concentration dans un échantillon qui puisse être quantifiée avec une fidélité et une justesse acceptables dans des conditions expérimentales indiquées.

Comme pour la LOD, les critères de justesse et de fidélité retenus pour fixer cette valeur de LOQ doivent être clairement définis (ex : CV de répétabilité <25% et biais / erreur de justesse <30%...). La valeur peut être déduite à partir de l'approche globale fondée sur le profil d'exactitude, ou par l'estimation sur une plage d'étude de ces deux caractéristiques séparément.

*Remarque :* dans certains domaines, la LOQ est calculée à partir du rapport signal sur bruit et exprimée comme un multiple de l'écart-type signal/bruit.

En l'absence de réglementation, de lignes directrices ou de norme dans le domaine analytique considéré, le GT propose de calculer la LOQ préférentiellement par une approche globale (profil d'exactitude).

#### 2.4.12 Autres types de limites

En fonction des référentiels et des réglementations d'autres limites peuvent être exigées. Par exemple la décision CE/2002/657 introduit deux limites à documenter dans le cadre des résidus de médicaments vétérinaires : la limite de décision  $CC\alpha$  et la capacité de détection  $CC\beta$  :

- 1) La limite de décision ( $CC\alpha$ ) est la limite à partir de laquelle il peut être décidé si un échantillon est réellement non conforme avec un risque d'erreur  $\alpha$ .
- 2) La capacité de détection ( $CC\beta$ ) est la plus petite concentration qui puisse être détectée, identifiée et/ou quantifiée avec un risque d'erreur  $\beta$ .

### 2.5 Outils de calculs pour la validation

De nombreux outils sont disponibles pour effectuer les calculs statistiques. L'utilisation de logiciels statistiques commerciaux (SAS, Statgraphics, Systat...) ou en accès libre (ex : R) est possible pour faire les analyses et les graphiques basiques (Boxplot, comparaison de moyenne (test de Student, Anova...), comparaison de variances (test de Fisher, Bartlett, Levène, Cochran, Grubbs, Dixon ...), les calculs d'intervalle de confiance... Il existe également des logiciels intégrés dédiés à la validation.

Il est également possible d'utiliser des feuilles de calcul du logiciel Microsoft Excel. Des feuilles ont été développées pour le calcul du profil d'exactitude (feuille associée à la norme NF V 03-110) ou pour le calcul de LOD pour les méthodes qualitatives

(<http://www.wiwiss.fu-berlin.de/fachbereich/vwl/iso/ehemalige/wilrich/index.html>).

Si des feuilles de calcul sont développées en interne, le GT rappelle que ces feuilles doivent être validées sur le plan statistique (calculs) mais également sur le plan informatique (environnement...) et sur le plan qualité (traçabilité).

## 3 Adéquation de la performance et validation

### 3.1 La démarche

L'étape finale est la comparaison des valeurs de performance obtenues par la méthode aux critères de performance prédéterminés. Pour conclure sur les différentes caractéristiques de performance, il est proposé de faire une synthèse tabulaire (tableau 3) et de fournir une conclusion sur la validité du critère.

Tableau 3 - Synthèse tabulaire des caractéristiques de performances, de leurs valeurs prédéterminées, de leurs valeurs obtenues et de la décision sur leur validité.

Caractéristique de performance (Paramètre)	Valeur cible prédéterminée (cahier des charges)	Valeur obtenue à l'issue de la caractérisation	Conclusion (OK, domaine d'application à revoir...)

Afin de globaliser la démarche, un modèle commun de présentation de méthode et un rapport de caractérisation et de validation / vérification sont proposés.

### 3.2 Modèle de méthode d'analyse

Un modèle de méthode d'analyse a été développé simultanément à la rédaction du présent guide. Ce modèle est accompagné d'un guide qui fournit des indications utiles pour son utilisation. Fondé sur les normes en la matière (norme ISO 78-2 notamment), ce modèle permet d'identifier la méthode, d'en fournir un descriptif (domaine d'application, réactifs, appareillage, type d'échantillons etc.), de détailler son mode opératoire, de préciser les résultats sur ses performances ainsi que des préconisations pour sa mise en œuvre.

De plus, ce modèle prévoit d'assurer la traçabilité de l'historique de la méthode, en répertoriant les versions successives et en distinguant le niveau des modifications effectuées sur les différentes versions, en mineures ou majeures.

### 3.3 Rapport de validation

Une trame de rapport de validation de méthode a également été élaborée en lien avec le présent guide. Cette trame comporte sept paragraphes et la possibilité d'intégrer des annexes. Les paragraphes permettent de :

- décrire la méthode, le domaine d'application et les critères de performance cibles ;
- décrire les résultats pour les différentes caractéristiques étudiées, pour des caractérisations intra ou inter-laboratoires ;
- fournir une incertitude de mesure, une conclusion sur la validation de la méthode et une bibliographie associée.

## 4. Incertitude

La norme NF EN ISO/CEI 17025 prévoit que les laboratoires d'étalonnage ou d'essais doivent disposer de procédures permettant d'estimer l'incertitude. Si le guide EURACHEM propose une procédure de détermination de l'incertitude, elle reste assez complexe et il convient de l'adapter à chaque domaine de la chimie et, en particulier, en utilisant les données issues de la mesure de la performance des méthodes. L'estimation de l'incertitude va au-delà du calcul d'un intervalle (de confiance ou de répartition) car toutes les sources d'erreurs doivent être prises en compte.

Dans le domaine de la microbiologie des aliments, il existe une approche normative (XP CEN/ISOTS 19036) pour calculer l'incertitude de mesure pour les analyses quantitatives.

La première étape est de définir le mesurande, en portant une attention particulière sur le processus de calcul qui va permettre de passer à la deuxième étape qui est l'identification des sources d'incertitudes.

En utilisant le principe du diagramme général des causes et effets de type Ishikawa, les principales sources peuvent être regroupées en 5 modalités ou règle des 5 M : Main d'œuvre, Moyen, Milieu, Matière, Méthode. Le diagramme est présenté sur la figure 4.

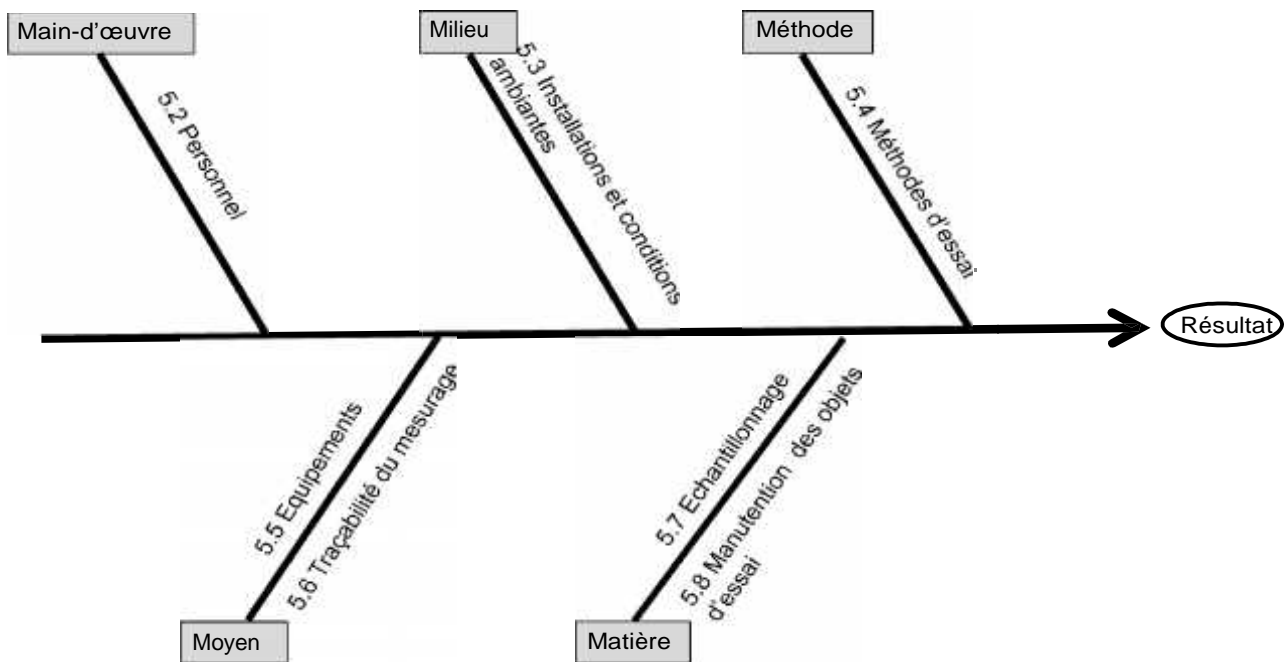


Figure 4 - Principales sources d'incertitudes et chapitres correspondants dans la norme NF EN ISO/CEI 17025.

(D'après Max Feinberg, 2009, modifié par le groupe GT Val 2)

En ce qui concerne la main d'œuvre, il faut considérer tout ce qui est lié aux opérateurs, ou tout personnel intervenant dans ou sur le processus de réalisation de la méthode d'analyse. La source d'erreur concernant les moyens intègre les équipements de mesure, la pureté des réactifs, etc. Pour ce qui concerne le milieu, il faut prendre en compte les installations mais également une partie aléatoire. Les principales sources d'erreur dans la matière sont à la fois dues à des erreurs dans l'échantillonnage, mais également dans les conditions de conservation ou toute autre source liée à l'échantillon (variation biologique, etc.). Enfin, pour ce qui concerne la méthode, les sources d'erreur doivent inclure l'ensemble des facteurs inhérents à la méthode : préparation de l'échantillon, matériel de laboratoire (ex : verrerie), stœchiométrie des réactions, processus de calcul, correction du blanc, etc.

L'étape 3 consiste à quantifier l'incertitude à partir des sources identifiées. Le principe de base est de quantifier l'incertitude par un ou des écarts-types qui sont appelés incertitudes-types et notés  $u$ . Les sources d'erreur étant généralement multiples, l'incertitude globale appelée incertitude type composée correspond à la combinaison de l'ensemble des sources d'erreur. Par convention, elle est notée  $u_c$ .

Deux modes d'estimation de l'incertitude type sont décrits dans le guide pour l'expression de l'incertitude de mesure (GUM) :

- l'approche dite de type A, approche statistique basée sur une série d'observations,
- l'approche de type B, basée sur des approches probabilistes.

#### *Approche de type A :*

Les données qui peuvent être utilisées ont des origines diverses : elles peuvent être issues d'essais inter-laboratoires, d'études de robustesse, d'études antérieures, d'essais d'aptitude ou bien d'études de performance de méthode. Cette dernière origine est conseillée car elle permet de documenter les sources d'incertitudes dans des conditions telles que les conditions de répétabilité et / ou de

fidélité intermédiaire. L'utilisation de l'approche globale et en particulier du profil d'exactitude permet d'estimer l'incertitude type et d'estimer une fonction d'incertitude (Gassner, 2014).

#### *Approche de type B :*

Il faut disposer, pour cette approche, d'une relation mathématique entre toutes les grandeurs qui interviennent dans le mesurage (VIM). Par exemple, la relation établie entre la concentration et une réponse instrumentale. Cependant, cette approche est peu utilisée dans le domaine des méthodes quantitatives car cette relation n'explique qu'une partie de l'incertitude et il est préféré une approche de type A pour estimer l'incertitude type composée.

Dans le cas d'une méthode qualitative, l'incertitude ne peut pas être chiffrée mais elle doit être documentée et les sources d'erreur doivent être identifiées.

Il est également possible de combiner, pour calculer l'incertitude type, l'approche de type A et l'approche de type B.

Le calcul de l'incertitude type composée et de l'incertitude élargie constituent la quatrième étape. Il existe globalement deux méthodes : une méthode générale et une méthode par discrétisation.

La méthode générale repose sur l'équation de propagation des variances. Cela traduit la combinaison des différentes incertitudes-types estimées.

Le groupe GT Val 2 préconise l'approche globale pour calculer l'incertitude type composée.

Dans le domaine de la microbiologie des aliments, pour les méthodes quantitatives, l'approche normative 'XP CEN/ISO TS 19036 est semi-globale : elle combine une approche de type A (écart-type de reproductibilité du résultat final de l'analyse) et une approche de type B (composante liée à la distribution des bactéries en suspension, selon la loi de Poisson, devenant prépondérante aux bas niveaux de contamination). Trois options sont décrites pour l'estimation de **l'écart-type( $s_R$ )** de reproductibilité  $s_R$ , classées par ordre décroissant de priorité :

- $s_R$  intra-laboratoire, avec plan d'expérience permettant d'inclure la composante de l'incertitude liée à la prise d'essai dans l'échantillon pour essai, importante en cas de contamination hétérogène de l'échantillon (matrices solides) ;
- $s_R$  inter-laboratoires dérivée d'un EILV, sous certaines conditions décrites dans la norme ;
- $s_R$  inter-laboratoires dérivée d'un EILA, sous certaines conditions décrites dans la norme.

Une autre approche de l'estimation de l'incertitude de mesure est l'utilisation de données issues d'un EILV comme décrit dans la norme NF ISO 21748.

L'incertitude élargie peut être fixée dans des normes ou référentiels réglementaires mais elle doit être vérifiée.