

Principes et vocabulaire pour la validation des méthodes

Max Feinberg¹

Résumé : *La validation des méthodes est un problème récurrent dans les laboratoires. Cet article a pour but d'expliquer les objectifs et principes fondamentaux de la validation en présentant les principes de l'assurance qualité dans les laboratoires.*

Mots-clés : Validation, profil d'exactitude, justesse, fidélité, incertitude, méthodes d'analyse quantitative

1. Place de la validation dans la qualité

1.1. Assurance qualité au laboratoire

Parmi les diverses préoccupations des analystes, la place prise par la validation des méthodes, doit être mise en relation avec le développement de l'assurance qualité dans les laboratoires. Les principes de l'assurance qualité sont l'objet d'une série de normes publiées par l'International Standardisation Organisation (ISO), comme la série des normes ISO 9000. S'y trouvent définies la qualité et toutes les opérations qui y concourent. Même si ces normes ne sont pas, en général, applicables en l'état aux activités des laboratoires, leur lecture n'est pas inutile. Elles insistent sur le fait que la qualité des produits ou des services doit être conçue en vue de satisfaire les **besoins d'un client**. Souvent on résume les objectifs de la qualité d'un produit ou d'un service sous la forme d'une liste comme celle-ci :

- répondre à un besoin, un usage ou un objectif bien défini ;
- satisfaire les attentes des consommateurs ;
- être conforme aux normes, spécifications, exigences réglementaires et autres ;
- avoir à un prix compétitif ;
- être fourni à un coût qui génère un profit.

Par ailleurs, pour remplir son rôle, un système d'assurance de la qualité doit présenter trois caractéristiques :

- être conçu pour le but qu'on lui assigne ;
- être correctement mis en œuvre ;
- être effectivement contrôlé.

Tous ces principes peuvent sembler bien abstraits mais en les appliquant à l'activité d'un laboratoire d'analyse, l'assurance de la qualité est tout ce qui peut individuellement ou collectivement influencer le résultat d'une analyse.

Afin de prendre en compte la spécificité des activités de laboratoire et la diversité de leurs domaines d'application, il existe au moins quatre référentiels principaux qui expliquent comment organiser l'assurance de la qualité au laboratoire :

- les **Bonnes pratiques de laboratoire** (BPL) s'appliquent à l'étude et au développement

1. UR1204 Met@risk - Méthodologie d'analyse de risque alimentaire - INRA – F- 75231 Paris cedex 05.

☎ 01 44 08 16 52 ✉ max.feinberg@paris.inra.fr

de molécules chimiques, médicaments, des pesticides et, en général, à l'étude de toute substance nouvelle ;

- le **Guide de bonne exécution des analyses** (GBEA) précise comment doit fonctionner le système d'assurance de la qualité d'un laboratoire d'analyse de biologie médicale ;
- l'**accréditation**, qui suit les principes de la norme ISO 17025 et permet d'assurer la compétence d'un laboratoire qui applique un ensemble de recommandations NF EN ISO/CEI 17025:2005, (NF X 50-061) ;
- la **certification de service** s'appuie sur les normes ISO 9000 et s'applique à une entreprise dans son ensemble et, éventuellement, au laboratoire qui s'y rattache.

Dans les années 1970, mettre en place l'assurance qualité dans un laboratoire, c'était surtout mieux prévoir son organisation afin d'améliorer la transparence de son fonctionnement. La validation se concevait alors surtout pour les méthodes normalisées qui servaient aux échanges commerciaux : c'était le rôle de la norme ISO 5725 de fixer ces critères d'inter-comparaison. Ensuite, les normes sur l'assurance qualité se sont diversifiées mais n'ont pas changé beaucoup dans leurs principes. Les textes qui définissaient des procédures de validation interne ne sont apparus que vers la fin des années 1990. La question de savoir comment seront interprétés les résultats d'analyse par les demandeurs ne s'est vraiment posée que vers 2005. L'introduction de l'incertitude et le développement de l'approche critères sont liés à cet objectif. On peut considérer qu'il s'agit de mieux prendre en compte les besoins des utilisateurs ; ce qui semble logique si on se réfère à la définition de la qualité.

De nombreux guides, recommandations et guidances plus ou moins officiels ont été publiés par des structures réglementaires, des organismes de normalisation ou des groupes d'experts. On trouvera en section 4 une liste de références pour ces normes et guides. Ces documents sont souvent disponibles sur Internet et peuvent être téléchargés. On peut ainsi constater qu'ils se recopient largement les uns les autres. En outre, ils contiennent de nombreuses définitions dont certaines sont reprises à la section 2.

Ces guides permettent cependant de comprendre la philosophie générale qui a été adoptée jusqu'à présent pour conduire une validation. Dans la plupart des cas, cela consiste en une suite d'études expérimentales qui permettent de calculer des critères de validation. Par exemple, le document 1133 du Comité français d'accréditation (Cofrac) sur la « *Validation interne des méthodes d'essais* » indique que les « *critères de performance à établir, lors de la validation d'une méthode d'essai, dépendent des caractéristiques mesurées, qualitatives ou quantitatives, des principes physiques, chimiques, mécaniques ou biologiques sur lesquels portent l'essai ou l'analyse et du type d'équipement utilisé* ». Vient ensuite la liste de ces critères, citée à titre « d'exemple » : *la justesse (obtenue par comparaison avec une méthode de référence, par l'emploi de matériaux de référence ou de matériaux dont les propriétés sont connues ou par essai inter-laboratoires) ; la fidélité (exprimée en terme de répétabilité, de reproductibilité et éventuellement d'hystérésis) ; la limite de détection et la limite de quantification ; la sensibilité ; la sélectivité ou la spécificité ; le pouvoir de résolution ou de séparation ou de discrimination ; et la robustesse.*

De même, la norme NF V03-110:1994, propose de faire des tests pour vérifier la conformité d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence en comparant les écarts-types de répétabilité, les moyennes et les limites de détection de deux méthodes. Divers autres tests viennent compléter ce qui est alors appelé étude de validation : *vérification de l'homogénéité de la variance dans le domaine d'application ; adéquation du modèle linéaire au cas d'étalonnage linéaire avec une variance constante ; calcul de la sensibilité ; contrôle*

de la spécificité par la méthode des ajouts dosés et étalonnage linéaire par les moindres carrés.

Mais rien n'est dit sur le niveau de garantie à atteindre pour l'estimation de ces critères, par exemple en termes de nombre de mesures, ni ce qu'on doit en faire par la suite pour effectivement valider. En particulier, comment doit-on faire pour vérifier qu'ils permettent d'atteindre un niveau de qualité donné ? Le principe du traitement statistique des données développé dans ces guides de validation consiste à réaliser un certain nombre de tests dit de signification de l'hypothèse nulle. Ils ont le gros inconvénient de favoriser les méthodes les plus dispersives, c'est-à-dire dont la fidélité est mauvaise. La démonstration de cet inconvénient des guides classiques requiert des développements importants qui alourdiraient ce texte. Le lecteur intéressé pourra trouver dans Feinberg M. (2009), Boulanger *et al.* (2003) et Feinberg M. *et al.*, (2004), tous les éléments qui appuient cette affirmation. C'est pourquoi, nous avons développé une approche mieux adaptée qui débouche sur un autre outil statistique appelé le **profil d'exactitude**.

1.2. Organiser la validation d'une méthode

Pour organiser la validation d'une méthode d'analyse, il faut d'abord l'avoir correctement mise au point. Bien souvent les analystes sont trop impatients et vont essayer de valider une méthode dont le domaine d'application n'est encore bien défini et pour laquelle il existe des effets de matrice inconnus. C'est une perte de temps et d'argent. Une étude de validation doit démarrer lorsqu'on dispose d'un mode opératoire complètement rédigé.

Bien sûr l'organisation pratique des essais dépend ensuite du guide de validation choisi. Dans Feinberg (2010b) nous proposons une séquence de dix opérations qui débouchent sur la construction d'un profil d'exactitude. On peut déjà en définir des principes généraux :

- définir les objectifs à atteindre ;
- prévoir les plans d'expérience à réaliser ;
- prévoir les quantités et la qualité des matériaux qui seront utilisés ;
- organiser le calendrier des études et celui du personnel qui en sera chargé.

En fin d'étude, il ne faut pas sous-estimer le temps nécessaire pour interpréter les résultats. C'est pourquoi, il importe de prévoir dès le début le mode d'enregistrement des mesures, en fonction des outils de calcul dont dispose le laboratoire.

De toute façon, si le laboratoire fonctionne avec un système qualité, il se doit de rédiger une procédure et tous les documents annexes qui précisent comment l'étude sera conduite. On peut proposer cette série d'étapes qui constituera le squelette de cette procédure :

- nommer un responsable qui coordonnera l'étude de validation ;
- rédiger la version préliminaire du mode opératoire de la méthode en suivant une procédure de présentation d'un mode opératoire normalisé.
- ouvrir une fiche de validation ;
- réunir un groupe de travail qui définira le domaine d'application et les spécifications, en particulier l'objectif attendu de la méthode.
- rédiger les plans d'expérience qui devront être effectués. Prévoir la logistique, en termes de volumes d'échantillon de validation, de réactifs et de disponibilité du personnel.
- réaliser les études prévues.
- interpréter les résultats et calculer les divers critères de performance requis.
- rédiger la version finale du mode opératoire de la méthode avec ses critères de performance.

Il est alors possible de définir un certain nombre de types de **dossiers de validation** qui se solderont par des documents présentables à un organisme de contrôle. Le dossier de validation, une fois constitué, permettra aussi d'établir des valeurs seuils de qualification du matériel de mesure qu'il faudra vérifier, par exemple, avant chaque utilisation. Ces tests de qualification font l'objet de **fiches de qualification** spécifiques de chaque instrument employé. Une vérification d'aptitude doit aussi avoir lieu si la méthode est transférée sur un autre matériel. Il ne faut donc pas confondre la validation de la méthode avec un test de qualification de l'instrumentation.

2. Vocabulaire et définitions

Le vocabulaire relatif à la validation est très abondant, souvent foisonnant et souvent confus. Nous avons décidé de choisir les définitions proposées en 2007 dans la dernière version du Vocabulaire International de Métrologie (VIM) (Guide ISO/CEI 99:2007) car elles représentent l'effort le plus récent de normalisation dans ce domaine.

Terme	Référence	Définition
Mesurage, mesure	VIM 2.1	Processus consistant à obtenir expérimentalement une ou plusieurs valeurs que l'on peut raisonnablement attribuer à une grandeur.
Mesurande	VIM 2.3	Grandeur que l'on veut mesurer. Analyte, employé en chimie, est un synonyme de mesurande, d'usage plus général.
Justesse de mesure, justesse	VIM 2.15	Étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence.
Fidélité de mesure, fidélité	VIM 2.16	Étroitesse de l'accord entre les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées.
Condition de répétabilité	VIM 2.21	Condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure opératoire, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps.
Répétabilité de mesure, répétabilité	VIM 2.22	Fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de répétabilité.
Condition de fidélité intermédiaire	VIM 2.23	Condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure opératoire, le même lieu et des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une période de temps étendue, mais peuvent comprendre d'autres conditions que l'on fait varier.
Fidélité intermédiaire de mesure, fidélité intermédiaire	VIM 2.24	Fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de fidélité intermédiaire.

Exactitude de mesure, exactitude	VIM 2.13 et 2.14	a) Étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et une valeur vraie du mesurande. b) Étroitesse de l'accord entre les valeurs mesurées qui sont attribuées au mesurande.
Incertitude de mesure, incertitude	VIM 2.27	Paramètre qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande, à partir des informations utilisées. L'incertitude de mesure comprend des composantes provenant d'effets systématiques, telles que les composantes associées aux corrections et aux valeurs assignées des étalons, ainsi que l'incertitude définitionnelle. Parfois, les effets systématiques connus ne sont pas corrigés mais traités comme des composantes de l'incertitude. Le paramètre qui sert à exprimer l'incertitude peut être, par exemple, un écart-type appelé incertitude-type (ou un de ses multiples) ou la demi étendue d'un Intervalle ayant un niveau de confiance déterminé.
Limite de détection	VIM 4.18	Valeur mesurée, obtenue par une procédure opératoire donnée, pour laquelle la probabilité de déclarer faussement l'absence d'un constituant dans un matériau est β , étant donnée la probabilité α de déclarer faussement sa présence. La notation β utilisée dans cette définition représente un risque d'erreur (dit de seconde espèce) et ne doit pas être confondue avec la proportion β de la définition de l'intervalle de tolérance.
Sélectivité	VIM 4.13	Aptitude d'un système de mesure, utilisant une procédure opératoire spécifiée, à fournir des résultats de mesure pour un ou plusieurs mesurandes, qui ne dépendent pas les uns des autres ou de toute autre grandeur existant dans le système en cours de mesurage.
Spécificité	UIPAC	Stade ultime de la sélectivité.
Valeur de référence	VIM 5.18	Valeur d'une grandeur, dont l'incertitude de mesure associée est considérée communément comme suffisamment petite pour que la valeur puisse servir de base de comparaison pour les valeurs de grandeurs de même nature.
Validation	VIM 2.45	Vérification que des exigences spécifiées sont adéquates pour un usage déterminé. Le terme caractérisation s'applique à la méthode, alors que le terme vérification s'applique au résultat rendu. La validation de la méthode consiste donc à vérifier si les résultats sont adéquats en vue d'un usage défini.
Vérification	VIM 2.44	Fourniture de preuves tangibles qu'une entité donnée satisfait à des exigences spécifiées, en prenant en compte toute incertitude de mesure.
Domaine d'application <de la méthode>		Ensemble des types de matrice auquel s'applique la méthode, en tenant compte de la gamme de concentrations sur laquelle doit porter la validation.

Domaine de validation	Ensemble des types de matrice auquel s'applique la méthode et gamme de concentrations sur laquelle a porté la validation.
Domaine de validité	Ensemble des types de matrice auquel s'applique la méthode et gamme de concentrations sur laquelle a porté la validation et pour lequel les futurs résultats fournis par la méthode sont jugés valides.
Méthode quantitative	Méthode d'analyse qui détermine la quantité ou la fraction pondérale d'un analyte de manière à pouvoir l'exprimer sous forme de valeur numérique dans les unités appropriées.
Méthode de référence	Méthode d'analyse reconnue par des experts ou prise comme référence par accord entre les parties, qui donne ou est supposée donner la valeur de référence acceptée du mesurande.
Matrice	Ensemble des propriétés de l'échantillon et de ses constituants autres que l'analyte. L'effet de matrice traduit l'influence possible que ces propriétés ou constituants peuvent avoir sur la réponse instrumentale. Comme l'effet de matrice peut varier aux différents stades de l'analyse (par exemple avant ou après minéralisation), pratiquement un type de matrice sera défini comme un groupe de matériaux ou de produits reconnus par l'analyste comme ayant un comportement homogène vis-à-vis de la méthode d'analyse utilisée.
Série	Ensemble de mesurages réalisés sur un même échantillon selon des conditions de connues. Par exemple, une série réunira des mesurages effectués un même jour et/ou par un même opérateur et/ou un même appareil...
Profil d'exactitude	Combinaison, sous une forme graphique, d'un ou plusieurs intervalles de tolérance d'espérance β calculés à différents niveaux de concentration et d'une ou plusieurs intervalles d'acceptabilité.
Intervalle de tolérance d'espérance β (Intervalle de tolérance)	Intervalle qui contient en moyenne une proportion $\beta\%$ définie de futurs mesurages obtenus selon un mode opératoire donné et pour une concentration donnée. NOTE. L'intervalle de tolérance, revêt une grande importance dans la suite du texte. Ses limites sont obtenues par le calcul, à partir de mesurages répétés. La valeur de β est, généralement, choisie entre 80 % et 95 %. En fait, elle n'intervient que pour situer la limite de quantification de la méthode comme on le verra à la partie 3.
Intervalle d'acceptabilité	Spécification de la performance exigée pour la méthode, exprimée comme un écart acceptable autour de la valeur de référence. Les limites de l'intervalle sont fixées par le client ou par une obligation réglementaire, parfois en fonction du niveau de concentration. Elles sont notées $\pm \lambda$ en valeurs absolues et dans l'unité du mesurande ou $(1 \pm \lambda) \times 100$ en valeurs relatives.

Échantillon de validation (échantillon témoin)		Matériau dont la valeur de référence peut être assignée, soit parce qu'il s'agit d'un matériau de référence (certifié ou non), soit parce qu'on a procédé à un ajout dosé ou un marquage de la molécule à doser.
Limite de quantification (1)		Plus petite et/ou plus grande concentration de l'analyte pouvant être quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode.
Limite de quantification (2)	SFSTP	Plus petite et/ou plus grande quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie. Elle correspond à la concentration la plus petite et/ou la plus grande du domaine de validité.
Linéarité <de la méthode>		Établissement qu'il existe une relation linéaire entre les quantités retrouvées (ou quantifiées) dans des échantillons et leurs valeurs de référence. La linéarité de la méthode ne doit pas être confondue avec la linéarité de la fonction de réponse de l'appareillage de mesure qui caractérise la seule réponse instrumentale lors de l'étalonnage et qui n'est pas indispensable pour obtenir une quantification exacte.

3. Principes à la base du profil d'exactitude

3.1. Rappel sur les normes de la série ISO 5725

Le profil d'exactitude est basé sur une application directe des principes décrits dans les normes de la série ISO 5725 (1, 2, 3, 4 ; 1994)]. On y propose un modèle statistique pour estimer l'exactitude (justesse et fidélité) d'une méthode ou de résultats. Ce modèle décrit un mesurage z d'un mesurande Z sous la forme :

$$z = m + B + e$$

Où m est la moyenne générale de l'échantillon homogène, B la composante du biais du laboratoire sous condition de répétabilité et e l'erreur aléatoire survenant dans chaque mesurage, sous condition de répétabilité. Dans le cas d'une étude inter-laboratoires, la composante du biais B provient des laboratoires, mais elle peut aussi provenir de toute autre source d'incertitude, comme le jour, l'opérateur, l'instrument... dans le cas d'une étude intra-laboratoire. Dans le vocabulaire statistique, un tel modèle est dit « **modèle d'analyse de la variance à un seul facteur à effets aléatoires** » ou aussi « **modèle des composantes de la variance** » (en anglais, One-Way ANOVA Random Effect Model). Il est très répandu dans la recherche agronomique.

Outre les méthodes statistiques pour calculer les critères d'exactitude, les normes ISO 5725 précisent aussi en détail l'organisation de la collecte et les précautions à respecter.

3.2. Diverses conditions d'estimation de la fidélité

D'après sa définition, la fidélité peut être estimée sous plusieurs conditions, comme la **répétabilité**, la **fidélité intermédiaire** ou la **reproductibilité**. Dans tous les cas, la fidélité est quantifiée par un écart-type, qu'il soit de répétabilité et noté s_r , de fidélité intermédiaire s_{FI} ou de reproductibilité s_R . On peut établir une échelle de complexité entre ces différents écarts-

types, en fonction du nombre de sources d'incertitude. La Figure 1 illustre cette graduation depuis les conditions de répétabilité où il n'existe aucun facteur de variation identifié et/ou contrôlé pour calculer l'écart entre des répétitions, jusqu'aux conditions de reproductibilité où le nombre de sources est inconnu. Ceci, en passant par les différentes possibilités d'estimation de la fidélité intermédiaire. La norme ISO 5725-3 décrit ces divers contextes d'application, dits de fidélité intermédiaire, et les modèles à utiliser lorsque d'autres facteurs peuvent varier, comme le jour, l'opérateur, l'instrument...

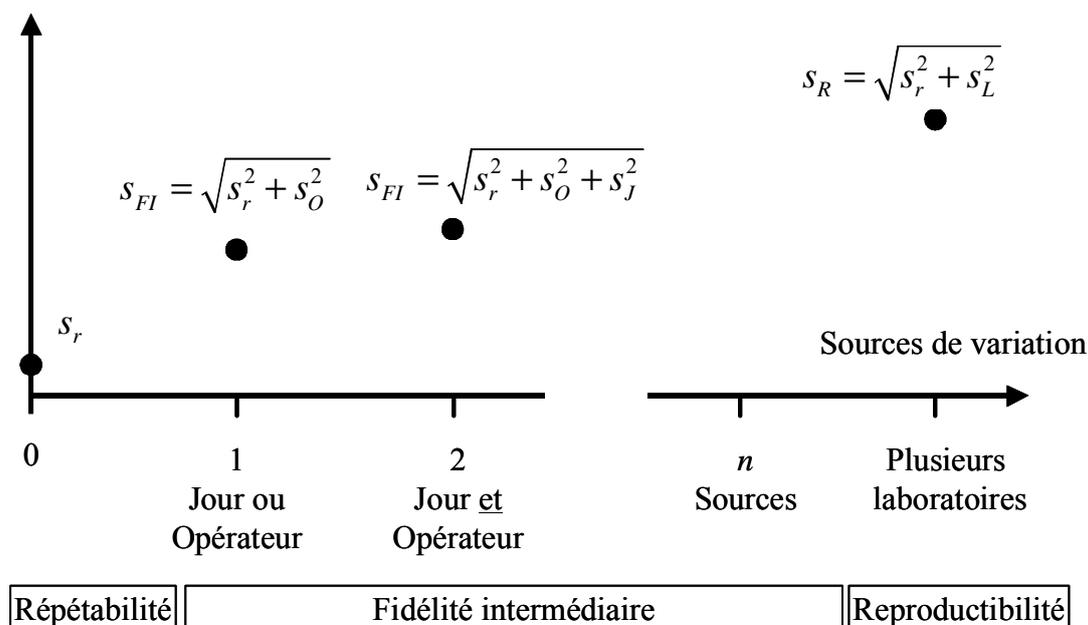


Figure 1 : les différentes estimations de la fidélité d'une méthode en fonction des sources de variation impliquées

L'application la plus classique de la norme ISO 5725-2 est le calcul de la répétabilité et de la reproductibilité, dans le cadre d'une étude inter-laboratoires qui débouche sur deux écarts-types. Mais elle décrit aussi les calculs sous des conditions intermédiaires de fidélité. Dans le cadre de la méthode du profil d'exactitude, on peut se situer aussi bien en condition de fidélité intermédiaire et la validation est alors intra-laboratoire, que de reproductibilité et la validation est inter-laboratoires.

Pour simplifier la présentation, la notion de **série** sert à désigner un ensemble de répétitions effectuées sous des conditions de répétabilité : une série regroupe tous les mesurages effectués sur un même échantillon sous les mêmes conditions, par exemple le même jour, le même opérateur, un délai court. Les plans d'expériences décrits dans la Partie 2 consistent à réaliser des essais en les répartissant en plusieurs séries (par exemple, au moins 3 jours). Pour certaines méthodes qui s'appliquent à des échantillons très instables dans le temps il faudra choisir un effet série qui ne soit pas le jour mais plutôt les opérateurs : une série regroupe alors les répétitions faites par un même opérateur. Par exemple, la détermination de l'extrait sec d'un fromage peut exiger d'utiliser différents opérateurs travaillant un même jour, si la méthode est destinée, en routine, à rendre un résultat en moins de 24 heures.

Des schémas plus compliqués peuvent être utilisés, comme dans l'exemple suivant où se combinent différents jours, opérateurs et instruments pour créer 4 séries sous la forme d'un plan factoriel fractionné à 3 facteurs.

Séries	Jours	Opérateurs	Instruments
1	Jour 1 (-)	Opérateur 1 (-)	Instrument 1 (+)
2	Jour 2 (+)	Opérateur 1 (-)	Instrument 2 (-)
3	Jour 1 (-)	Opérateur 2 (+)	Instrument 2 (-)
4	Jour 2 (+)	Opérateur 2 (+)	Instrument 1 (+)

D'une façon générale, le choix des sources de variation pour organiser les séries de mesure doit refléter au mieux les composantes de l'incertitude qui risquent d'apparaître lors de l'application en routine de la méthode à valider.

Dans la méthode du profil d'exactitude, il est indispensable de collecter les données en plusieurs séries et en contrôlant les sources de variation. Sinon, il est impossible de construire un profil d'exactitude.

3.3. Profil d'exactitude

À partir de l'écart-type de fidélité intermédiaire ou de reproductibilité, calculé selon les recommandations de la norme ISO 5725-2 (voir Partie 3), on construit un intervalle de tolérance d'espérance β qui contient une proportion $\beta\%$ de futurs résultats. Cette procédure a été établie par un groupe de travail de la Société française des sciences et techniques pharmaceutiques (Commission SFSTP 2003, 2006).

L'intervalle de tolérance d'espérance β est différent de l'intervalle de confiance. L'intervalle de confiance caractérise un paramètre statistique. Par exemple l'intervalle de confiance de la moyenne permet d'établir avec un niveau de confiance donné un intervalle autour de la moyenne observée dans lequel la moyenne vraie a de grandes chances de se trouver. Il s'exprime sous la forme Moyenne $\pm k_{IC}$ (écart-type de la moyenne), où k_{IC} est le facteur de couverture de l'intervalle de confiance. L'intervalle de tolérance caractérise, d'un côté, la dispersion des résultats déjà obtenus mais permet aussi de prévoir ceux qui seront obtenus lors de futurs mesurages. Il s'exprime aussi sous la forme Moyenne $\pm k_{IT}$ (écart-type de fidélité) mais où k_{IT} est un autre facteur de couverture, calculé de façon complètement différente de k_{IC} .

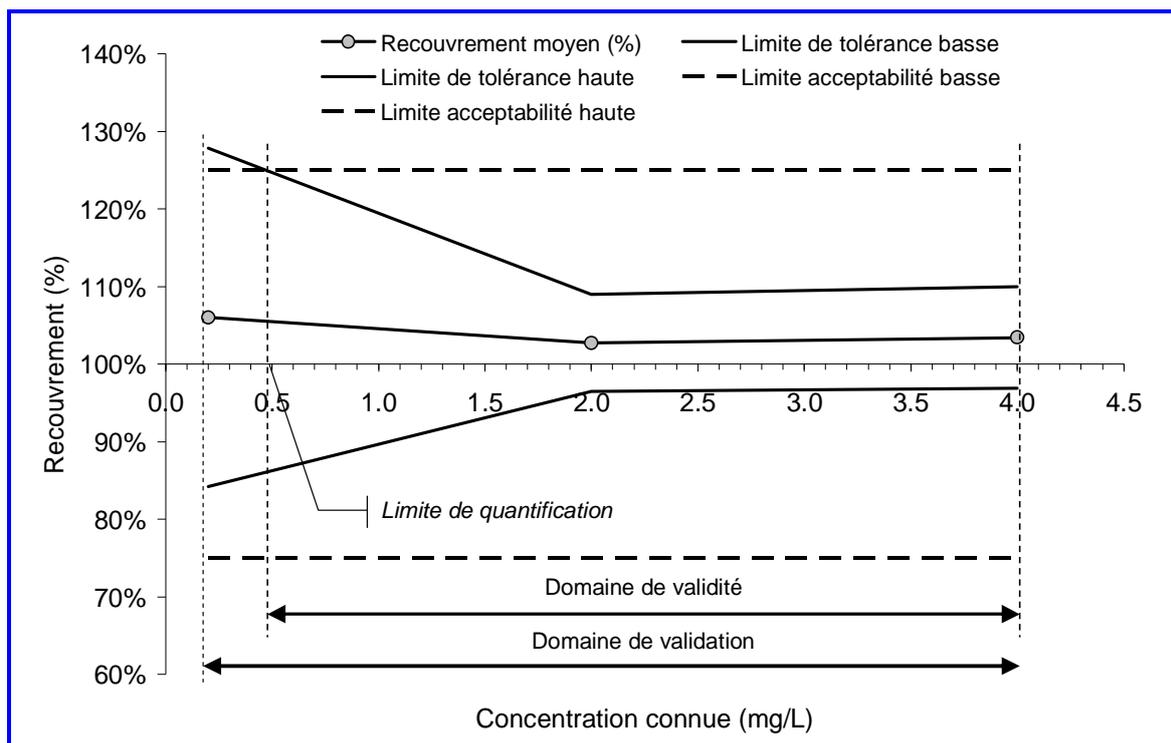


Figure 2 : profil d'exactitude établi avec 3 niveaux de concentration.

Chaque cercle gris représente la concentration moyenne retrouvée pour le niveau et quantifie la justesse. Les lignes pointillées délimitent l'intervalle d'acceptabilité et les lignes continues l'intervalle de tolérance calculé à partir des écarts-types de fidélité intermédiaire pour chaque niveau. Les traits verticaux délimitent le domaine de validité, dans lequel la méthode est capable de produire une proportion élevée et connue de résultats acceptables

Tous les calculs sont effectués séparément pour chaque niveau de concentration k , permettant d'obtenir k écarts-types de fidélité puis k intervalles de tolérance qui une fois réunis servent à construire le profil. La **figure 2** illustre un exemple de profil d'exactitude construit avec 3 niveaux de concentration – 0,4 ; 2,0 et 4,0 mg/l – qui délimitent le domaine de validation (ou d'application) de la méthode à valider.

Les éléments graphiques entrant dans le profil d'exactitude sont les suivants :

- sur l'axe horizontal, la concentration théorique des niveaux (soit les valeurs de référence assignées aux niveaux) ;
- sur l'axe vertical, simultanément :
 - les limites des intervalles de tolérance d'espérance β calculés sur les concentrations retrouvées et exprimées en pourcentages (sous la forme d'un taux de recouvrement ou d'une exactitude relative) ;
 - les intervalles d'acceptabilité, définis en fonction de l'objectif de la méthode, exprimés de la même façon que les intervalles de tolérance.

La stratégie d'interprétation de ce graphique est décrite en détail par Max Feinberg (2010 c). Cependant, d'une part, les limites d'acceptabilité, d'autre part, la proportion β qui sert à calculer les intervalles de tolérance dépendent strictement du contexte d'utilisation de la méthode et doivent être adaptés à chaque cas. Sur la figure 2, dans le domaine de validité, délimité par les traits verticaux discontinus, la méthode est capable de produire une

proportion moyenne attendue de résultats égale à β comprise entre les limites d'acceptabilité : la méthode est dite valide dans ce domaine. Le domaine d'application représente le domaine initialement choisi pour conduire la validation.

D'une façon générale, pour être en cohérence avec les modèles statistiques utilisés, il faut disposer de répétitions effectuées sous condition de fidélité intermédiaire ou de reproductibilité sur des échantillons homogènes.

Max Feinberg présente de façon détaillée les 10 étapes de la méthode du profil d'exactitude (2010 b) et des exemples, des compléments et des feuilles de calcul (2010 c).

4. Guides et normes de validation

4.1. Textes réglementaires

Commission des Communautés Européennes, *Décision 2002/658/EC : modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats* (2002) Off J. Eur. Commun. L221/8

Food and Drug Administration, *Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation, Draft guidance* (2000) US Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER)

Food and Drug Administration, *Guidance for Industry: Bioanalytical Methods Validation for Human Studies, Draft guidance* (1998) US Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER)

Food and Drug Administration, International Conference on Harmonization: *Guideline on validation of analytical procedures: definitions and terminology* (1995) Federal Register 60, 11260-11262

Food and Drug Administration, International Conference on Harmonization: *Guideline on validation of analytical procedures: methodology* (1997) Federal Register 62, 27463-27467

GBEA Arrêté du 2 novembre relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale (1995) *Revue Française des Laboratoires* 272, 55-65

Health and Welfare Canada, Drugs Directorate Guidelines, *Acceptable Methods, published by Authority of the Minister of National Health and Welfare* (1992) Health Protection Branch

United States Pharmacopeia, *Current concepts for the validation of compendia assays, Pharmacopeia Forum* (1986) The United States Pharmacopeia Inc., Rockville, MD, USA, 1241-1252

United States Pharmacopeia, XXVI, general information <1225>, *Validation of compendia methods* (2003) The United States Pharmacopeia Inc., Rockville, MD, USA, p. 2439-2442

4.2. Normes et textes de consensus

EURACHEM, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (1998) 1st Edition

EURACHEM/CITAC *Guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement* (2000) Second Edition, Final draft, April

International Conference on Harmonization (ICH) *Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (2005) <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (2002) *Pure Appl. Chem.* 74(5) 835-855

NF V03-110:2010 *Analyse des produits agricoles et alimentaires - Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude* (2010) Afnor, Paris

NF V03-111 *Protocole d'évaluation intralaboratoire d'une méthode alternative qualitative par rapport à une méthode de référence* (1995) Afnor Paris

Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) *Validation (Proc. 4)* <http://www.nmkl.org>

Organisation internationale de la vigne et vin (OIV) OENO 10-2005 Guide pratique pour la validation, le contrôle qualité, et l'estimation de l'incertitude d'une méthode d'analyse œnologique alternative (2005) OIV, Paris <http://www.oiv.int>

Vassault A., alt. Protocole de Validation des Techniques. Commission SFBC (1986) *Annales de Biologie Clinique* 44, 679-745

4.3. Méthodes microbiologiques

ISO 13843 (NF T90-460) *Qualité de l'eau, Lignes directrices pour la validation des méthodes microbiologiques* (2001) ISO, Genève

ISO 16140 *Microbiologie des aliments, Protocole pour la validation des méthodes alternatives* (2003) ISO, Genève

ISO 17994 *Qualité de l'eau, Critères pour établir l'équivalence entre les méthodes microbiologiques* (2004) ISO, Genève

Bibliographie

AFNOR (2005) Norme NF EN ISO/CEI 17025 (NF X 50-061) *Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais*. Afnor, Paris

AFNOR (1994) Norme NF V03-110 *Protocole d'évaluation d'une méthode alternative quantitative par rapport à une méthode de référence* Afnor, Paris

AFNOR (1994a) Norme NF ISO 5725-1 : *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure — Partie 1 : Principes généraux et définitions*. ISO, Genève

AFNOR (1994b) Norme NF ISO 5725-2 : *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure — Partie 2 : Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée*. ISO, Genève

AFNOR (1994c) Norme NF ISO 5725-3 : *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure — Partie 3 : Mesures intermédiaires de la fidélité d'une méthode de mesure normalisée*. ISO, Genève

AFNOR (1994d) Norme NF ISO 5725-4 : *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure — Partie 4 : Méthodes de base pour la détermination de la justesse d'une méthode de mesure normalisée*. ISO, Genève

- Boulanger B., Chiap P., Dewé W., Crommen J., Hubert Ph. (2003) An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progresses and limitations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 32, 753-765
- Commission SFSTP, Hubert P Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Valat L, (2003) Validation des procédures analytiques quantitatives, Harmonisation des démarches : Partie I *STP Pharma Pratiques* 13(3) 101-138
- Commission SFSTP, Hubert P Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Valat L, (2006) Validation des procédures analytiques quantitatives, Harmonisation des démarches : Partie II Statistiques *STP Pharma Pratiques* 16(1) 30-60
- Commission SFSTP, Hubert P Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Valat L, (2006) Validation des procédures analytiques quantitatives, Harmonisation des démarches : Partie III Exemples d'application *STP Pharma Pratiques* 16(2) 87-121
- Feinberg M., Boulanger B., Dewé W., Hubert P. (2004) New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 380: 502-514
- Feinberg M., (2009) *Labo-Stat : Guide de validation des méthodes d'analyse* Lavoisier Tec&Doc, Paris
- Feinberg M. (2010b) Mise en œuvre du profil d'exactitude. In Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, numéro spécial : 27-44
- Feinberg M. (2010c) Interprétation du profil d'exactitude. In Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, numéro spécial : 45-59
- ISO (2007) Guide ISO/CEI 99 *Vocabulaire international de métrologie – Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM)*, ISO, Genève

