

Interprétation du profil d'exactitude

Max Feinberg¹

Résumé : À partir des données collectées pour construire le profil d'exactitude, il est possible de calculer divers critères complémentaires souvent exigés pour les dossiers de validation, comme la limite de quantification ou l'incertitude. S'appuyant sur les concepts décrits dans d'autres articles consacrés à la validation des méthodes : principe et mise en œuvre du profil d'exactitude cet article présente différents compléments et, en particulier, le mode de calcul de la répétabilité et de la fidélité.

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

Notations et symboles

Une série de mesurages i , (i variant de 1 à I) contient des niveaux de concentration k (k variant de 1 à K) pour lesquels des répétitions ont été faites j (j variant de 1 à J) les indices seront repris dans l'ordre i, j, k . Les variables aléatoires sont notées en majuscules et les valeurs qu'elles prennent en minuscules.

Symbole	Description
x_{ijk}	Valeur de référence assignée à un étalon pour la série i ($1 \leq i \leq I$), la répétition j ($1 \leq j \leq J$) et le niveau k ($1 \leq k \leq K$) ou Valeur de référence assignée à un échantillon de validation pour la série i , la répétition j et le niveau k .
y_{ijk}	Mesure de la réponse instrumentale ou expérimentale observée pour un étalon ou un témoin de validation pour la série i , la répétition j et le niveau k .
z_{ijk}	Valeur retrouvée dans l'échantillon de validation de la série i , pour la répétition j et le niveau k , obtenue soit par prédiction inverse à l'aide d'un modèle d'étalonnage, soit par une mesure directe.
b_{ijk}	Biais exprimant l'erreur de justesse pour un témoin de validation entre sa valeur retrouvée et sa valeur de référence $b_{ijk} = z_{ijk} - x_{ijk}$

1. Calcul des écarts-types de répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité

Les calculs sont conduits selon le principe décrit dans la norme ISO 5725-2 ou de sa version Afnor NF X 06-041. Ils doivent être effectués indépendamment niveau par niveau k , sur les concentrations retrouvées par prédiction inverse dans le cas des méthodes indirectes ou sur les concentrations retrouvées dans le cas des méthodes directes. Dans les deux cas, les

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

concentrations retrouvées sont notées z_{ijk} . Par convention, l'indice i ($1 \leq i \leq I$) représente le numéro de la série et j ($1 \leq j \leq J$) celui de la répétition dans la série. Toutes les séries doivent avoir le même nombre de répétitions, c'est-à-dire que J est le même quelque soit i : on dit alors que le **plan d'expérience est équilibré**. Pour simplifier les notations, l'indice k ($1 \leq k \leq K$) du niveau est supprimé dans les formules qui suivent.

Calculer pour chaque niveau k :

- l'écart-type de répétabilité, noté s_r ;
- l'écart-type inter-séries, noté s_B ;
- l'écart-type de fidélité intermédiaire $s_{FI} = \sqrt{s_r^2 + s_B^2}$.

1.1 Cas d'un plan équilibré

La norme ISO 5725 ne prend en compte que les plans d'expérience où le nombre de répétitions I par série est le même pour toutes les séries. Le nombre total de répétitions doit être égal à IJ . Par contre, ce total peut être différent pour chaque niveau.

Calculer la moyenne générale d'un niveau :

$$\bar{\bar{Z}} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J z_{ij}}{I \times J} \quad \text{Concentration moyenne du niveau (1)}$$

Calculer les écarts-types de répétabilité, inter-séries et de fidélité intermédiaire en effectuant l'analyse de la variance (ANOVA) d'un modèle à effet aléatoire, selon les principes décrits de la norme ISO 5725, à savoir une décomposition de la somme des carrés des écarts totale en deux sommes des carrés d'écarts :

$$\underbrace{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (z_{ij} - \bar{\bar{Z}})^2}_{SCE_t} = \underbrace{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (z_{ij} - \bar{Z}_i)^2}_{SCE_r} + \underbrace{\sum_{i=1}^I J \times (\bar{Z}_i - \bar{\bar{Z}})^2}_{SCE_B} \quad (2)$$

Cette équation est traditionnellement écrite sous une forme abrégée, faisant appel à trois sommes de carrés d'écarts (SCE).

$$SCE_t = SCE_B + SCE_r \quad \text{Équation générale de l'analyse de variance}$$

Où chacune des sommes est définie comme suit pour faciliter l'interprétation :

SCE_t	Somme totale des écarts à la moyenne générale du niveau
SCE_B	Somme des écarts inter-séries
SCE_r	Somme des écarts intra-série

Comme le propose la norme ISO 5725, il n'est pas nécessaire de développer les trois sommes de carrés pour effectuer les calculs ; le calcul de SCE_B se fait par différence. Cette méthode peut poser des problèmes si le résultat est négatif : forcer alors la valeur de SCE_B à 0.

$$\begin{aligned} SCE_B &= SCE_t - SCE_r \text{ si } SCE_B > 0 \\ SCE_B &= 0 \text{ si } SCE_B \leq 0 \end{aligned}$$

Calculer la variance de répétabilité du niveau, à partir des répétitions z_{ij} :

$$s_r^2 = \frac{SCE_r}{I(J-1)} \quad \text{Variance intra-série (3)}$$

Calculer la variance inter-séries notée s_B^2 , comme suit :

$$s_B^2 = \frac{\frac{SCE_B}{I-1} - s_r^2}{J} \quad \text{Variance inter-séries (4)}$$

Finalement, calculer l'écart-type de fidélité intermédiaire du niveau :

$$s_{FI} = \sqrt{s_B^2 + s_r^2} \quad \text{Écart-type de fidélité intermédiaire (5)}$$

Voir le § 2.2 « Utilisation d'un logiciel » pour un exemple de calcul sous Excel.

1.2 Cas d'un plan déséquilibré

Dans la mesure où on ne prévoit pas de tests de rejet des valeurs atypiques mais qu'on laisse à l'utilisateur la liberté de supprimer des valeurs jugées atypiques, il est possible de déboucher sur un plan d'expérience déséquilibré. Cette situation ne correspond plus aux recommandations de la norme ISO 5725. Cependant, un algorithme alternatif est présenté pour éviter des pertes de données.

Si le nombre n_i de répétitions n'est pas le même pour toutes les séries d'un même niveau, utiliser la formule (6) au lieu de la (4) pour le calcul la variance inter-séries :

$$s_B^2 = \frac{(I-1) \left(\frac{SCE_B}{I-1} - s_r^2 \right)}{N^*} \quad (6)$$

$$\text{Avec } N^* = N - \frac{\sum_{i=1}^I n_i^2}{N} \quad \text{et } N = \sum_{i=1}^I n_i$$

Utiliser les formules classiques pour les autres critères de fidélité.

Une autre alternative à cette méthode de calcul consiste à utiliser un algorithme d'estimation des variances utilisant la méthode du maximum de vraisemblance restreint (REML) ; elle disponible dans la plupart des logiciels statistiques spécialisés, comme R.

2. Conduite des calculs

2.1 Exemple de construction d'un profil d'exactitude

Différents exemples de calcul sont disponibles dans la littérature (Feinberg M., 2009 - Commission SFSTP 2003, 2006). L'exemple présenté porte sur une méthode de dosage du nicotinamide (vitamine B3) dans le lait par HPLC avec une détection fluorimétrique. C'est une méthode indirecte qui nécessite un étalonnage pour réaliser la quantification. Les 10 étapes de la procédure se déroulent ainsi.

1. **Choix du domaine et des limites d'acceptabilité.** Le domaine de validation va de 0,4 à 4 mg/l. Les limites d'acceptabilité sont fixées $\pm 10\%$ autour de la valeur cible et choisies après discussion avec l'utilisateur. La proportion β est égale à 80 % et choisie de la même façon.
2. **Matériau de validation et fixation des valeurs cible.** Le matériau de validation choisi est un lait UHT qui ne contient pas la vitamine recherchée afin de pouvoir fixer les valeurs cible par dopage avec des ajouts dosés.
3. **Plan de validation (tableau 1).** Le plan de validation est formé de $I = 3$ séries (jours) avec $K = 3$ niveaux de concentration et $J = 3$ répétitions par jour et par niveau, ce qui fait un total de $3 \times 3 \times 3 = 27$ essais. Les concentrations des valeurs de référence sont exprimées en mg/L et les réponses en surfaces de pic. Les niveaux varient de 1 à K et sont codés A, B et C et les séries de 1 à I et sont codées, Jour1, Jour 2 et Jour 3.

Tableau 1 : *plan de validation (mesures exprimées en unités de surface de pic)*

Niveau	Valeur de référence	Série	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3
A	0.40	Jour 1	22.6	22.1	22.4
		Jour 2	23.3	24.1	23.9
		Jour 3	23.8	23.6	23.5
B	2.0	Jour 1	135.0	135.1	129.9
		Jour 2	137.6	135.2	138.8
		Jour 3	136.3	135.1	134.4
C	4.0	Jour 1	275.2	276.9	261.3
		Jour 2	268.1	269.7	276.9
		Jour 3	271.6	273.3	275.0

4. **Plan d'étalonnage (tableau 2).** Le plan d'étalonnage comporte $I = 3$ séries (jours) pour $K' = 2$ niveaux de concentration et $J' = 2$ répétitions par jour et par niveau, soit un total de 12 essais. Les deux niveaux sont codés Bas et Haut.

Tableau 2 : *plan d'étalonnage (mesures exprimées en unités de surface de pic)*

Niveau	Série	Concentration	Répétition 1	Répétition 2
Bas	Jour 1	0.4	22.7	23.1
	Jour 2	0.4	22.9	23.2
	Jour 3	0.4	21.9	22.1
Haut	Jour 1	4.0	281.6	275.3
	Jour 2	4.0	275.3	274.6
	Jour 3	4.0	272.0	273.0

5. **Estimation des coefficients des modèles d'étalonnage (tableau 3).** Le modèle choisi est une droite du type $Y = a_0 + a_1X + e$, où a_0 est le blanc, a_1 la sensibilité et e une erreur aléatoire. La méthode de calcul est la méthode de régression aux moindres carrés. Un modèle est calculé pour chaque jour.

Tableau 3 : estimations des paramètres des modèles en fonction des séries

Série	Sensibilité a_1	Blanc a_0
Jour 1	70.986	-5.494
Jour 2	69.972	-4.939
Jour 3	69.583	-5.833

6. **Calcul des concentrations prédites inverses et calcul de la justesse (tableau 4).** À partir des coefficients du tableau 3 et des mesures des surfaces de pic des échantillons de validation rassemblées au tableau 1, calculer les concentrations prédites inverses de chaque répétition en prenant soin d'utiliser les modèles obtenus pour chaque série.

Tableau 4. Concentrations retrouvées par prédiction inverse à partir des données du plan de validation (exprimées en mg/l)

Série	Niveau	Concentration X	Réponse Y	Retrouvée Z	Biais absolu	Biais relatif
Jour 1	A	0.40	22.6	0.40	-0.004	-1.06%
Jour 1	A	0.40	22.1	0.39	-0.011	-2.82%
Jour 1	A	0.40	22.4	0.39	-0.007	-1.76%
Jour 2	A	0.40	23.3	0.40	0.004	0.89%
Jour 2	A	0.40	24.1	0.42	0.015	3.75%
Jour 2	A	0.40	23.9	0.41	0.012	3.04%
Jour 3	A	0.40	23.8	0.43	0.026	6.47%
Jour 3	A	0.40	23.6	0.42	0.023	5.75%
Jour 3	A	0.40	23.5	0.42	0.022	5.39%
Jour 1	B	2.00	135.0	1.98	-0.021	-1.04%
Jour 1	B	2.00	135.1	1.98	-0.019	-0.97%
Jour 1	B	2.00	129.9	1.91	-0.093	-4.63%
Jour 2	B	2.00	137.6	2.04	0.037	1.85%
Jour 2	B	2.00	135.2	2.00	0.003	0.14%
Jour 2	B	2.00	138.8	2.05	0.054	2.71%
Jour 3	B	2.00	136.3	2.04	0.043	2.13%
Jour 3	B	2.00	135.1	2.03	0.025	1.27%
Jour 3	B	2.00	134.4	2.02	0.015	0.77%
Jour 1	C	4.00	275.2	3.95	-0.046	-1.14%
Jour 1	C	4.00	276.9	3.98	-0.022	-0.55%
Jour 1	C	4.00	261.3	3.76	-0.242	-6.04%
Jour 2	C	4.00	268.1	3.90	-0.098	-2.45%
Jour 2	C	4.00	269.7	3.92	-0.075	-1.88%
Jour 2	C	4.00	276.9	4.03	0.028	0.70%
Jour 3	C	4.00	271.6	3.99	-0.013	-0.32%
Jour 3	C	4.00	273.3	4.01	0.011	0.29%
Jour 3	C	4.00	275.0	4.04	0.036	0.90%

7. **Calculer les biais individuels.** On observe que les biais individuels varient entre -6.04% et 6.47% et permettent d'identifier les mesures éventuellement atypiques. Aucune donnée atypique n'a été identifiée.

8. **Calcul des données de fidélité et des intervalles de tolérance.** Calculer les critères de fidélité, comme décrit dans le § 1 et les limites des intervalles de tolérance selon la méthode décrite dans Feinberg M. (2010b). Rassembler les valeurs trouvées dans un tableau récapitulatif organisé comme le tableau 5.

Tableau 5 : tableau récapitulatif des critères de validation et des éléments du profil d'exactitude

Probabilité tolérance (β)	80%		
Limite d'acceptabilité (λ)	10%		
Niveaux	Niveau A	Niveau B	Niveau C
Concentration moyenne théorique	0.4	2.0	4.0
Concentration moyenne retrouvée	0.409	2.005	3.953
Fidélité			
Écart-type de répétabilité (s_r)	0.004	0.030	0.081
Écart-type inter-séries (s_B)	0.015	0.039	0.033
Écart-type de fidélité (s_{FI})	0.016	0.049	0.087
Coefficient de variation de fidélité	3.90%	2.45%	2.21%
Justesse			
Biais (%)	2.18%	0.25%	-1.17%
Intervalle de tolérance			
Nombre de degrés liberté	2.197	3.374	6.826
Facteur de couverture (k_{IT})	1.837	1.599	1.419
Écart-type de tolérance (s_{IT})	0.018	0.055	0.093
Limite intervalle tolérance basse	0.375	1.917	3.821
Limite intervalle tolérance haute	0.442	2.093	4.086
Limite d'acceptabilité basse	0.3600	1.8000	3.6000
Limite d'acceptabilité haute	0.4400	2.2000	4.4000
Profil d'exactitude			
Recouvrement %	102.2%	100.2%	98.8%
Limite intervalle tolérance basse en %	93.8%	95.9%	95.5%
Limite intervalle tolérance haute en %	110.6%	104.6%	102.2%
Limite d'acceptabilité basse en %	90.0%	90.0%	90.0%
Limite d'acceptabilité haute en %	110.0%	110.0%	110.0%

9. **Construction du profil d'exactitude.** Construire le graphique correspondant au profil en sélectionnant les valeurs de la ligne « Concentration moyenne théorique » en abscisse et les valeurs des 5 lignes sous le titre « Profil d'exactitude » en ordonnées. On obtient ainsi la **figure 1**.
10. **Interprétation.** On observe que les limites de tolérance à 80 % sont comprises entre les limites d'acceptabilité dans un domaine de validité s'étend de 0,5 mg/l environ à 4,0 mg/., la méthode est valide dans ce domaine. La limite inférieure (limite de quantification) sera calculée, si nécessaire, de façon plus exacte comme décrit dans la section 3. Par ailleurs, on constate que, d'une part la fidélité varie en fonction de la concentration puisque son coefficient de variation passe de 3,9 à 2,2 %, d'autre part, la justesse varie aussi puisque le biais de justesse varie de + 2,2 à - 1,2 %. Cette remarque souligne l'intérêt de procéder aux calculs niveau par niveau. Cependant, ce biais n'a pas d'influence importante sur la validité de la méthode.

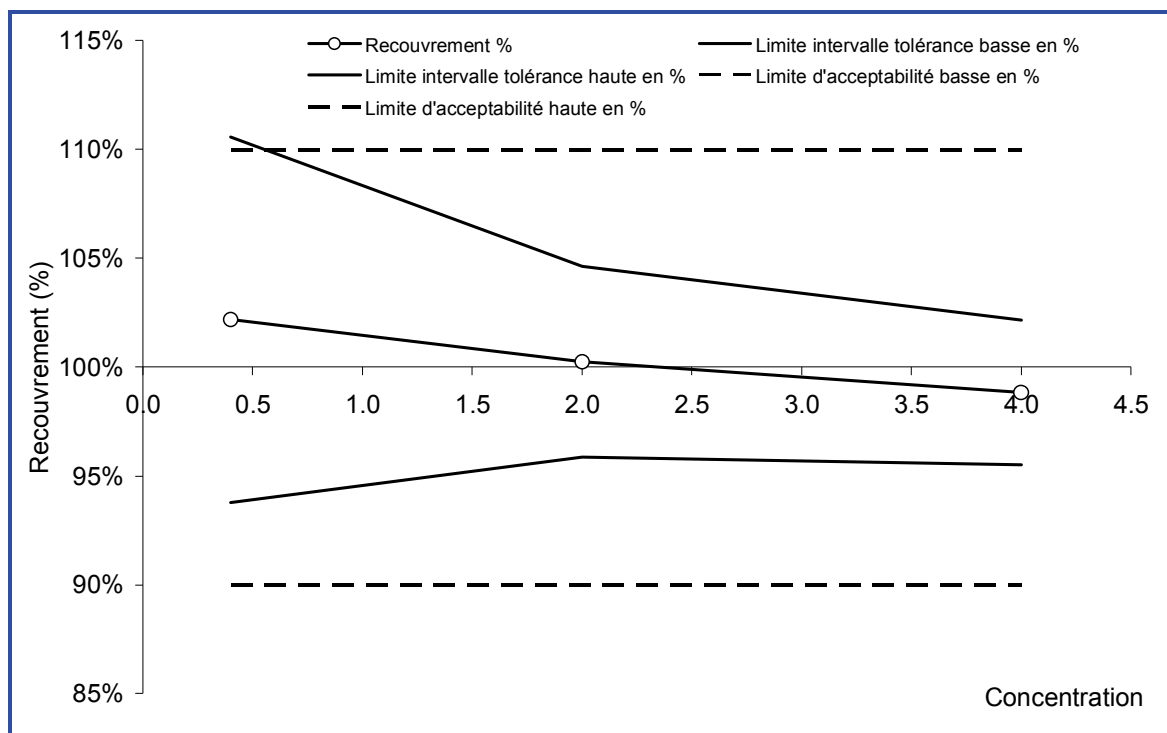


Figure 1 : *profil d'exactitude pour le dosage de la vitamine B3 dans le lait par HPLC*

11. **Conclusion.** On peut donc conclure à la capacité de la méthode à quantifier exactement le nicotinamide dans le lait sur le domaine de validité ainsi défini.

2.2 Utilisation d'un logiciel

Les calculs peuvent être réalisés en utilisant différents logiciels, comme Excel, OpenOffice ou R. Excel® est une marque commerciale de Microsoft. OpenOffice.org est un projet Open Source qui développe une suite bureautique libre de droits, compatible avec les autres standards du marché et qui est téléchargeable à partir de <http://www.openoffice.org/>. R est un environnement de calcul statistique disponible sous la forme d'un logiciel libre téléchargeable à partir de <http://cran.cict.fr/index.html>.

La feuille de calcul suivante permet de calculer les critères de fidélité, de justesse et les limites de tolérance pour un niveau dans un tableur. Elle est extraite d'un fichier modèle qui peut être téléchargé à partir :

http://www.paris.inra.fr/metarisk/downloads/software_programs/excel_templates.

Elle est utilisable sous Excel ou OpenOffice. Les données utilisées sont celles du niveau A de l'exemple.

	A	B	C	D	E	F	G
1	Niveau A						
2	Concentration moyenne théorique	0.4000					
3	Séries	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3		ni	SCEi
4	Jour (Série) 1	0.396	0.389	0.393		3	0.00003
5	Jour (Série) 2	0.404	0.415	0.412		3	0.00007
6	Jour (Série) 3	0.426	0.423	0.422		3	0.00001
7							
8	Nombre de séries (I)	3.0000	=NB(B4:B6)				
9	Nombre de mesures (IJ)	9.0000	=NB(B4:D6)				
10	Nombre de répétitions (J)	3.0000	=SI(F4*B8<>B9;"Calcul impossible";F4)				
11	SCE résiduelle	0.00011	=SOMME(G4:G8)				
12	SCE totale	0.00156	=SOMME.CARRES.ECARTS(B4:D6)				
13	SCE inter-séries	0.00145	=B12-B11				
14	Calcul intermédiaire de s ² B	0.00024	=((B13/(B8-1))-B15)/B10				
15	Variance de répétabilité (s ² r)	0.00002	=B11/(B9-B8)				
16	Variance inter-séries (s ² B)	0.00024	=SI(B14<0;0;B14)				
17	Variance de fidélité (s ² FI)	0.00025	=SOMME(B15:B16)				
18	Fidélité						
19	Concentration moyenne retrouvée	0.40873	=MOYENNE(B4:D6)				
20	Ecart-type de répétabilité (sr)	0.00419	=RACINE(B15)				
21	Ecart-type inter-séries (sB)	0.01536	=RACINE(B16)				
22	Ecart-type de fidélité (sFI)	0.01592	=RACINE(B17)				
23	Justesse						
24	Biais (%)	2.18%	=B19/B2-1				
25	Facteur de couverture de l'intervalle de tolérance						
26	Rapport des variances (R)	13.40469	=B16/B15				
27	Coefficient B ²	0.34951	=(B26+1)/(B10*B26+1)				
28	Nombre de degrés liberté	2.19709	=(B26+1)^2/((B26+1/B10)^2/(B8-1)+(1-1/B10)/B9)				
29	Probabilité tolérance (bêta)	80%					
30	t Student bas	1.88562	=LOI.STUDENT.INVERSE(1-B29;ARRONDI.INF(B28;0))				
31	t Student haut	1.63774	=LOI.STUDENT.INVERSE(1-B29;ARRONDI.SUP(B28;0))				
32	Facteur de couverture (kIT)	1.83676	=B30-(B30-B31)*(B28-ARRONDI.INF(B28;0))				
33	Ecart-type de tolérance (sIT)	0.01828	=B22*RACINE(1+1/(B9*B27))				
34	Intervalle de tolérance						
35	Limite intervalle tolérance basse	0.37516	=B19-B33*B32				
36	Limite intervalle tolérance haute	0.44230	=B19+B33*B32				

Afin de faciliter la mise en œuvre, les principales formules, telles que saisies, sont indiquées dans la colonne C et se réfèrent au contenu de la colonne B.

En ce qui concerne l'étalonnage et le calcul des modèles, il suffit d'utiliser la fonction de régression DROITEREG pour trouver les paramètres. L'organisation de la feuille doit tenir compte du fait qu'on calcule un modèle par série.

3. Critères de validation complémentaires

3.1 Limite de quantification

Principe

Sur la **figure 1** on note qu'il existe une concentration à partir de laquelle au moins une des bornes de l'intervalle de tolérance coupe une des limites d'acceptabilité. Au-dessus de ce seuil, l'analyste peut garantir que la méthode produira une proportion de résultats au moins égale à β . Selon les règles de décision proposées, la méthode est donc valide puisqu'elle permet de garantir les objectifs fixés. En revanche, en dessous de ce seuil, il n'est plus

possible de conclure à la validité. Tout naturellement, on peut proposer de définir ce seuil comme la limite de quantification (LQ) de la méthode. Si on se réfère à l'exemple de la **figure 1**, la LQ se situerait entre les niveaux A et B.

Lorsqu'il est nécessaire d'avoir une très bonne estimation de la limite de quantification, il est judicieux d'utiliser un plan de validation avec au minimum $K = 4$ niveaux. Les deux niveaux les plus bas (notés ici A et B) doivent alors être choisis de façon à encadrer au plus près la LQ supposée. L'interpolation sera alors d'autant plus exacte que cet encadrement sera étroit.

La LQ peut être obtenue exactement en calculant l'abscisse du point d'intersection. Mais les calculs doivent être réalisés sur les valeurs absolues des limites d'acceptabilité et de tolérance car le fait de passer aux valeurs relatives, utilisées en pratique pour la représentation graphique du profil, introduit une interpolation hyperbolique. En effet, le calcul des coordonnées du point d'intersection de deux droites est un problème d'algèbre bien connu. Pour calculer la LQ entre deux niveaux notés A et B, les notations suivantes sont utilisées :

- Z les valeurs absolues lues sur l'axe des ordonnées ;
- X les valeurs de référence fournies par l'axe des abscisses ;
- x_A et x_B les abscisses des deux niveaux A et B ;
- x_{At} et x_{Bt} les ordonnées sur la limite supérieure (ou inférieure) de l'intervalle de tolérance ;
- x_{Aa} et x_{Ba} les ordonnées sur la limite supérieure (ou inférieure) d'acceptabilité ;
- x_{LQ} l'abscisse du point d'intersection, avec $LQ = x_{LQ}$.

Les deux droites peuvent être représentées à l'aide d'un système de deux équations, dont la première traduit la limite de l'intervalle de tolérance (paramètres t_0 l'ordonnée à l'origine et t_1 la pente) et la seconde la limite d'acceptabilité (paramètres a_0 et a_1) :

$$\left. \begin{array}{l} Z = t_0 + t_1 X \\ Z = a_0 + a_1 X \end{array} \right\} \quad (7)$$

On peut noter que :

- a_0 doit être égal à 0 puisque la limite de l'intervalle d'acceptabilité passe toujours par le zéro.
- Si on cherche l'intersection avec la limite supérieure d'acceptabilité $z_{At} = x_A(1 + \lambda)$; il faudra prendre $1 - \lambda$ si on recherche l'intersection avec la limite inférieure.

Pour obtenir la pente t_1 , on utilise une règle de trois :

$$t_1 = \frac{z_{Bt} - z_{At}}{x_B - x_A} \quad \text{Pente (8)}$$

Pour l'ordonnée à l'origine t_0 , on l'obtient à partir de la première équation du système (7) :

$$t_0 = z_{At} - x_A \times t_1 \quad \text{Origine (9)}$$

De façon symétrique :

$$a_1 = \frac{z_{Ba} - z_{Aa}}{x_B - x_A}$$

$$a_0 = z_{Aa} - x_A \times a_1$$

Pour résoudre ce système d'équations, poser :

$$t_0 + t_1 X = a_0 + a_1 X$$

$$X(t_1 - a_1) = a_0 - t_0$$

On obtient ainsi la valeur de x_{LQ} :

$$x_{LQ} = \frac{a_0 - t_0}{t_1 - a_1} \quad (10)$$

Exemple de calcul avec un tableur

Pour illustrer la méthode, on va prendre en compte les résultats de l'exemple obtenus pour les niveaux A (0,4 mg/l) et B (2,0 mg/l), puisque c'est entre ces niveaux que la borne supérieure de l'IT coupe la limite supérieure d'acceptabilité. Ce sont les valeurs absolues qui vont servir. La **figure 2** décrit le mode de calcul sur les valeurs absolues et comment cette opération correspond à une interpolation hyperbolique sur les données relatives. Pour illustrer le calcul dans un tableur, les lignes utiles ont été sélectionnées dans le **tableau 5**.

Ligne	Niveau A	Niveau B
Concentration moyenne théorique	0,40	2,00
Limite intervalle tolérance haute	0,442	2,093
Limite d'acceptabilité haute	0,440	2,200

La feuille de calcul suivante donne les formules de calcul dans un tableur.

	A	B	C	D	E
2		Niveau A	Niveau B		
3	Concentration moyenne théorique	0.40	2.00		
4	Limite intervalle tolérance haute	0.442	2.093		
5	Limite d'acceptabilité haute	0.440	2.200		
6				Formules	
7	Droite	Pente	Origine	Pente	Origine
8	Intervalle tolérance (U)	1.032	0.030	=(C4-B4)/(C3-B3)	=B4-B8*B3
9	Limite d'acceptabilité haute	1.100	0.000	=(C5-B5)/(C3-B3)	=B5-B9*B3
10					
11	Limite de quantification	0.4337		=(C9-C8)/(B8-B9)	

Les formules utilisées sont indiquées dans les colonnes D et E. Finalement, la LQ vaut 0,434 mg/l.

Bien sûr, la limite de quantification dépend des valeurs choisies des limites d'acceptabilité et de la proportion β . Si ces deux critères n'ont pas pu être fixés à l'avance par manque de consignes ou de réglementation, mais si une LQ limite est attendue, par exemple pour un contrôle réglementaire, il est possible de les calculer en retour en se fixant une LQ préétablie. Ce mode de calcul inverse se déduit directement des formules fournies.

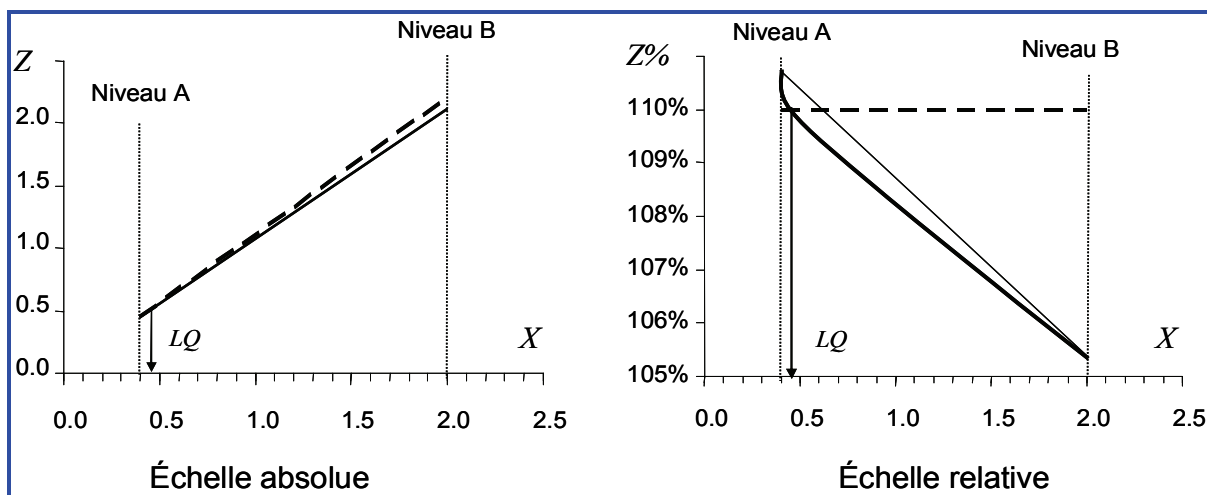


Figure 2 : illustration du mode de calcul de la limite de quantification

3.2 Limite de détection

La méthode du profil d'exactitude ne propose pas d'approche spécifique pour le calcul de la LD, par contre on peut s'appuyer sur les données recueillies pour construire le profil d'exactitude en se référant à diverses approches, dont la liste suivante n'est pas exhaustive :

- ☐ le guide EURACHEM (disponible sur le site www.lne.fr)
- ☐ la série des normes ISO 11843
- ☐ les approches proposées dans l'International conference on harmonisation (ICH), à savoir :
 - 1 - examen visuel. Applicable aux méthodes non instrumentales ou instrumentales.
 - 2 - rapport signal sur bruit. Cette approche n'est possible que lorsqu'on peut observer la ligne de base de la méthode. La détermination du rapport signal sur bruit est effectuée en comparant les signaux obtenus sur des échantillons de faibles concentrations avec ceux d'échantillons blancs. On estime qu'un rapport entre 3/1 et 2/1 est généralement satisfaisant pour estimer la limite de détection.

3.3 Calcul d'un facteur de correction

Le calcul d'un facteur de correction n'est possible que sous deux conditions :

- ☐ il n'existe pas de contrainte réglementaire qui interdise de corriger les résultats avant de les renvoyer au demandeur d'analyse. Le demandeur d'analyse est alors informé du fait que le résultat final est corrigé.
- ☐ l'analyste procède à un examen détaillé des mesures collectées lors de l'étude de validation afin de déterminer la nature du biais systématique afin de choisir un facteur de correction approprié.

Si on observe un biais systématique important dû à un taux de recouvrement moyen inférieur ou supérieur à 100 %, on peut alors proposer d'appliquer un facteur de correction sur les réponses instrumentales, pour corriger ce biais systématique. Par exemple, si on considère que le taux de recouvrement moyen dans tout le domaine est 70 %, on peut prendre un facteur $1/0,7 \approx 1,4$ et l'appliquer à tous les résultats.

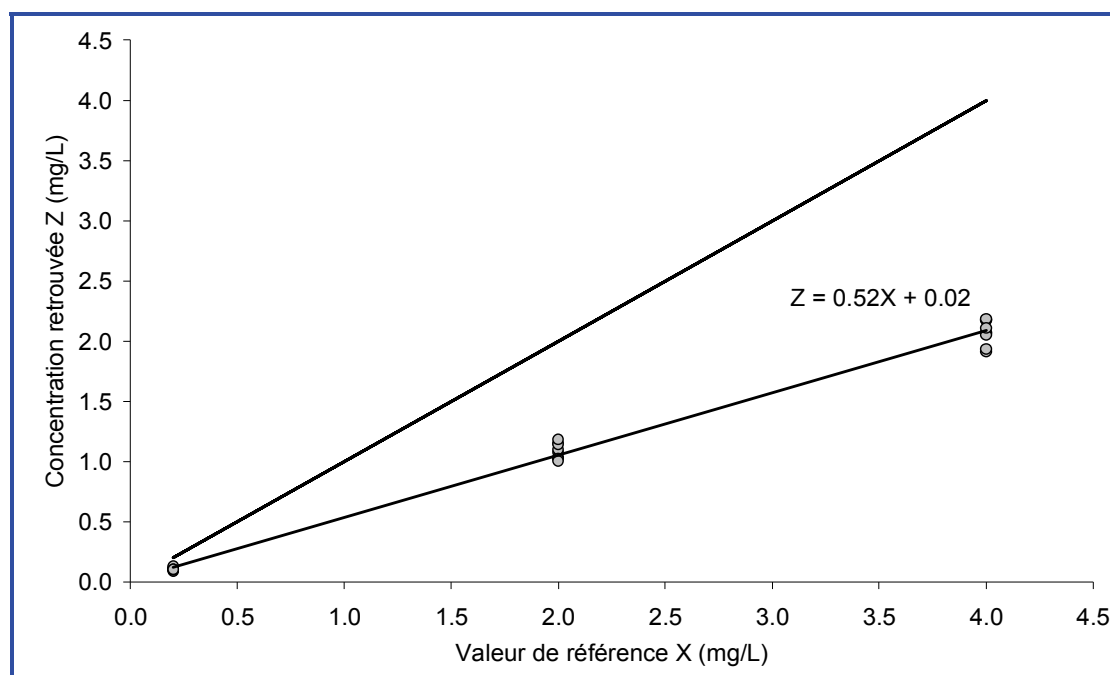


Figure 3 : représentation des concentrations retrouvées en fonction des valeurs de référence permettant de mettre en évidence un effet de matrice et de calculer une droite « moyenne » de recouvrement

Une méthode plus exacte consiste à reporter sur un graphique les concentrations retrouvées en fonction des valeurs de référence. La **figure 3** montre comment mettre en évidence un effet de matrice. On peut alors calculer, sous la forme d'une droite de régression au moindres carrés, l'équation d'une droite dont la pente représente un taux moyen de recouvrement et l'ordonnée à l'origine un biais systématique. Elle permet ainsi de définir deux facteurs de correction possibles :

- l'inverse de la pente permet de corriger un taux de recouvrement non satisfaisant. Dans l'exemple on prendra $1/0,52 \approx 2,0$;
- l'ordonnée à l'origine permet de corriger un biais systématique, par exemple généré par l'intégration d'un pic mal résolu en chromatographie. Dans l'exemple ce type de biais n'est pas important et ne sera pas pris en compte.

Le facteur de correction choisi sera alors inclus dans le mode opératoire de la méthode, par exemple, dans la partie relative à l'expression du résultat. Afin de vérifier la pertinence du facteur de correction choisi, il suffit de recalculer le profil d'exactitude avec les données corrigées. Cependant, pour assurer l'indépendance des mesures, il est préférable d'utiliser deux échantillons de validation et de réaliser l'ensemble des plans d'expérience en parallèle.

La **figure 4** illustre l'effet du facteur de correction 2,0. L'échantillon A dont les mesures n'ont pas été corrigées produit un profil d'exactitude qui mène à conclure que la méthode n'est pas valide. En revanche, les mesures faites sur un deuxième échantillon B puis corrigées par 2,0, conduisent à la conclusion que la méthode est valide si les résultats sont corrigés.

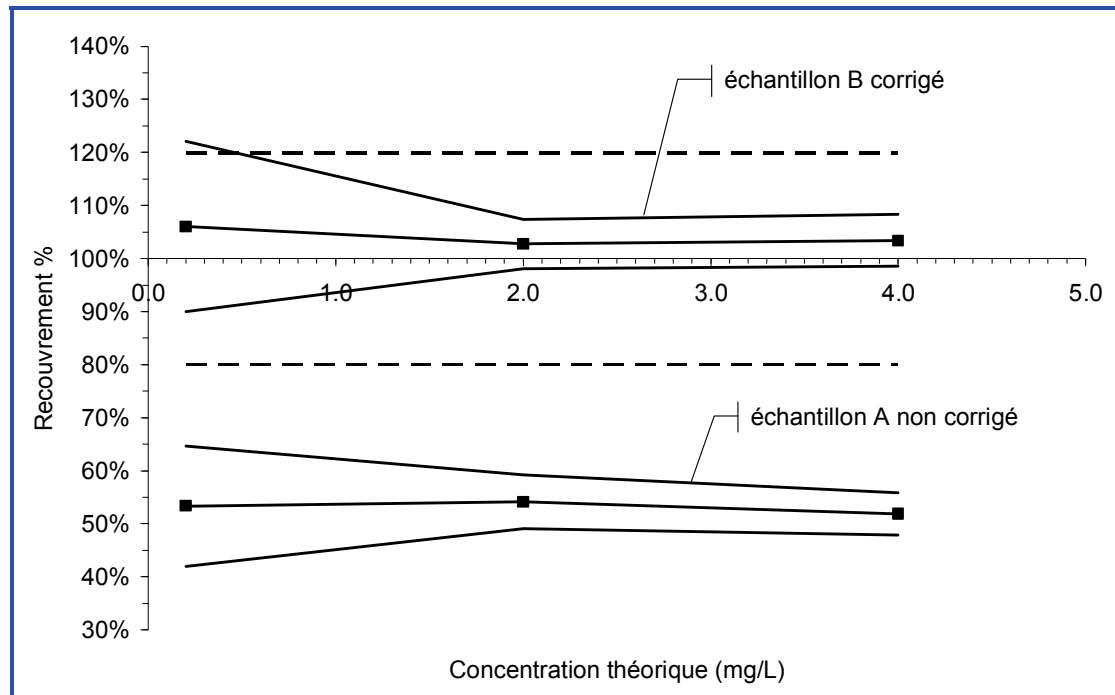


Figure 4 : illustration de l'intérêt du facteur de correction pour valider une méthode

Cette approche est volontairement empirique et ne fait pas appel à des tests de signification de la pente ou de l'ordonnée à l'origine.

3.4 Contribution au calcul de l'incertitude

Cette section propose une façon d'estimer une part, souvent importante, de l'incertitude-type composée. Elle est obtenue à partir des données de validation mais ne remplace pas l'application d'une procédure exhaustive d'estimation de l'incertitude, telle que décrite dans différents fascicules de documentation (Afnor, FD X07-021:1999 et FD V03-116:2001). En particulier, il reste indispensable d'établir la liste des principales sources d'incertitude et de l'organiser sous la forme d'un diagramme causes/effets. Le principe de l'approche proposée consiste à s'appuyer sur le modèle décrit dans le fascicule de documentation ISO/TS 21748. Ainsi, pour un niveau de concentration donné on va écrire que l'incertitude-type élevée au carré vaut :

$$u^2(Z) = u^2(D) + s_{FI}^2$$

Avec Z la valeur du mesurande et D le biais absolu moyen. Si on néglige les incertitudes sur la valeur de référence et d'autres sources d'incertitude éventuelles, on démontre que (pour plus de détails, voir (Feinberg M., 2009)) :

$$u(D) = \sqrt{\frac{s_{FI}^2 - \left(1 - \frac{1}{I}\right) s_r^2}{J}}$$

En réorganisant les calculs, on trouve :

$$u(Z) = s_{FI} \sqrt{1 + \frac{1}{IJB^2}} \quad (11)$$

Avec

$$B = \sqrt{\frac{R+1}{J \times R + 1}} \quad \text{et} \quad R = \frac{s_B^2}{s_r^2}$$

On remarquera alors que la formule (11) est identique à celle de l'écart-type de l'intervalle de tolérance fourni dans Feinberg (2010b). On peut ainsi conclure que l'écart-type de l'intervalle de tolérance s_{IT} permet d'estimer les composantes de l'incertitude liées, par exemple :

- ☐ au modèle d'étalonnage ;
- ☐ à l'environnement du laboratoire ;
- ☐ aux opérateurs ;
- ☐ à la manipulation et au stockage des échantillons lors de leur séjour dans le laboratoire, etc.

Cette liste n'est pas exhaustive et dépend beaucoup des conditions de fidélité intermédiaire choisies pour réaliser les essais. Cependant, elle ne prend pas en compte l'incertitude sur les valeurs de référence qui correspond à ce qu'on appelle la traçabilité des mesurages.

Bibliographie

- AFNOR Norme NF ISO 5725-2:1994, 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. Afnor, Paris
- AFNOR Norme NF X 06-041, Application de la statistique — Fidélité des méthodes d'essai — Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode d'essai normalisée par essais inter-laboratoires. Afnor, Paris
- AFNOR Norme FD X07-021:1999 Normes fondamentales - Métrologie et applications de la statistique - Aide à la démarche pour l'estimation et l'utilisation de l'incertitude des mesures et des résultats d'essais, Afnor, Paris
- AFNOR Norme FD V03-116:2001 Analyse des produits agricoles et alimentaires - Guide d'application des données métrologiques, Afnor, Paris
- FD ISO/TS 21748 :2004. Lignes directrices relatives à l'utilisation d'estimations de la répétabilité, de la reproductibilité et de la justesse dans l'évaluation de l'incertitude de mesure, ISO, Genève
- Feinberg M., (2009) *Labo-Stat : Guide de validation des méthodes d'analyse* Lavoisier Tec&Doc, Paris
- Feinberg M. (2010a) Principes et vocabulaire in Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, numéro spécial : 13-26

- 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
- Commission SFSTP, P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat ; Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches.
- Partie I. : *STP Pharma Pratiques* (2003) 13:3, 101-138
- Partie II. : Statistiques, *STP Pharma Pratiques* (2006) 16:1, 30-60
- Partie III : Exemples d'application, *STP Pharma Pratiques* (2006) 16:2, 87-121
- ISO 11843-2 :2004 Capabilité de détection. Cas du modèle d'étalonnage linéaire, ISO Genève

