



VALIDATION D'UNE METHODE ANALYTIQUE CONTROLE QUALITE EN PRELEVEMENTS



Polycopié de cours destiné aux doctorants pour les essais en physicochimie ou en microbiologie et pour les masters Microbiologie, biochimie, sécurité agroalimentaire et assurance qualité et contrôle alimentaire dans les IAA

Préparé par : Dr. YUCEFI Fatma née KHAOUANI. Année universitaire 2022/2023.

TABLE DES MATIERES

<i>PARTIE I : GENERALITES SUR LES METHODES D'ANALYSES</i>	1
I.1. Objectifs.	2
I.2. Champs D'application.....	3
I.3. Définition Des Termes	3
II.1. Moyenne arithmétique	9
II.2. Le biais.....	9
II.3. Écart-type.....	9
II.4. Coefficient de variation.....	9
II.5. Variance	10
II.6. Facteur de surdispersion u^2	10
II.7. Les tests de valeurs aberrantes	10
II.7.1 Le test de Grubbs.....	10
II.7.2 Le test de Cochran.....	12
II.7.3 Les lois de probabilités.....	15
II.7.3.1. Introduction	15
II.7.3.2. La loi de Poisson.....	15
II.7.3.3. Fidélité intrinsèque des comptages NPP	17
II.7.3.4. La loi binomiale négative	18
III. A : Généralités sur les méthodes d'essais.....	21
III.A.1. Qu'est-ce qu'une méthode ?.....	21
III.A.2. Historique de la validation des méthodes	22
III.A.3. Cycle de vie d'une méthode d'analyse.....	23
III.A.4. Approche générale du processus de validation	24
III.A.5. Quelles sont les informations pertinentes a connaitre au préalable ??.....	27
III.A.6. Dossiers de validation :	29
III.A.7 . Critères de validation :	30
III.A.8. Etapes préliminaires de la validation	32
III. B : Analyse des risques et opportunités.....	34
III.B.1 : termes et définitions	34
III.B.2 .Abréviations :	34
III.B.3 : Activités et responsabilités :.....	34

III.B.4. Gestion des risques :.....	34
III.B.4.1 L'identification :.....	34
III.B.4.2. L'analyse des risques :.....	35
III.B.5. Plan d'action :.....	37
III.B.6. Suivi et surveillance :.....	37
III.B.7. Gestion des opportunités d'amélioration :.....	38
<i>PARTIE II: VALIDATION D'UNE METHODE ANALYTIQUE CONTROLE QUALITE EN PRELEVEMENTS.....</i>	38
CHAPITRE I : Evaluation initiale des performances d'une méthode avec les normes NF T90-210 et NF V03-110.....	38
I.1. La méthodologie.....	40
I.1.1. Le principe.....	40
I.1.2- Les normes.....	40
I.1.3- Partie expérimentale de la validation.....	41
Tableau 05 : Organisation des essais.....	41
I.2 - L'étude de la fonction d'étalonnage.....	42
I.2.1.- Objectif.....	42
I.2.2- Organisation des essais et calculs.....	42
I.2.3. Interprétation des résultats.....	44
I.3. Exemple de la norme NF T90-210.....	45
I.3.1. Organisation des essais.....	45
I.3.2. Détermination des biais relatifs pour chaque étalon.....	47
I.3.3. Conclusion sur la validation de la fonction d'étalonnage avec l'approche EMAétalonnage.....	47
I.3.4. L'étude de la limite de détection et la limite de quantification.....	48
a- Objectif.....	48
b- Estimation avec le bruit de fond de l'enregistrement.....	49
c- Estimation avec des valeurs de blanc non nulles.....	49
d- Vérification d'une limite de quantification correspondant à une valeur proposée avec la norme NF T90-210.....	49
I.3.5. L'étude de l'exactitude.....	53
a. Objectif.....	53
b. Procédure.....	53
Étape 1 : définition de la quantité mesurée.....	53
Étape 2 : définition du domaine de validation.....	53
Étape 3 : sélection des matériaux.....	54
a) Choix des matériaux.....	54

b) Valeurs de référence	54
Étape 4 : organisation des essais et calculs	54
Étape 5 : calcul de l'intervalle de tolérance pour un matériau de validation.....	55
a) Cas de la norme NF T90-210 : $k_{FI} = 2$	56
c) Cas de la norme NF V03-110 :	56
Étape 6 : vérification de l'exactitude de la méthode	56
Étape 7 : représentation graphique de l'exactitude de la méthode	56
c. Exemple avec les données de la norme NF T 90-210	57
d. Exemple avec les données de la norme NF V03-110	59
I.3.6. L'étude des rendements.....	61
a- Objectif.....	61
b- Étude des rendements en fidélité intermédiaire avec la norme NF T90-210.....	61
c- Organisation des essais	61
d- Estimation des paramètres d'exactitude pour un niveau d'ajout	62
I.3.7. L'étude des interférences et de la spécificité	65
a. Application de la norme NF V03-110	65
b. Application de la norme NF T90-210.....	65
I.3.8. L'étude de la répétabilité.....	66
a- Objectif.....	66
b- Organisation des essais et calculs	66
I.3.8. L'étude de la fidélité intermédiaire	68
a- Objectif.....	68
b- Organisation des essais et calculs	68
I.3.9. L'étude de la justesse.....	71
a. Objectif.....	71
b. Application de l'étude de l'exactitude avec la norme NF T90-210	71
c- Comparaison d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence dans des conditions de répétabilité	72
d. Comparaison d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence sans répétition.....	73
Chapitre II: L'estimation des incertitudes	75
II.1. Introduction.....	75
II.2. Evaluation des incertitudes	75
II.4. Utilisation des incertitudes de mesure dans le cadre des déclarations de conformité. 78	
II.6. Estimation des incertitudes de mesure en microbiologie.....	89
II.6.1 Termes et définitions :	89

II.6.2 Principe.....	90
II.6.3 Incertitude technique :	91
II.6.3.a Préparation de l'échantillon pour laboratoire :	91
II.6.3.b Prises d'essai.....	91
II.6.3.c Suspension mère	91
II.6.4. L'incertitude de Reproductibilité intra laboratoire.....	91
II.6.5 Incertitude de matrice :.....	92
II.6.6 Incertitude de distribution :	93
II.7. Estimation des incertitudes de mesure en physicochimie.....	94
II.7.1. Principe.....	94
II.7.2. Calcul de l'incertitude de Reproductibilité intra laboratoire.....	94
II.7.3 Calcul de l'Incertitude du Biais de la méthode et du laboratoire	96
ANNEXE.....	96
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	100.

Liste des Tableaux

Tableau 1 TEST DE GRUBBS	10
Tableau 2 : Table de Grubbs	11
Tableau 3: TEST DE COCHRAN : homogénéité des variances	12
Tableau 4: Cas des méthodes d'essai – ISO/IEC 17025 (ILNAS, 2017).....	31

Liste des figure

Figure 1: Processus d'une méthode analytique	3
Figure 2 : Cycle de vie d'une méthode analytique(Feinberg et al 2004)	24
Figure 3: processus générale de validation analytique.....	26
Figure 4 Diagramme d'ISHIKAWA : analyse des risque par les 5M.....	35

1 ***PARTIE I:***
GENERALITES SUR LES
METHODES D'ANALYSES

Chapitre I : Contexte et objectifs

I.1. Objectifs.

But pédagogique : Conforme aux programmes officiels du LMD, ce polycopié de cours en Validation des méthodes analytiques s'adresse aux étudiants de Master de l'enseignement supérieur en Biochimie, microbiologie, Sécurité agroalimentaire et assurance de la qualité, biologie moléculaire et contrôle de la qualité. Ce document décrit le processus relatif à la vérification/validation et l'actualisation d'une méthode d'analyse.

Le rôle des méthodes d'analyse physiques, chimiques et biochimiques dans la recherche est très important. Les analytes, peuvent être mesurés à l'aide de méthodes cliniques ou biologiques. Les changements permettent de mesurer l'impact sur le ou les résultats obtenus. Il est de la responsabilité de l'analyste de choisir les variantes à utiliser. Une fois qu'une méthode a été mise en place, il est important de l'affiner et de l'évaluer pour déterminer sa pertinence par rapport aux objectifs de recherche.

Dans les secteurs de la production chimique, pharmaceutique, agroalimentaire et autres domaines industriels, où la chimie analytique est un domaine omniprésent présent dans divers aspects de la vie quotidienne. L'utilisation de méthodes analytiques est cruciale pour garantir la qualité et la fiabilité d'un produit donné. Les résultats de fabrication sont les indicateurs clairs et visibles qui permettent d'assurer la sécurité des clients. Actuellement, l'accent est mis sur la précision des mesures en métrologie. Le résultat de ce processus est un ensemble de critères qui nécessitent la vérification des méthodologies d'analyse et l'évaluation des techniques d'estimation. Les besoins de la clientèle étant de plus en plus exigeants, le niveau d'incertitude s'est accru. Mais cette augmentation de l'incertitude a également permis de répondre à ces demandes. L'accent est mis sur le respect de normes et d'exigences prédéterminées.

Le contenu ne se limite pas à une explication brute des méthodes de validation des essais, mais il montre tout ce qu'il faut savoir faire avant, autour et après la mise en œuvre du protocole expérimental et dont l'objectif principal est de démontrer que la méthode utilisée au laboratoire est apte à l'emploi prévu.

Lorsqu'un laboratoire utilise une méthode d'analyse, il peut appliquer un protocole comprenant plusieurs étapes.

- ✚ Étape 1 : la rédaction d'un mode opératoire associée à l'adoption d'une méthode normalisée ou au développement d'une méthode interne.
- ✚ Étape 2 : la rédaction d'un dossier de vérification des performances d'une méthode dans une étude d'évaluation initiale des performances pour décider du transfert de la méthode en routine ou de l'amélioration de la méthode.
- ✚ Étape 3 : la mise en place d'un contrôle qualité
- ✚ Étape 4 : la rédaction d'un dossier d'estimation des incertitudes de mesure.

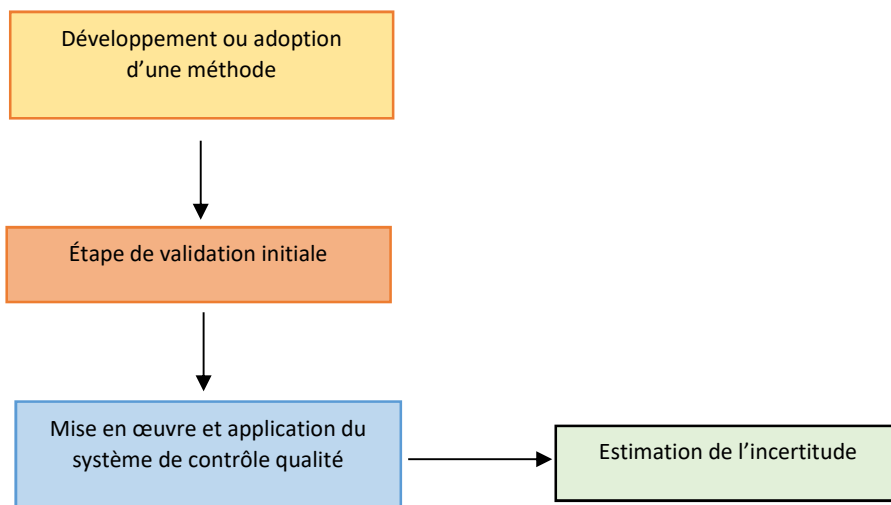


FIGURE 1: PROCESSUS D'UNE METHODE ANALYTIQUE

I.2. Champs D'application : Ce document s'adresse au personnel technique et aux responsables d'activités des secteurs analytiques, aux doctorants qui montent des protocoles expérimentaux

I.3. Définition Des Termes

➤ *Domaine de mesure ou intervalle de mesure*

Set of values of measurands for which the error of a measuring instrument is intended to lie within specified limits.

[Ensemble de valeurs de mesurandes pour lesquelles l'erreur d'un instrument de mesure reste à l'intérieur de limites spécifiées]

Ensemble des valeurs de grandeurs d'une même nature qu'un instrument de mesure ou un système de mesure donné peut mesurer avec une incertitude instrumentale spécifiée, dans des conditions déterminées

NOTE 1 : Dans certains domaines, le terme anglais est “measuring range” ou “measurement range”. En français, le terme « étendue de mesure » est parfois improprement employé.

NOTE 2 : Il convient de ne pas confondre la limite inférieure d'un intervalle de mesure avec la limite de détection.

[Il ne faut pas confondre « intervalle de mesure » et « étendue de mesure ». par exemple, pour un instrument capable, au sens de la définition ci-dessus, de réaliser des mesurages sur un intervalle de mesure de 5 à 50 ppm, son étendue de mesure sera de $50-5=45$ ppm.]

➤ Exactitude

Étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et une valeur vraie d'un mesurande

NOTE 1 : L'exactitude de mesure n'est pas une grandeur et ne s'exprime pas numériquement. Un mesurage est quelquefois dit plus exact s'il fournit une plus petite erreur de mesure.

NOTE 2 : Il convient de ne pas utiliser le terme « exactitude de mesure » pour la justesse de mesure et le terme « fidélité de mesure » pour l'exactitude de mesure. Celle-ci est toutefois liée aux concepts de justesse et de fidélité.

NOTE 3 : L'exactitude de mesure est quelquefois interprétée comme l'étroitesse de l'accord entre les valeurs mesurées qui sont attribuées au mesurande.

[Le document ICH Q2(R1) : 2005 fait une confusion entre « justesse » et « exactitude ». Le concept d'exactitude est qualitatif alors que le concept de justesse est quantitatif.]

➤ Fidélité intermédiaire

Intermediate precision expresses within-laboratories variations: different days, different analysts, different equipment, etc.

[La fidélité intermédiaire exprime les variations intra-laboratoires: différents jours, différents analystes, équipement différent, etc.]

➤ **Justesse**

Étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence.

NOTE 1 : La justesse de mesure n'est pas une grandeur et ne peut donc pas s'exprimer numériquement, mais l'ISO 5725 donne des caractéristiques pour l'étroitesse de l'accord.

NOTE 2 : La justesse de mesure varie en sens inverse de l'erreur systématique mais n'est pas liée à l'erreur aléatoire.

NOTE 3 : Il convient de ne pas utiliser le terme « exactitude de mesure » pour la justesse de mesure et vice versa.

➤ **Limite de détection**

Valeur mesurée, obtenue par une procédure de mesure 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.

NOTE 1 : L'UICPA recommande des valeurs par défaut de α et β égales à 0,05.

NOTE 2 : (Applicable uniquement au texte anglais).

NOTE 3 : Le terme « sensibilité » est à proscrire au sens de limite de détection.

➤ **Limite de quantification**

Lowest amount of analyte in a sample which can be quantitatively determined with suitable precision and accuracy.

[Plus petite quantité d'élément à analyser dans un échantillon qui peut être déterminé quantitativement avec une fidélité et une justesse appropriée.]

Quantification limits are performance characteristics that mark the ability of a chemical measurement process to adequately 'quantify' an analyte.

Note: The ability to quantify is generally expressed in terms of the signal or analyte (true) value that will produce estimates having a specified relative standard deviation (RSD), commonly 10%.

[Les limites de quantification sont des caractéristiques de performance qui indiquent l'aptitude d'un processus de mesure chimique à quantifier un élément à analyser de manière adéquate.]

Note : l'aptitude à quantifier est généralement exprimée par le niveau du signal ou la valeur (vraie) de l'élément mesuré qui produit des estimations dont l'écart-type relatif est spécifié, généralement 10%.

Ainsi : $LQ = kQ \times Q$ où LQ est la limite de Quantification, Q est l'écart-type à ce point et kQ est le coefficient multiplicateur dont l'inverse est égal à l'écart-type relatif sélectionné. La valeur par défaut IUPAC pour kQ est de 10.]

➤ Linéarité

Ability of the method to obtain test results proportional to the concentration of analyte.

[Aptitude d'une méthode à obtenir des résultats proportionnels à la concentration de l'élément à analyser.]

➤ Fidélité

Étroitesse de l'accord entre les indications ou les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées.

NOTE 1 : La fidélité est en général exprimée numériquement par des caractéristiques telles que l'écart-type, la variance ou le coefficient de variation dans les conditions spécifiées.

NOTE 2 : Les conditions spécifiées peuvent être, par exemple, des conditions de répétabilité, des conditions de fidélité intermédiaire ou des conditions de reproductibilité (voir ISO 5725-3:1994).

NOTE 3 : La fidélité sert à définir la répétabilité de mesure, la fidélité intermédiaire de mesure et la reproductibilité de mesure.

NOTE 4 : Le terme « fidélité de mesure » est quelquefois utilisé improprement pour désigner l'exactitude de mesure.

➤ **Robustesse**

The robustness of an analytical procedure is a measure of its capacity to remain unaffected by small, but deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability during normal usage

[La robustesse d'une méthode analytique est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations de faible amplitude mais délibérée des paramètres de la méthode et qui produit une indication de sa fiabilité dans son usage normal.]

➤ **Rugosité**

Ruggedness test is an intra-laboratory study to study the behaviour of an analytical process when small changes in the environmental and/or operating conditions are made, akin to those likely to arise in different test environments. Ruggedness testing allows information to be obtained on effects of minor changes in a quick and systematic manner.

[Un test de robustesse est une étude intra laboratoire visant à étudier le comportement d'une méthode d'analyse lorsqu'on provoque de faibles changements de l'environnement et/ou des conditions opératoires semblables à celles pouvant se produire dans des environnements de travail différents. Le test de rugosité permet d'obtenir des informations sur les effets de changements mineurs d'une manière rapide et systématique.]

➤ **Sensibilité**

Quotient de la variation d'une indication d'un système de mesure par la variation correspondante de la valeur de la grandeur mesurée

NOTE 1 : La sensibilité peut dépendre de la valeur de la grandeur mesurée.

NOTE 2 : La variation de la valeur de la grandeur mesurée doit être grande par rapport à la résolution

➤ **Sélectivité**

Propriété d'un système de mesure, utilisant une procédure de mesure spécifiée, selon laquelle le système fournit des valeurs mesurées pour un ou plusieurs mesurandes, telles que les valeurs de chaque mesurande sont indépendantes des autres mesurandes ou d'autres grandeurs dans le phénomène, le corps ou la substance en cours d'examen

NOTE 1 En physique, il y a un seul mesurande ; les autres grandeurs sont de même nature que le mesurande et sont appliquées à l'entrée du système de mesure.

NOTE 2 En chimie, les grandeurs mesurées impliquent souvent différents constituants dans le système en cours de mesurage et ces grandeurs ne sont pas nécessairement de même nature.

NOTE 3 En chimie, la sélectivité d'un système de mesure est généralement obtenue pour des grandeurs associées à des constituants sélectionnés dont les concentrations sont dans des intervalles déterminés.

NOTE 4 Le concept de sélectivité en physique (voir Note 1) est voisin de celui de spécificité, tel qu'il est quelquefois utilisé en chimie.

➤ **Spécificité**

Ability to assess unequivocally the analyte in the presence of components which may be expected to be present. Typically these might include impurities, degradants, matrix, etc.

[Capacité à évaluer sans équivoque l'élément à analyser en présence de composants susceptibles d'être présents. Cela peut typiquement inclure les impuretés, les produits de dégradation, la matrice, etc.]

CHAPITRE II : Rappels sur les statistiques de base

II.1. Moyenne arithmétique

La moyenne arithmétique \bar{x} fixe la position autour de laquelle se dispersent les résultats. C'est la valeur la plus représentative des résultats observés.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

II.2. Le biais

Est représenté par la formule : $\bar{x} - \text{Réf}$ qui mesure la justesse par rapport à une valeur de référence acceptée, notée *Réf.*

II.3. Écart-type

L'écart-type s indique la dispersion des résultats autour de la moyenne. C'est l'écart quadratique moyen d'une valeur observée par rapport à la moyenne.

$$s = s_{n-1} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

II.4. Coefficient de variation

Le coefficient de variation ou écart-type relatif : $CV = RSD = \frac{s_{n-1}}{\bar{x}}$ exprimé en %.

C'est un critère d'appréciation de la dispersion par rapport à la moyenne.

On utilise le coefficient de variation lorsque l'écart-type varie en fonction de la moyenne des résultats et que l'on veut comparer plusieurs dispersions de résultats.

II.5. Variance

La variance est égale à l'écart-type au carré, $\text{Var} = s^2$.

C'est une invention mathématique car la variance a des propriétés mathématiques, par exemple : les variances « indépendantes » peuvent s'ajouter mais pas les écart-types.

II.6. Facteur de surdispersion u^2

u^2 correspond à un paramètre de la loi binomiale négative qui est la distribution statistique particulière des comptages.

u^2 est défini par la variation supplémentaire du caractère aléatoire d'une loi de Poisson.

Pour des comptages répétés, on calcule : \bar{x} , s et $CV = \frac{s}{\bar{x}} \text{ en } \%$

$$\text{➤ } u^2 = CV^2 - \frac{1}{\bar{x}}$$

➤ Si $CV^2 - \frac{1}{\bar{x}} < 0$ alors la dispersion des résultats est inférieure à la dispersion due

à la loi de Poisson et on considère alors que $u^2 = 0$ dans le calcul de l'incertitude.

II.7. Les tests de valeurs aberrantes

II.7.1 Le test de Grubbs

L'objectif de ce test est de vérifier l'existence de données ou de moyennes aberrantes.

On l'interprète à l'aide de la table de Grubbs.

TABLEAU 1 TEST DE GRUBBS

TEST DE GRUBBS	
Nombre de séries : p =	p
Test simple	conclusions
Critère minimum observé : $G_1 =$	G_1
Critère maximum observé : $G_p =$	G_p
limite pour un risque de 1% : $C_{1\%} =$	$C_{1\%}$
limite pour un risque de 5% : $C_{5\%} =$	$C_{5\%}$

1. Pour les données d'une série ou pour les moyennes de chaque série, on appelle x_1 la valeur la plus basse et x_p la valeur la plus grande.

2. Test simple :

- pour vérifier si la plus petite valeur est aberrante, on calcule $G_1 = \frac{\bar{x} - x_1}{s}$
- pour vérifier si la plus grande valeur est aberrante, on calcule $G_p = \frac{x_p - \bar{x}}{s}$

Avec \bar{x} la moyenne et s l'écart-type des données

3. On lit les valeurs limites dans la table de Grubbs selon p , 5% et 1%.

4. Si un des rapports est supérieur à la valeur de la table au risque de :

1%, la valeur correspondante est considérée comme « aberrante »

5%, la valeur correspondante est considérée comme « suspecte »

Sinon il n'y a pas de valeurs aberrantes.

TABLEAU 2 : TABLE DE GRUBBS

Valeur critique du test de Grubbs		
effectif	5%	1%
3	1,155	1,155
4	1,481	1,496
5	1,715	1,764
6	1,887	1,973
7	2,020	2,139
8	2,126	2,274
9	2,215	2,387
10	2,290	2,482
11	2,355	2,564
12	2,412	2,636
13	2,462	2,699
14	2,507	2,755
15	2,549	2,806
16	2,585	2,852

Valeur critique du test de Grubbs		
effectif	5%	1%
17	2,620	2,894
18	2,651	2,932
19	2,681	2,968
20	2,709	3,001
21	2,733	3,031
22	2,758	3,060
23	2,781	3,087
24	2,802	3,112
25	2,822	3,135
26	2,841	3,157
27	2,859	3,178
28	2,876	3,199
29	2,893	3,218
30	2,908	3,236

II.7.2 Le test de Cochran

Le test de Cochran permet de tester l'homogénéité de p variances issues de n répétitions.

Il est utilisé dans l'analyse de la variance ou dans le calcul d'une fidélité moyenne pour repérer une variance aberrante parmi plusieurs variances.

Son principe est de comparer si le rapport de la variance la plus élevée à la somme des variances est compatible avec l'hypothèse d'égalité des variances.

TABEAU 3: TEST DE COCHRAN : HOMOGENEITE DES VARIANCES

TEST DE COCHRAN : homogénéité des variances	
Nombre de séries : p =	p
Nombre de répétitions par série : n =	n
Critère observé : C_{obs} =	C_{obs} conclusion
limite pour un risque de 1% : $C_{1\%}$ =	$C_{1\%}$
limite pour un risque de 5% : $C_{5\%}$ =	$C_{5\%}$

1. Soit p le nombre de variances calculées et n le nombre de répétitions issues de chaque variance.
2. On calcule le critère C observé issu des écarts-types observés s_i et de l'écart-type maximum obtenu S_{max} .

$$C_{obs} = \frac{S_{max}^2}{\sum_{i=1}^p S_i^2}$$

3. On lit les valeurs limites dans la table de Cochran selon p, n, 1% et 5%.



Par approximation de la loi de Fisher, $C_{\alpha\%} = \frac{F_{\alpha/p}[n-1; (n-1)(p-1)]}{p-1 + F_{\alpha/p}[(n-1); (n-1)(p-1)]}$

Où : $F_{\alpha\%}(ddl1 ; ddl2)$ est la valeur unilatérale de la loi de Fisher à $ddl1$ et $ddl2$ degrés de liberté et par rapport à un risque $\alpha\%$.

La fonction d'EXCEL « INVERSE.LOIF » donne la valeur $F_{\alpha\%}(ddl1 ; ddl2)$.

Tableau 04 : tableau de Fisher

p	n = 2		n = 3		n = 4		n = 5	
	1 %	5 %	1 %	5 %	1 %	5 %	1 %	5 %
2	—	—	0,995	0,975	0,979	0,939	0,959	0,906
3	0,993	0,967	0,942	0,871	0,883	0,798	0,834	0,746
4	0,968	0,906	0,864	0,768	0,781	0,684	0,721	0,629
5	0,928	0,841	0,788	0,684	0,696	0,598	0,633	0,544
6	0,883	0,781	0,722	0,616	0,626	0,532	0,564	0,480
7	0,838	0,727	0,664	0,561	0,568	0,480	0,508	0,431
8	0,794	0,680	0,615	0,516	0,521	0,438	0,463	0,391
9	0,754	0,638	0,573	0,478	0,481	0,403	0,425	0,358
10	0,718	0,602	0,536	0,445	0,447	0,373	0,393	0,331
11	0,684	0,570	0,504	0,417	0,418	0,348	0,366	0,308
12	0,653	0,541	0,475	0,392	0,392	0,326	0,343	0,288

4. $C_{obs} > C_{1\%} \Rightarrow$ la variance S_{max}^2 est considérée comme « aberrante »

$C_{5\%} < C_{\text{obs}} \leq C_{1\%} \Rightarrow$ la variance $\mathbf{S}_{\text{max}}^2$ est considérée comme « suspecte »

$C_{\text{obs}} \leq C_{5\%} \Rightarrow$ les variances sont homogènes



II.7.3 Les lois de probabilités

II.7.3.1. Introduction

La variation aléatoire du nombre de particules entre des prises d'essai parallèles est considérable, même si la suspension est parfaitement homogénéisée (complètement aléatoire) et qu'aucune incertitude technique de mesurage n'est prise en compte.

La variation intrinsèque inévitable est une propriété des suspensions et elle est identique pour toutes les méthodes de comptage microscopiques et de comptage des colonies.


Elle peut être modélisée mathématiquement par la distribution de Poisson.


La distribution de Poisson ne tient pas totalement compte de la variation intrinsèque des comptages NPP.


II.7.3.2. La loi de Poisson

La loi de Poisson est la loi correspondant à la distribution entièrement aléatoire des nombres de particules lors de l'échantillonnage d'une suspension parfaitement homogénéisée. On note $X \equiv P(\mu)$

La distribution probable d'un comptage de colonies dépend de m où :

 m est le nombre moyen de la distribution.

 $\sigma = \sqrt{m}$ est l'écart-type de la distribution.

 $CV = \sqrt{\frac{1}{m}}$ est le coefficient de variation de la distribution.

Le modèle de Poisson peut être utilisé pour l'estimation de la plus faible incertitude statistique théorique de tout comptage de colonies

Exemple : un comptage de boîte simple d'un échantillon d'une suspension parfaitement homogénéisée, par exemple 48 colonies, présente une fidélité relative théorique de

$$CV = u_{\text{rel}} = 1/\sqrt{48} = 0,14 \text{ (14 \%)}.$$

Application pour la détermination d'un intervalle de confiance à 95% sur un comptage x

La probabilité d'obtenir $X=k$ colonies pour un comptage de x colonies est :

$$\text{Prob}[X = k] = e^{-x} \times \frac{x^k}{k!} = \text{LOI.POISSON}(k; x; 0)$$

$$\text{Prob}[X \leq k] = \text{LOI.POISSON}(k; x; 1)$$

Nombre de colonies observées x	15
Limite inférieure à 95% autour de x	7,36
Limite supérieure à 95% autour de x	22,58

✚ L'intervalle de confiance à 95% sur le résultat $x=15$ avec la loi de Poisson de paramètre 15 est [7,36 ; 22,58].

Étape 1 : pour chaque valeur de k , calculer la probabilité $\text{Prob}[X \leq k]$.

Étape 2 : trouver les entiers et les probabilités $\text{Prob}[X \leq k]$ qui encadrent la probabilité cumulée 2,5% et 97,5%.

Étape 3 : calculer la limite inférieure correspondant à 2,5% et la limite supérieure correspondant à 97,5% selon l'interpolation linéaire suivante :

$$k_{2,5\%} = k_{\text{sup}} - \frac{p_{\text{sup}} - 2,5\%}{p_{\text{sup}} - p_{\text{inf}}} \quad k_{97,5\%} = k_{\text{sup}} - \frac{p_{\text{sup}} - 97,5\%}{p_{\text{sup}} - p_{\text{inf}}}$$

Tableau 05: calcul des limites

k	P[X ≤ k]
0	0,00%
1	0,00%
2	0,00%
3	0,02%
4	0,09%
5	0,28%
6	0,76%
7	1,80%
8	3,74%
9	6,99%
10	11,85%
11	18,48%
12	26,76%
13	36,32%
14	46,57%
15	56,81%
16	66,41%
17	74,89%
18	81,95%
19	87,52%
20	91,70%
21	94,69%
22	96,73%
23	98,05%

$k_{2,5\%} = k_{\text{sup}} - \frac{p_{\text{sup}} - 2,5\%}{p_{\text{sup}} - p_{\text{inf}}}$	k_{sup}	8
	p_{sup}	3,74%
	p_{inf}	1,80%

$k_{97,5\%} = k_{\text{sup}} - \frac{p_{\text{sup}} - 97,5\%}{p_{\text{sup}} - p_{\text{inf}}}$	k_{sup}	23
	p_{sup}	98,05%
	p_{inf}	96,73%

II.7.3.3. Fidélité intrinsèque des comptages NPP

La fidélité relative d'une série de dilutions uniques de n_t tubes en termes d'écart-type dans l'échelle logarithmique naturelle est exprimée par :

$$u(\ln M) = \frac{(1 - e^{-x})}{x \sqrt{n_p e^{-x}}}$$

Avec x le nombre le plus probable d'organismes par tube, qui est estimé par :



$$x = \ln \left(\frac{n_t}{n_t - n_p} \right)$$

où

M est la valeur NPP;

x est le nombre d'organismes par tube;

n_t est le nombre de tubes;

n_p est le nombre de tubes positifs.

La fidélité relative est complètement définie par le nombre total de tubes et le nombre de tubes positifs par :

$$u_{\text{rel}}(M) = u_{\ln}(M) = \frac{1}{\ln \left(\frac{n_t}{n_t - n_p} \right)} \cdot \sqrt{\frac{n_p}{n_t (n_t - n_p)}}$$

$$u_{\text{min}}(\ln M) = \frac{1,24}{\sqrt{n_t}}$$

Pour des comptages NPP avec f dilutions multiples, la fidélité exacte est indiquée par :

$$s_{\lg}(M) = 0,58 \sqrt{\frac{\lg f}{n_t}}$$

II.7.3.4. La loi binomiale négative

La loi binomiale négative est la distribution statistique particulière «surdispersée » des comptages.

Le facteur de surdispersion est l'incertitude aléatoire supplémentaire de la détermination excédentaire de la distribution de Poisson, mesurée en termes d'écart-type relatif.

$$u^2 = CV^2 - \frac{1}{m}$$

Si $\frac{1}{u^2}$ est un entier alors

$$\text{Prob}[X = k] = \frac{x^k}{k!} \times \frac{1}{(1 + x \times u^2)^{\frac{1}{u^2}}} \times \frac{(\frac{1}{u^2} + k - 1)!}{(\frac{1}{u^2} - 1)! \times (\frac{1}{u^2} + x)^k} = \text{LOI.BINOMIALE.NEG}(k; \frac{1}{u^2}; \frac{1}{1 + x \times u^2})$$

Sinon, procéder à une extrapolation entre les deux nombres entiers qui encadrent $\frac{1}{u^2}$.

Remarque : si $u=0$, la loi de binomiale négative est égale à la loi de Poisson.

➤ **Application pour la détermination d'un intervalle de confiance**

Valeur x	15
Facteur de surdispersion : u^2	0,12
Limite inférieure à 95% autour de x	4,09
Limite supérieure à 95% autour de x	29,25

🚩 L'intervalle de tolérance à 95% sur le résultat $x=15$ avec la loi binomiale négative dont le facteur de surdispersion $u^2=0,12$ est [4,09 ; 29,25].

Étape 1 : trouver les entiers qui encadrent $1/u^2$ puis calculer u_{inf}^2 et u_{sup}^2 correspondant à l'inverse de chaque entier trouvé.

$$u^2 = 0,12 \Rightarrow 1/u^2 = 8,33$$

$$u_{\text{inf}}^2 = 1/8 \text{ et } u_{\text{sup}}^2 = 1/9$$

Étape 2 : pour chaque valeur de k, calculer la probabilité $p_1 = \text{Prob}[X = k]$ selon la loi binomiale négative de paramètre u_{inf}^2 et la probabilité $p_2 = \text{Prob}[X = k]$ selon la loi binomiale négative de paramètre u_{sup}^2 .

Étape 3 : pour chaque valeur de k, calculer la probabilité $\text{Prob}[X = k]$ selon la loi binomiale négative de paramètre u^2 avec l'interpolation linéaire suivante :

$$P[X = k] = p_{\text{inf}} + (p_{\text{sup}} - p_{\text{inf}}) \times \left(\frac{1}{u^2} - \frac{1}{u_{\text{inf}}^2} \right)$$

Étape 4 : pour chaque valeur de k, calculer la probabilité Prob[X ≤ k].

Étape 5 : trouver les entiers et les probabilités Prob[X ≤ k] qui encadrent la probabilité cumulée 2,5% et 97,5%.

Étape 6 : calculer la limite inférieure correspondant à 2,5% et la limite supérieure correspondant à 97,5% selon l'interpolation linéaire suivante :

$$k_{2,5\%} = k_{\text{sup}} - \frac{p_{\text{sup}} - 2,5\%}{p_{\text{sup}} - p_{\text{inf}}}$$

$$k_{97,5\%} = k_{\text{sup}} - \frac{p_{\text{sup}} - 97,5\%}{p_{\text{sup}} - p_{\text{inf}}}$$

k	p _{inf}	p _{sup}	P[X = k]	P[X ≤ k]
0	0,02%	0,01%	0,02%	0,02%
1	0,11%	0,08%	0,10%	0,12%
2	0,33%	0,26%	0,30%	0,43%
3	0,71%	0,59%	0,67%	1,10%
4	1,28%	1,11%	1,22%	2,32%
5	2,00%	1,80%	1,93%	4,25%
6	2,83%	2,62%	2,76%	7,02%
7	3,69%	3,52%	3,63%	10,65%
8	4,51%	4,39%	4,47%	15,12%
9	5,23%	5,19%	5,22%	20,34%
10	5,80%	5,84%	5,81%	26,15%
11	6,19%	6,30%	6,23%	32,37%
12	6,39%	6,56%	6,45%	38,82%
13	6,41%	6,63%	6,48%	45,31%
14	6,27%	6,51%	6,35%	51,66%
15	6,00%	6,24%	6,08%	57,74%
16	5,63%	5,85%	5,70%	63,44%
17	5,18%	5,37%	5,24%	68,68%
18	4,69%	4,85%	4,74%	73,43%
19	4,19%	4,31%	4,23%	77,65%
20	3,69%	3,77%	3,71%	81,37%
21	3,21%	3,25%	3,22%	84,59%
22	2,76%	2,77%	2,76%	87,35%
23	2,34%	2,34%	2,34%	89,69%
24	1,97%	1,95%	1,97%	91,66%
25	1,65%	1,61%	1,63%	93,29%
26	1,36%	1,31%	1,35%	94,64%
27	1,12%	1,06%	1,10%	95,74%
28	0,91%	0,85%	0,89%	96,64%
29	0,74%	0,68%	0,72%	97,36%
30	0,59%	0,54%	0,58%	97,93%

$k_{2,5\%} = k_{\text{sup}} - \frac{p_{\text{sup}} - 2,5\%}{p_{\text{sup}} - p_{\text{inf}}}$	k _{sup}	5
	p _{sup}	4,25%
	p _{inf}	2,32%

$k_{97,5\%} = k_{\text{sup}} - \frac{p_{\text{sup}} - 97,5\%}{p_{\text{sup}} - p_{\text{inf}}}$	k _{sup}	30
	p _{sup}	97,93%
	p _{inf}	97,36%

CHAPITRE III : Généralités sur les méthodes d'essais et analyse des risques et opportunités

III. A : Généralités sur les méthodes d'essais

Un laboratoire doit privilégier l'usage de méthodes reconnus, que ce soit des méthodes normalisées nationales ou internationales, des méthodes officielles ou des méthodes publiées par des organisations professionnelles sur lesquelles un consensus est établi. Lorsque de telles méthodes ne sont pas disponibles ou lorsque le laboratoire souhaite utiliser d'autres méthodes il a la possibilité à condition que ces méthodes soient entièrement décrites et qu'elles soient validées, c'est à dire que leurs performances aient été évaluées et acceptées

III.A.1. Qu'est-ce qu'une méthode ?

Il ne s'agit pas ici de faire référence à une définition normalisée de ce mot mais de conceptualiser les phases analytiques, donc une méthode est une succession de trois étapes systématiques :

- **1ère étape : Préparation de l'échantillon**
- **2ème étape : Mesure**
- **3ème étape : Traitement des données**

Cela a pour conséquence immédiate, par exemple, que la fidélité d'une méthode exprimée sous forme d'un écart-type est toujours supérieure ou égale à celle de l'équipement qui a permis à réaliser la mesure puisque dans la majorité des cas la préparation de l'échantillon a un effet non négligeable sur la fidélité totale du résultat.

Si on procède à une analyse un peu plus détaillée de cette approche, on constate que l'étape 2 fournit des valeurs brutes sur lesquelles il est possible de réaliser des calculs statistiques conduisant ainsi à une forme de « validation » de la mesure. En fait ceci est réalisé durant l'étape de « qualification initiale » puis de « requalification périodique » de l'équipement.

De la même façon, l'étape 3 fournit des valeurs – celles de l'étape 2 après traitement. Il est donc là aussi possible de faire des calculs sur ces données et de « valider » cette étape. Là aussi, ceci est réalisé au travers de ce qu'on appelle la « validation informatique ». Ceci montre

que les étapes 2 et 3 peuvent être intrinsèquement validées et que ce sont d'ailleurs deux exigences de la norme ISO 17025 : 2017.

III.A.2. Historique de la validation des méthodes

Les premières publications sur la validation analytique remontent aux années 1985, à la suite des rencontres entre l'industrie pharmaceutique américaine et l'USP (United States Pharmacopeia)

- En avril 1986, un texte intitulé « Current concept for the validation of compendial assays » est publié dans pharmacopeil forum .
- L'année suivante 1987, une note explicative européenne sur la validation analytique (CEE III/844/87) est publiée. Cette note sera adoptée en août 1989 .
- Toujours en 1989, la pharmacopée américaine publie, dans son 9ème supplément, «1225», "validation of compendial methods", texte officialisé dans cette même pharmacopée le 1er janvier 1990 .
- En 1992, la société française SFSTP publie, dans STP Pharma Pratiques, un guide pour la validation analytique .
- Le sujet est ensuite repris par L'ICH (International Conference on Harmonisation) qui publie en 1994 un premier document sur les définitions, « Validation of analytical procedure Terminology and definitions (Q2A) » . Cette publication est complétée en 1996 par une seconde publication (Q2B) expliquant comment on peut conduire une validation analytique « Validation of analytical procedure: Methodology » .
- En 1994, Food and Drug Administration (FDA) entame ce sujet par la publication des lignes directives « Validation of chromatographic methods » par le “Center for Drug Evaluation and Research”.
- En 1995, FDA publie une procedure de validation, « Guideline on validation of analytical procedures, definitions and terminology » . Cette publication est suivie, en 1997, par une autre développant la methodologie de la validation, « Guideline on validation of analytical procedures, methodology » .
- La société française SFSTP, en 1997, republie, dans STP Pharma Pratiques, un guide pour la validation analytique dédié aux procédures bioanalytiques, « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation
- En 1998, FDA republie le Guide pour les industries « Guidance for Industry: Bioanalytica Methods Validation for Human Studies (Draft guidance) » .

- Eurachem propose en 1998 le guide “ The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to methods validations and related topics” .
- FDA, Draft republic en août 2000 « Guidance for Industry - Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation » .
- En 2002, la commission européenne fait sortir la décision 2002/657/CEE (SANCO) .
- La pharmacopée américaine (USP) republic, en 2003, General information , « Validation of compendial methods ».
- En vue d'une harmonisation, la société française SFSTP republic dans STP Pharma Pratiques en deux parties : « Validation des procédures analytiques quantitatives ; Harmonisation des démarches »

III.A.3. Cycle de vie d'une méthode d'analyse

Les méthodes d'analyse sont souvent décrites comme des procédures immuables et figées. C'est un peu l'impression que donnent les manuels et les autres recueils de normes techniques [Feinberg.2009].

Or, comme tout procédé de production, les méthodes d'analyse naissent, évoluent et meurent. Pour comprendre clairement le rôle et la place de la validation dans la vie d'une méthode d'analyse, il est intéressant de décrire son cycle de vie depuis le moment où elle est choisie jusqu'au moment où on l'abandonne (Feinberg., 2009).

Les domaines d'application des méthodes d'analyse sont très divers, allant du contrôle des médicaments, de la bio-analyse dans le cadre des études cliniques et des études de bioéquivalence jusqu'aux études environnementales et agro-alimentaires. Quelle que soit la méthode d'analyse utilisée et quel que soit le domaine d'application, chaque laboratoire doit être en mesure de produire des résultats fiables lors de l'exécution de l'analyse pour un client ou pour des fins réglementaires, afin de répondre au problème analytique et donc à celui d'ordre socio-économique (Rozet.2008).

Dans le domaine analytique, deux types de méthodes sont mentionnés : les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives. Dans cette dernière catégorie, la mise en œuvre de ces méthodes (le cycle de vie) peut s'articuler en quatre grandes phases généralement successives telles que l'illustre la Figure 2 (Feinberg et al 2004) :

1. une phase de Sélection où des objectifs et des conditions opératoires initiales sont définis;
2. une phase de Développement, avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences;
3. une phase de Validation (Validation Interne/Externe) précédée, selon les cas, d'une phase de pré-validation;
4. une phase d'application en routine (usage en routine), incluant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle ou une revalidation

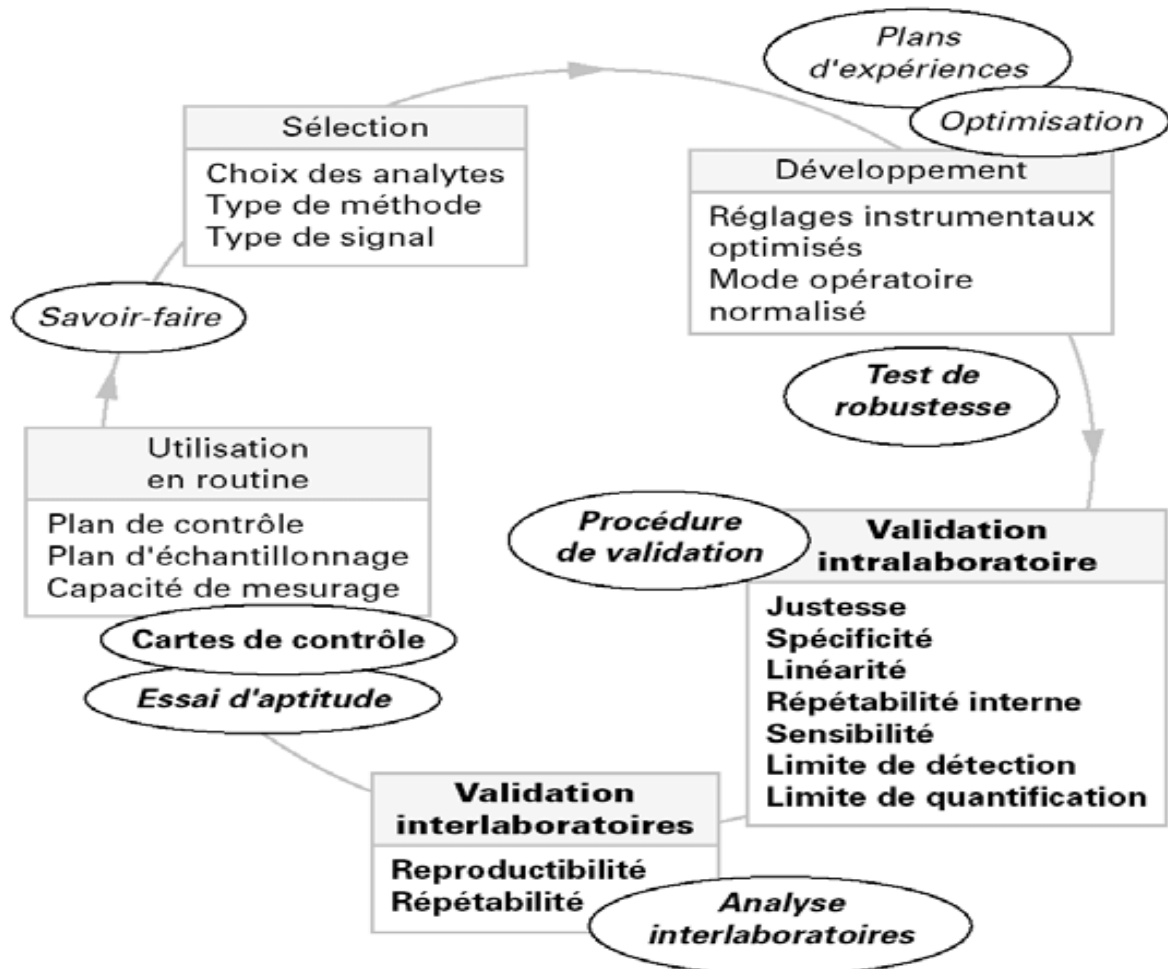


FIGURE 2 : CYCLE DE VIE D'UNE METHODE ANALYTIQUE

III.A.4. Approche générale du processus de validation

Les diagrammes qui suivent constituent un résumé des différentes étapes de la validation. Bien entendu, certaines étapes peuvent être inversées mais l'expérience montre que, dans la plupart des cas, ces logigrammes sont optimisés pour minimiser le nombre d'essais à réaliser. Ils sont suivis d'explications étape par étape.

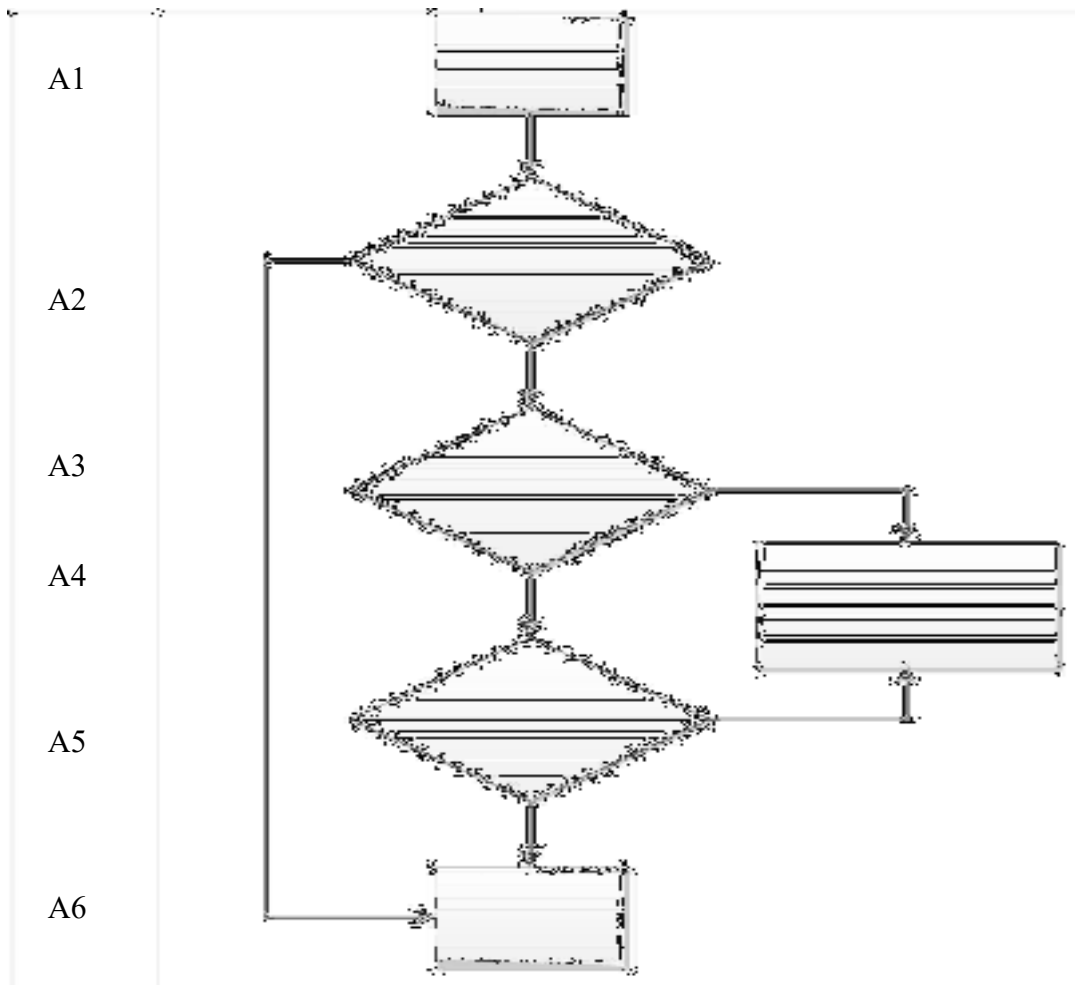


FIGURE 2: PROCESSUS GENERALE DE VALIDATION ANALYTIQUE

A1 – méthode utilisée par le laboratoire : le processus de validation ne peut débuter que si le laboratoire a déjà une bonne connaissance / expérience / maîtrise de la méthode

A2 – une méthode de référence existe : une méthode est dite de référence si elle est normalisée au niveau international, régional ou national (ISO, CEI, CEN, IANOR, ...) mais aussi si elle est publiée par un organisme reconnu (International Atomic Energy Agency, United State Pharmacopoeia, par exemple). Il est possible d'étendre cette notion de méthode de référence à des étalons de référence certifiés. Dans ce cas, les étapes A3 et A5 doivent être court-circuitées.

A3 – la méthode de référence et la méthode utilisée sont identiques : si les deux méthodes sont strictement identiques, la validation n'est pas nécessaire mais le laboratoire doit apporter la preuve qu'il obtient des résultats conformes (cf. paragraphe 7.2.2 de la norme ISO 17025 :

2017). Il s'agit donc alors de « vérification » et non plus de « validation ». Le laboratoire peut utiliser des matériaux de référence, participer à des campagnes d'intercomparaison, ...

A4 – le laboratoire doit démontrer son aptitude à mettre en œuvre la méthode : cette aptitude ne relève pas seulement du fait que le personnel est qualifié, que l'équipement est étalonné ou que les conditions d'environnement sont maîtrisées. L'objectif est de démontrer, par tout moyen pertinent, que les résultats obtenus sont satisfaisants. la norme ISO 17025 : 2017 propose cinq possibilités mais le laboratoire peut en concevoir d'autres.

A5 – les différences peuvent être justifiées : si les différences peuvent être justifiées scientifiquement en interne ou au travers d'une publication scientifique valable, elles peuvent être considérées comme mineures et sans influence sur le résultat. Bien entendu, des traces (c'est-à-dire un document) doivent être établies et conservées.

A6 – la validation est nécessaire : donnée de sortie du processus de validation de la méthode analytique

III.A.5. Quelles sont les informations pertinentes à connaître au préalable ??

Afin de réaliser au mieux la vérification / validation de ses méthodes, le laboratoire analyse et définit pour chaque examen la nature des opérations à mettre en œuvre en fonction :

Du type de flexibilité : Méthodes « fournisseurs », dites adoptées, avec uniquement une vérification de performance sur site. Méthodes adaptées ou développées en interne, avec une validation de méthode.

Du type de méthodes (quantitatif ou qualitatif), schématiquement, on distingue deux types de méthodes d'examen :
o Les méthodes de type quantitatif : elles fournissent un résultat chiffre, sur une échelle continue à partir de la mesure d'un signal en relation directe avec une quantité (analyte, molécule, substance, cellule ou organisme, ...) ou une activité donnée de l'analyte (enzymes). Sont également assimilées au type quantitatif, les examens qui fournissent un résultat de type quantitatif, extrapolé à partir de la mesure d'un signal continu quantifiable (absorbance par exemple).

Les méthodes de type qualitatif : Le résultat de ce type de méthode n'apporte pas d'information sur la quantité de l'analyte (cellule ou organisme), mais seulement sur sa présence ou son absence (positif/négatif), ou l'identification de la caractéristique recherchée.

On peut classer dans cette catégorie tous les examens où aucune mesure d'une donnée quantifiable ne peut être déterminée et ceux dont le résultat est obtenu par l'observation de la réaction, par comparaison avec des témoins positif et négatif notamment. (COFRAC, 2011). La validation ne doit intervenir qu'après la mise au point complète de la méthode. L'objectif de la validation est de démontrer que la méthode employée permet d'atteindre des objectifs techniques définis à l'avance.

Une distinction entre validation intra-laboratoire (ou in-house) et inter-laboratoires (ou en collaboration) peut être faite : La première est universelle et requise pour toutes les méthodes, la seconde est surtout applicable aux méthodes qui seront utilisées par plusieurs laboratoires ou dont les résultats servent lors d'échanges commerciaux ou de contrôles officiels.

Par exemple, dans l'industrie pharmaceutique, il est inutile (voire impossible) de procéder à la validation inter-laboratoire d'une méthode qui ne sert en interne qu'à l'étude d'une molécule non encore mise sur le marché. Par contre, dans les industries agroalimentaires, il faut toujours procéder à une validation inter-laboratoires pour une méthode qui sert à mesurer la conformité d'une denrée lors d'un échange commercial (FEINBERG M., 2004).

L'objectif spécifique de la méthode d'analyse doit être défini avant de commencer toute validation. En effet, comme indiqué précédemment, une méthode doit être adaptée à un but donné (FEINBERG M., 2009).

Le domaine de la validation des méthodes analytiques est défini par plusieurs textes réglementaires ou des guidelines tels que l'ICH, la FDA, EURACHEM, IUPAC, AOAC. Ces derniers définissent les critères de validation à tester, mais ne proposent pas des approches expérimentales et se limitent surtout à des notions générales (FEINBERG M., 2009).

III.A.6. Dossiers de validation :

Les éléments ayant conduit à la vérification / confirmation ou la validation des méthodes doivent être rassemblés dans un dossier disponible pour les auditeurs techniques qui peuvent le réclamer avant l'audit au laboratoire ou l'examiner durant l'audit.

Celui-ci permet de tracer les principales étapes de la validation, décrites ci-dessous:

Les méthodes mises en œuvre doivent être documentées (principe de la méthode, échantillons, réactifs, mode opératoire détaillé, utilisé pour la vérification /confirmation ou la validation ...).

Une analyse pas à pas du processus permet par exemple: De confirmer le stricte suivi des prescriptions et du mode opératoire de la méthode normalisée/ reconnue;

- D'identifier, le cas échéant, les écarts par rapport à la méthode normalisée/ reconnue;
- D'identifier les points critiques du processus;
- D'identifier les points qui nécessitent une vérification expérimentale des performances de la méthode (ILNAS, 2017).

La vérification / confirmation consiste à déterminer les caractéristiques de la méthode reconnue ou normalisée telle qu'elle est appliquée au sein du laboratoire et de vérifier que ces caractéristiques sont compatibles avec celles définies le cas échéant par la méthode normalisée ou avec celles fixées par le responsable technique du laboratoire.

Il appartient aux auditeurs techniques de définir dans leur métier le caractère reconnu/normalisé ou non de la méthode. En effet elles peuvent être définies aussi dans des réglementations, voire des publications professionnelles, internationales ou scientifiques, ce qui peut leur donner un caractère «normatif» au sens du référentiel.

De même, le laboratoire doit documenter les écarts éventuels d'application par rapport à la méthode reconnue/normalisée et apporter la preuve que ces écarts ne modifient pas les performances de la méthode. En cas de modifications «mineures» d'une méthode reconnue ou normalisée, la validation doit être adaptée aux besoins et ne sera pas nécessairement aussi poussée que pour une méthode nouvellement développée. (ILNAS, 2017).

III.A.7 . Critères de validation :

La validation analytique permet d'évaluer les performances de la méthode dans un contexte analytique préalablement déterminé par l'étude d'un certain nombre de paramètres communément appelés « critères de validation » au moyen d'outils statistiques appropriés.

Généralement, les critères suivant sont utilisés pour évaluer la validité d'une méthode :

- La Spécificité-sélectivité ;
- La Fonction de réponse (courbe d'étalonnage) ;
- La Linéarité ;
- La Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) ;
- La Justesse ;
- L'exactitude ;
- La Limite de détection (LD) ;
- La Limite de quantification (LQ) ;
- La Sensibilité.
- Il y a lieu de noter que d'autres critères spécifiques sont exigés par les domaines d'activités concernés, par exemple :
 - Stabilité de l'analyte ;
 - Rendement d'extraction ;
 - Effet de dilution ;

Plusieurs documents normatifs et réglementaires ont défini les critères de validation à tester d'une façon hétérogène. nous a donc semblé nécessaire de définir Termes courants dans les recommandations et source de confusion.

Le tableau ci-dessous résume les caractéristiques à évaluer pour les méthodes d'essais et d'étalonnages.

TABLEAU 4: CAS DES METHODES D'ESSAI – ISO/IEC 17025 (ILNAS, 2017).

Caractéristiques à évaluer	Méthodes quantitatives		Méthodes qualitatives	
	Confirmation d'une méthode reconnue/ normalisée	Validation d'une méthode	Confirmation d'une méthode reconnue/ normalisée	Validation d'une méthode
Identification et maîtrise des facteurs d'influence / <u>risques résiduels</u>	X	X	X	X
<u>Répétabilité</u>	X ³	X	si pertinent	si pertinent
<u>Fidélité intermédiaire</u>	X	X	si pertinent	si pertinent
Variabilité inter-opérateurs	si pertinent (<i>p.ex. méthodes qualitatives non automatisées</i>)			
<u>Justesse / Exactitude</u>	X *	X *	N.A.	N.A.
<u>Incertitude de mesure</u>	X	X	N.A.	N.A.
Fonction d'étalonnage/ Domaine de <u>linéarité</u>	si pertinent	si pertinent	N.A.	N.A.
<u>Taux de récupération</u>	si pertinent (<i>p.ex. méthodes de chimie analytique</i>)		N.A.	N.A.
<u>Limite de détection</u>	si pertinent	X	si pertinent	X
<u>Limite de quantification</u>	si pertinent	X	N.A.	N.A.
<u>Spécificité analytique</u>	si pertinent	X	si pertinent	X
<u>Seuil de décision</u>	si pertinent (<i>p.ex. analyses radiotoxicologiques</i>)		N.A.	N.A.
Contamination	si pertinent (<i>en cas de risque, selon la situation (qualification d'équipement!)</i>)			
<u>Robustesse de la méthode et stabilité des réactifs</u>	si pertinent	X	si pertinent	X
Comparaison de méthodes	si pertinent (<i>p.ex. méthodes alternatives en microbiologie</i>)			
Données informatiques et de calcul	si pertinent (<i>au moins pour les transferts mono et bidirectionnels</i>)			

III.A.8. Etapes préliminaires de la validation

La norme NF EN ISO/CEI 17025 (2017) définit les prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages, d'essais et d'analyses.

- ✚ 6 Exigences relatives aux ressources.
- ✚ 7 Exigences relatives aux processus :
 - ✚ 7.2 Sélection, vérification et validation des méthodes
 - ✚ 7.6 Évaluation de l'incertitude de mesure
 - ✚ 7.7 Assurer la validité des résultats
 - a) utilisation de matériaux de référence ou de matériaux de contrôle de la qualité;
 - j) comparaisons intralaboratoires;

Lorsqu'un laboratoire utilise une méthode d'analyse, il peut appliquer un protocole comprenant plusieurs étapes.

- ✚ Étape 1 : la rédaction d'un mode opératoire associée à l'adoption d'une méthode normalisée ou au développement d'une méthode interne.
- ✚ Étape 2 : la rédaction d'un dossier de vérification des performances d'une méthode dans une étude d'évaluation initiale des performances pour décider du transfert de la méthode en routine ou de l'amélioration de la méthode.
- ✚ Étape 3 : la mise en place d'un contrôle qualité
- ✚ Étape 4 : la rédaction d'un dossier d'estimation des incertitudes de mesure.

La validation d'une méthode ne peut être réalisée sans une bonne connaissance préalable de la méthode et de sa mise en œuvre. Comme l'exige le paragraphe 7.2.2 de la norme ISO 17025 : 2017, le laboratoire doit prendre en considération les facteurs qui contribuent à l'incertitude totale lors du développement de méthodes. Même si les facteurs peuvent être considérés comme limités :

- Aux équipements
- Aux facteurs humains
- Aux conditions ambiantes
- A la traçabilité métrologique
- A l'échantillonnage
- A la manipulation des échantillons
- Aux consommables
- A la méthode elle-même

Chacun d'entre eux doit être étudié en détail en vue de déterminer ceux qui doivent être maîtrisés.

La seconde étape consiste à établir un mode opératoire dont le degré de détail évite toute mauvaise interprétation.

La dernière phrase est bien sûr celle vers laquelle il faut se tourner.

Si la méthode utilisée est basée sur une méthode de référence (une norme, une réglementation technique, ...), cette référence doit être citée et le processus de validation doit démontrer l'équivalence des résultats obtenus par les deux méthodes sur l'ensemble du domaine d'application et du domaine de mesure spécifié pour la validation.

C'est ce que l'on appellera « la validation extrinsèque » parce qu'il existe une référence externe par rapport à laquelle « mon » laboratoire et tous les autres laboratoires peuvent comparer leurs résultats.

III. B : Analyse des risques et opportunités

III.B.1 : termes et définitions

- ✚ **Risque** : Danger éventuel, plus ou moins prévisible, inhérent à une situation ou à une activité
- ✚ **Niveau de risque** : importance d'un risque ou de combinaisons de risques exprimée en terme de combinaison de conséquences et de leur vraisemblance
- ✚ **Analyse des risques** : processus mis en œuvre pour comprendre la nature d'un risque et pour déterminer son niveau de risque
- ✚ **Opportunité** : toute occasion favorable qui peut aboutir à l'amélioration des résultats ou des performances du système.

III.B.2 .Abréviations :

G : Gravité

IC : indice de criticité

AMDEC : Analyse des modes de défaillances, de leurs effets et leur criticité **SWOT** : Strengths Weaknesses Opportunities Threats.

M : Diagramme d'ISHIKAWA

III.B.3 : Activités et responsabilités :

Les laboratoires contribuent au traitement des risques identifiés, selon les outils de la qualité (AMDEC, 5 M, SWOT...), ainsi que la proposition des opportunités d'amélioration.

III.B.4. Gestion des risques :

L'analyse des risques est un processus en plusieurs étapes visant à atténuer l'impact des risques sur les opérations analytiques. Différents secteurs utilisent l'analyse des risques pour s'assurer que tous les aspects de l'entreprise sont protégés contre les menaces potentielles. La réalisation d'une analyse régulière des risques permet également de minimiser la vulnérabilité de l'organisme aux événements inattendus

III.B.4.1 L'identification :

L'identification des risques a pour but de repérer les risques potentiels avant qu'ils ne se transforment en non conformités. Les risques entourant les activités analytiques sont identifiés par tout le personnel à la base des périmètres bien déterminés tel que :

- L'assurance que le système de management atteigne les résultats escomptés ;
- L'impartialité ;

- Le risque entourant les règles de décisions utilisées dans les rapports d'essais ;
- Tous risques qui influent sur les activités analytiques (personnel, équipements, traçabilité métrologique, méthodes des essais, gestion des locaux).

Pour bien mettre en claire tous les risques ou les agents qui cause ou pourrais produireun effet observé ou avoir une influence sur la méthode on va utiliser la règle des 5M ou le diagramme d'ICHIKAWA ((Matériel, Milieu, Matière, main d'œuvre, méthode).Figure 4

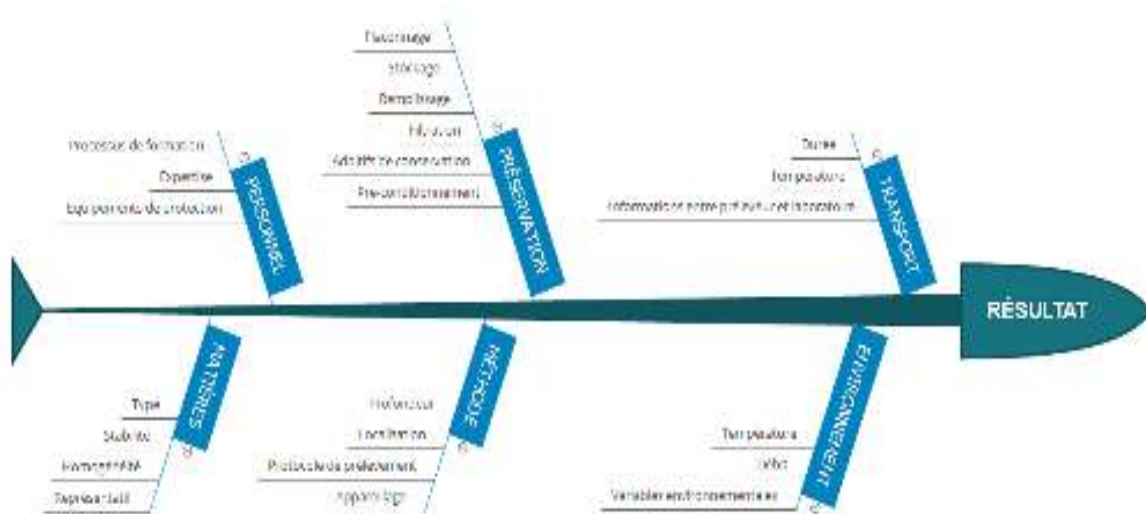


FIGURE 3: DIAGRAMME D'ISHIKAWA : ANALYSE DES RISQUE PAR LES 5M

Un formulaire de gestion des risques est ouvert une fois le risque lié à l'activité analytique est détecté .

III.B.4.2. L'analyse des risques :

A partir de l'identification d'un risque, il est nécessaire d'évaluer la criticité de la situation de la façon la plus objective possible.

Il convient, à cet effet, de noter le risque en tenant compte de :

- La fréquence d'exposition (F) ;
- La gravité du dommage pouvant survenir (G) ;

Les échelles de cotation suivantes sont données à titre indicatif, elles peuvent être adaptées aux spécificités du laboratoire .

➤ **L'échelle de cotation pour la gravité (G) :**

Gravité	Echelle
Faible (impact négligeable)	1
Moyen (impact mineur)	2
Grave (impact majeur)	3
Très grave (impact critique)	4

➤ **L'échelle de cotation pour la fréquence d'apparition (F) :**

Fréquence d'apparition	Echelle
Faible (moins d'une fois par an)	1
Moyenne (plus d'une fois par an)	2
Fréquente (plus d'une fois par mois)	3
Très fréquente (plus d'une fois par semaine)	4

➤ **Calcul de l'indice de Criticité (IC) :**

Après la notation des 02 échelles, l'indice de criticité sera calculé par la formule suivante :

$$IC = G \times F$$

➤ **Classement des risques :**

Il s'agit de hiérarchiser les risques identifiés afin de passer, de leur inventaire, à la proposition d'un plan d'actions cohérent et construit en fonction des priorités.

		Gravité du dommage			
		1	2	3	4
Fréquence d' apparition	1	1	2	3	4
	2	2	4	6	8
	3	3	6	9	12
	4	4	8	12	16

	Niveau 1 : Critique
	Niveau 2 : Majeur
	Niveau 3 : Mineur

III.B.5. Plan d'action :

Des actions adéquates sont mises en place pour éliminer voire réduire la fréquence d'apparition ou de diminuer les séquences selon leur niveau de risque. Ces dernières sont enregistrées dans un plan d'action qui s'intéresse en premier lieu aux risques les plus critiques.

Ce plan doit permettre :

- de planifier des actions ;
- de déterminer comment les mettre en œuvre ;
- de surveiller leur mise en œuvre dans les délais ;
- de mettre à jour les analyses de risques.

III.B.6. Suivi et surveillance :

L'efficacité des actions entreprises pour la maîtrise des risques devrait signifier la baisse de la criticité, c'est à dire que les actions ont eu pour effets :

- une baisse de la gravité ou/et ;
- une baisse de la fréquence d'apparition ou/et ;
- une augmentation de la capacité des équipes à faire face à ce type de problème.

Une réévaluation des risques doit être effectuée pour actualiser l'état et le niveau de risque, en fonction de la réalisation effective des actions.

III.B.7. Gestion des opportunités d'amélioration :

L'opportunité d'amélioration est une démarche obligatoire, elle s'effectue logiquement après avoir examiné et évalué les types des résultats suivants :

- Des analyses des risques et opportunités ;
- Des audits internes et/ou externes ;
- Des questionnaires de satisfaction ;
- Des essais d'aptitude ;
- De la revue périodique des procédures ;
- Des travaux non conformes,....

Tout le personnel peut participer plus efficacement à l'identification des risques et des opportunités d'amélioration car il est au cœur du système.

Un plan d'action est mis en œuvre selon le degré d'amélioration de ces opportunités. Ces actions seront évaluées pour déterminer leur efficacité.

Le suivi des actions pour l'amélioration est enregistré dans le formulaire de suivi des opportunités d'amélioration.

2 **PARTIE II :**
VALIDATION D'UNE
METHODE ANALYTIQUE
CONTROLE QUALITE EN
PRELEVEMENTS

CHAPITRE I : Evaluation initiale des performances d'une méthode avec les normes NF T90-210 et NF V03-110

I.1. La méthodologie

I.1.1. Le principe

Il s'agit d'aider les laboratoires engagés dans une démarche d'accréditation Cofrac selon la norme ISO 17025 à répondre à la validation des méthodes en tenant compte des coûts, des risques et des possibilités techniques et le temps (extrait de la norme ISO 17025, § 5.4.5.3 note 3).

Le paragraphe 5.4.5.1 de la norme ISO 17025 indique : « *la validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies* ».

I.1.2- Les normes

Dans les deux normes NF V 03 110 (2010) « Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude » et NF T 90 210 (2009) « Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire », il s'agit de vérifier que les résultats obtenus sur un matériau associé à une valeur de référence *dans des conditions de fidélité intermédiaire* sont acceptables par rapport à une *limite d'acceptabilité* ou un *écart maximal acceptable (EMA)* défini préalablement et provenant d'une exigence réglementaire ou normative ou fixée par le client ou le laboratoire.

Remarques :

- L'étude de la spécificité abordée dans les versions précédentes des deux normes a disparu car elle est remplacée par l'étude de l'exactitude avec des ajouts utilisés comme matériaux de référence.
- La norme T90-210 demande d'étudier les interférences spécifiques et non spécifiques en mettant en œuvre les moyens adaptés à la mise en évidence d'éventuelles interférences et à leur prise en compte.

Des normes ou des guides de validation de méthodes ont été publiés dans de nombreux domaines (Médicaments, matériaux au contact, pesticides...). Ils suivent généralement des principes voisins de ceux des deux normes présentées ci-dessus et les plans d'expérience sont proches de ceux détaillés dans la partie expérimentale.

Les laboratoires ont l'opportunité de suivre ces normes ou guides spécifiques dans leur domaine d'application et d'adapter en conséquence la partie expérimentale.

Le classement en 2 catégories adoption/adaptation de méthode tel qu'il est présenté dans le tableau 05 et la figure 04 précédent doit être cependant suivi.

I.1.3- Partie expérimentale de la validation

Tableau 05 : Organisation des essais

Domaine d'étalonnage ou de calibration						Domaine de validation sur des matrices							
Valeurs des étalons					Blanc		MR 1 (LQ)		MR 2		MR 3		
niv1	niv2	niv3	niv4	niv5	Réf0	Réf1		Réf2		Réf3			
25	50	100	200	400	0	25		100		300			
± 20%	± 10%	± 10%	± 10%	± 10%		± 60%		± 20%		± 20%			
Date	Valeurs d'information (Aire, Do, signal, etc...)					Mesure 1	Mesure 2	Mesure 1	Mesure 2	Mesure 1	Mesure 2	Mesure 1	Mesure 2
J1	0,041	0,087	0,170	0,377	0,749	8,5	8,0	22,6	22,2	95,1	96,2	309,1	306,3
J2	0,039	0,082	0,169	0,344	0,654	8,0	8,0	24,5	24,1	100,5	102,1	287,3	291,1
J3	0,045	0,091	0,185	0,376	0,731	9,0	8,5	22,7	23,1	90,2	93,4	297,5	294,8
J4	0,050	0,096	0,199	0,392	0,749	8,5	8,5	25,4	25,8	88,4	86,8	292,7	295,1
J5	0,045	0,092	0,184	0,359	0,679	6,5	7,5	24,1	24,7	97,3	98,2	302,4	301,9

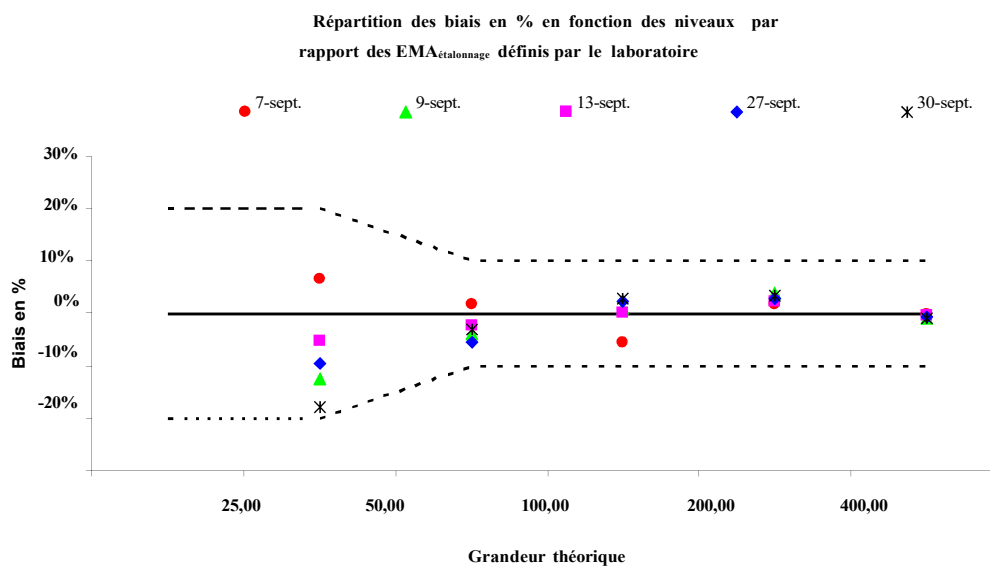


Figure 04 : Représentations graphiques des résultats

I.2 - L'étude de la fonction d'étalonnage

I.2.1.- Objectif

Il s'agit d'aider l'utilisateur qui souhaite vérifier ou choisir la fonction mathématique (fonction linéaire ou quadratique ou autre, forcée par 0 ou non ou pondérée) à utiliser à partir d'étalons de valeur de référence attendue ou théorique.

Pour cela, l'évaluation de la fonction d'étalonnage ou de calibrage doit être réalisée en conditions de fidélité intermédiaire (jours différents et opérateurs différents) : par exemple, une gamme préparée et analysée par jour sur cinq jours.

Les résultats sont interprétés par autour de la valeur de référence de chaque étalon par rapport à un écart maximal acceptable (EMA) qui caractérise la performance exigée de la fonction d'étalonnage ou de calibrage.

L'interprétation des résultats ne peut pas s'effectuer avec le coefficient de corrélation R ou le coefficient de détermination R².

Il n'est pas nécessaire d'effectuer cette étude lorsque la méthode ne nécessite pas une fonction d'étalonnage ou de calibrage faisant intervenir l'analyte. Par exemple, si la méthode d'analyse utilise une pesée pour déterminer la quantité d'analyte présente alors il suffit de vérifier la justesse de la balance.

I.2.2- Organisation des essais et calculs

Étape 1 : réaliser le plan d'expérience suivant :

- Choisir $p \geq 5$ niveaux situés dans le domaine supposé, si c'est possible.
- Analyser $n \geq 5$ gammes d'étalonnage dans des conditions de fidélité intermédiaire à partir d'un étalon primaire et de pureté définie.

Étape 2 : construire le tableau des valeurs d'informations obtenues sur des étalons de valeur de référence attendue ou théorique.

	Étalon de valeur de référence acceptée				
	Niv 1 x_1	...	Niv j x_j	...	Niv p x_p
Gamme n°1	$y_{1,1}$		$y_{1,j}$		$y_{1,p}$
...					
Gamme n°i	$y_{i,1}$		$y_{i,j}$		$y_{i,p}$
Gamme n°n	$y_{n,1}$		$y_{n,j}$		$y_{n,p}$

Où y_{ij} est la $i^{\text{ème}}$ valeur d'information mesurée sur l'étalon de niveau j et de valeur de référence x_j .

Étape 3 : construire le tableau à l'aide des valeurs retrouvées \hat{x}_{ij} par la fonction d'étalonnage inverse appliqué à y_{ij} et représenter graphiquement les valeurs.

	Étalon de valeur de référence acceptée			
	x_1		x_j	x_p
Gamme n°1	$\hat{x}_{1,1}$		$\hat{x}_{1,j}$	$\hat{x}_{1,p}$
...				
Gamme n°i	$\hat{x}_{i,1}$		$\hat{x}_{i,j}$	$\hat{x}_{i,p}$
Gamme n°n	$\hat{x}_{n,1}$		$\hat{x}_{n,j}$	$\hat{x}_{n,p}$

Où \hat{x}_{ij} est la valeur retrouvée par la fonction d'étalonnage inverse appliquée à y_{ij}

Le traitement statistique est basé sur les valeurs d'informations transformées en valeurs retrouvées pour chaque étalon préparé et en fonction du type de modèle choisi (linéaire, quadratique, pondéré en $1/x$, etc..).

- Pour un modèle linéaire ($y = ax + b$) appliqué à une gamme d'étalonnage, la grandeur

retrouvée sur l'étalon $\hat{x} = \frac{y - b}{a}$

où a est la pente et b l'ordonnée à l'origine.

- Pour un modèle quadratique de type $y = ax^2 + bx + c$, la grandeur retrouvée \hat{x} est

calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$\hat{x} = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4a(c - y)}}{2a}$$

Remarque : si l'appareil indique les valeurs retrouvées alors l'étape 2 n'est pas nécessaire.

Étape 4 : construire le tableau des biais b_{ij} et/ou des biais relatifs $b_{ij}\%$ des valeurs retrouvées par rapport aux valeurs théoriques des étalons.

	Étalon de valeur de référence acceptée			
	x_1		x_j	x_p
Gamme n°1	$b_{1,1}$ ou $b_{1,1}\%$		$b_{1,j}$ ou $b_{1,j}\%$	$b_{1,p}$ ou $b_{1,p}\%$
...				
Gamme n°i	$b_{i,1}$ ou $b_{i,1}\%$		$b_{i,j}$ ou $b_{i,j}\%$	$b_{i,p}$ ou $b_{i,p}\%$
Gamme n°n	$b_{n,1}$ ou $b_{n,1}\%$		$b_{n,j}$ ou $b_{n,j}\%$	$b_{n,p}$ ou $b_{n,p}\%$
Moyenne des biais	_____		_____	_____
	$b_{i,1}$		$b_{i,j}$	$b_{i,p}$
Écart-type des biais	$S_{b_{i,1}}$		$S_{b_{i,j}}$	$S_{b_{i,p}}$

Où

$b_{i,j}$ est le biais correspondant à l'écart entre \hat{x}_{ij} et $x_{i,j}$, $b_{ij} = \hat{x}_{ij} - x_{i,j}$

$b_{i,j}\%$ est le biais relatif correspondant à $b_{ij}\% = b_{ij} / x_{i,j}$

$x_{i,j}$ est la valeur du niveau j pour la gamme d'étalonnage i.

$y_{i,j}$ est la valeur d'information de la gamme d'étalonnage i pour l'étalon de niveau j

$\hat{x}_{i,j}$ est la valeur retrouvée par la fonction d'étalonnage inverse n°i appliquée à valeur d'information $y_{i,j}$ obtenue pour la grandeur x_j du niveau j.

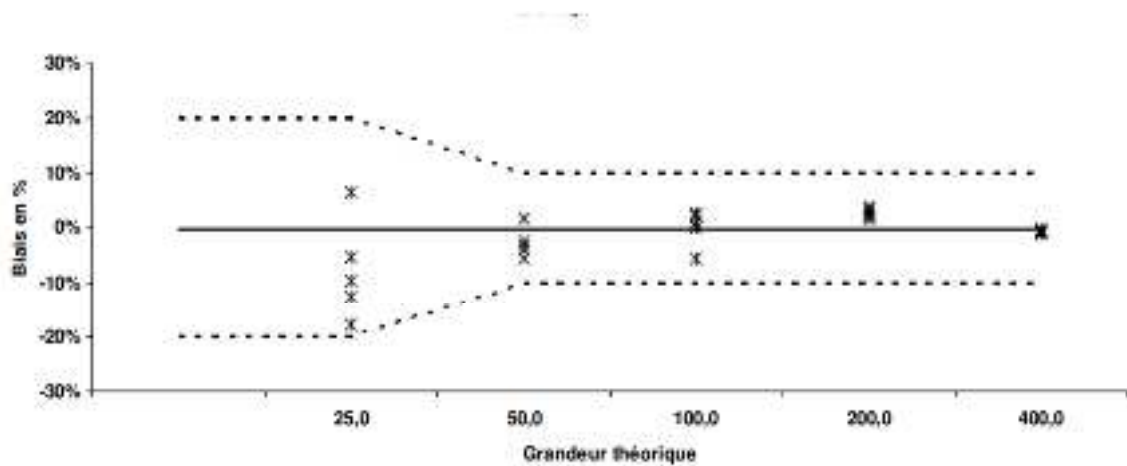
1.2.3. Interprétation des résultats

La fonction d'étalonnage ou de calibrage est acceptée dans le domaine [x_1 ; x_p] lorsque tous les biais ou biais relatifs observés sur chaque étalon analysé sont acceptables à partir d'un écart maximal acceptable (EMA) qui caractérise la performance exigée de la fonction d'étalonnage ou de calibrage. L'écart maximal acceptable (EMA) est issu d'une exigence réglementaire ou normative ou fixée par l'expérimentateur en cohérence avec un critère d'acceptation de contrôle qualité ou avec l'incertitude de l'analyse.

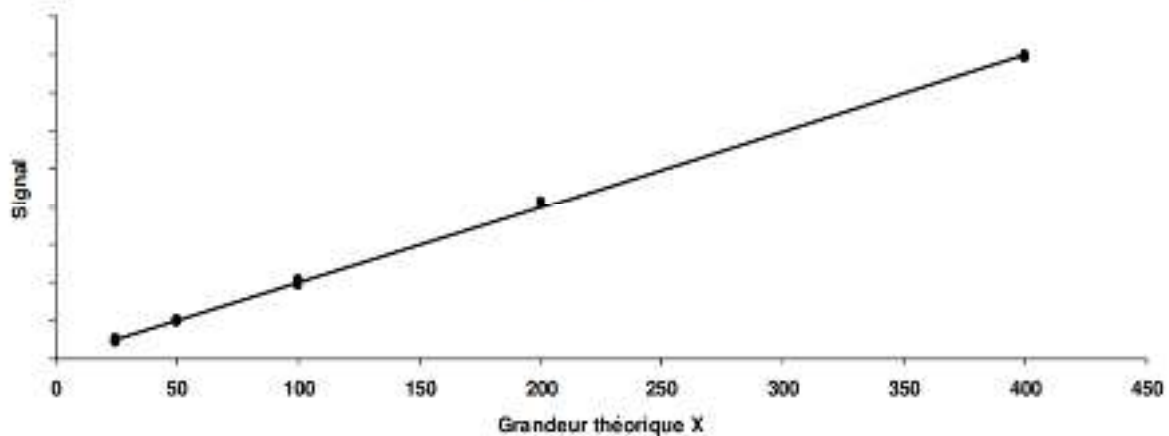
Par exemple : pour l'étalon de niveau 1 proche de la LQ alors $EMA_{\text{étalon niv 1}} = 20\%$ à 60% . pour les autres étalons alors $EMA_{\text{étalon}} = 5\%$ à 20% .

L'EMA doit être justifié.

Répartition des biais en % en fonction des niveaux par rapport des EMA_{étalonnage} définis par le laboratoire



Représentation d'une gamme d'étalonnage



I.3. Exemple de la norme NF T90-210

Objectif

Le laboratoire souhaite évaluer la fonction d'étalonnage linéaire à partir d'étalons : 25 – 50 – 100 – 200 – 400.

I.3.1. Organisation des essais

Les valeurs d'informations et les coefficients de chaque droite de régression lors de 5 étalonnages sont indiqués dans le tableau suivant :

A partir des valeurs d'informations, calculer les coefficients de chaque modèle de régression pour chaque série d'étalonnage.

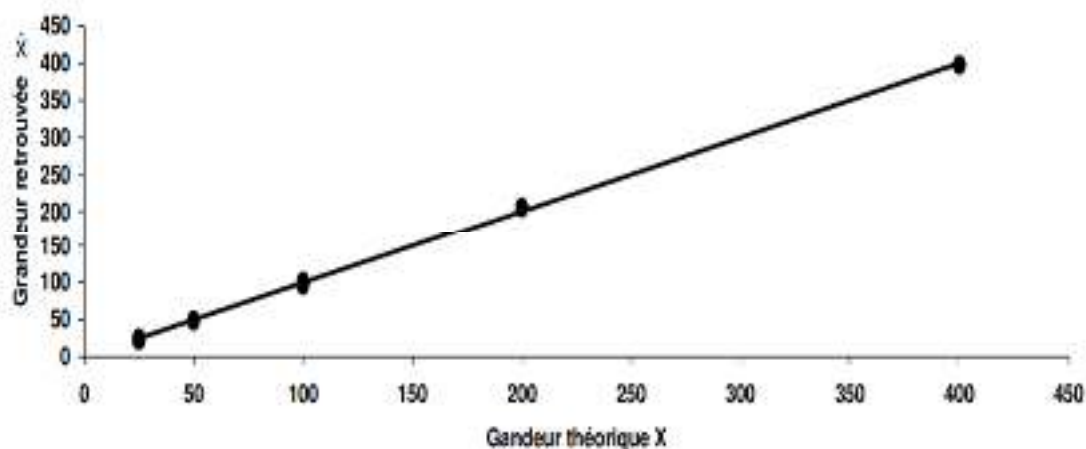
Série	niv1	niv2	niv3	niv4	niv5	y = ax + b	
	25	50	100	200	400	a	b
7-oct.	0,041	0,087	0,170	0,377	0,749	0,0019	-0,0096
22-oct.	0,039	0,082	0,169	0,344	0,654	0,0016	0,0030
25-oct.	0,045	0,091	0,185	0,376	0,731	0,0018	0,0015
27-oct.	0,050	0,096	0,199	0,392	0,749	0,0019	0,0078
30-oct.	0,045	0,092	0,184	0,359	0,679	0,0017	0,0103

Détermination des grandeurs retrouvées de chaque étalon

Les grandeurs retrouvées sur chaque étalon lors de chaque étalonnage sont :

Série	niv1	niv2	niv3	niv4	niv5
	25	50	100	200	400
7-oct.	26,652	50,868	94,564	203,539	399,378
22-oct.	21,895	48,078	101,052	207,609	396,367
25-oct.	23,714	48,814	100,106	204,328	398,038
27-oct.	22,587	47,227	102,399	205,780	397,008
30-oct.	20,551	48,413	102,951	206,693	396,392

I.3.2. Détermination des biais relatifs pour chaque étalon



Si \hat{x}_{ij} est la grandeur retrouvée de l'étalon n^oi pour la gamme n^oi alors :

- Le biais absolu est : $b_{ij} = \hat{x}_{ij} - x_{ij}$
- Le biais relatif est : $b_{ij}\% = (\hat{x}_{ij} - x_{ij}) / x_{ij}$

	niv1	niv2	niv3	niv4	niv5
jour différent	25	50	100	200	400
7-oct.	6,8%	1,8%	-5,4%	1,8%	-0,2%
22-oct.	-12,4%	-3,8%	1,1%	3,8%	-0,9%
25-oct.	-5,2%	-2,4%	0,1%	2,2%	-0,5%
27-oct.	-9,6%	-5,6%	2,4%	2,9%	-0,8%
30-oct.	-17,6%	-3,2%	3,0%	3,3%	-0,9%

I.3.3. Conclusion sur la validation de la fonction d'étalonnage avec l'approche EMA_{étalonnage}

Le laboratoire souhaite évaluer la fonction d'étalonnage à partir d'un écart maximal acceptable EMA_{étalonnage} en cohérence avec l'incertitude due à l'étalonnage qu'il souhaite accepter dans les prochains contrôles des gammes d'étalonnage.(figure 05)

EMA_{étalonnage} = 20% pour l'étalon 25 et EMA_{étalonnage} = 10% pour les étalons 50, 100, 200 et 400l.

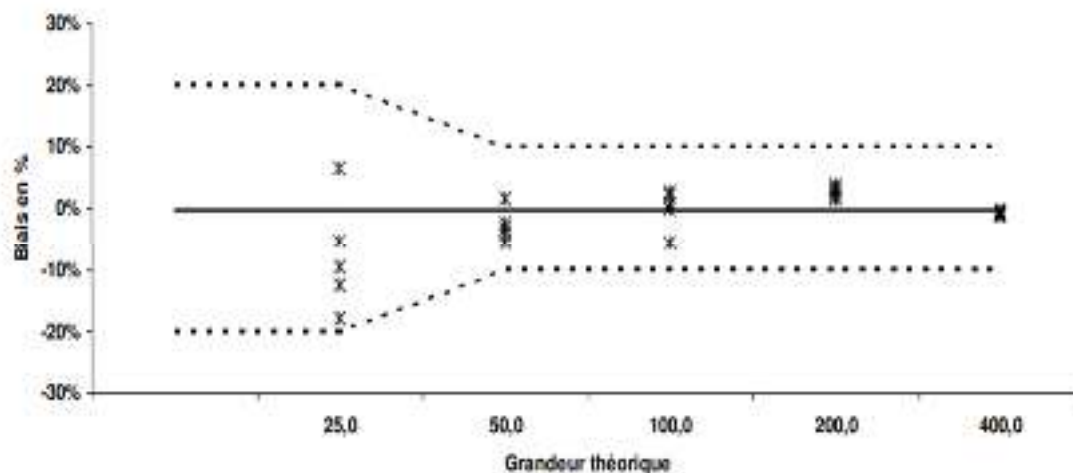


Figure 05 : Répartition des biais en % en fonction des niveaux par rapport des EMAétalonnage définis par le laboratoire

La fonction d'étalonnage linéaire est considérée comme acceptable dans le domaine étudié avec l'approche EMAétalonnage car tous les biais absolus mesurés sont inférieurs à l'écart maximal acceptable par le laboratoire en cohérence avec ses contrôles qualité.

I.3.4. L'étude de la limite de détection et la limite de quantification

a- Objectif

Il existe plusieurs approches pour approcher la limite de détection et la limite de quantification :

- ✓ Approche basée sur le bruit de fond de l'enregistrement.
- ✓ 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.
- ✓ Approche basée sur des valeurs de blanc non nulles.
- ✓ Approche basée sur la fonction d'étalonnage avec les normes NF ISO 11843.

Lorsque c'est possible, une vérification de la limite de quantification et une vérification de la limite de détection doivent être effectuées dans des conditions de fidélité intermédiaire sur des matériaux contenant une matrice.

Quand ce n'est pas possible, le laboratoire préparera une solution synthétique la plus représentative possible de la matrice considérée.

b- Estimation avec le bruit de fond de l'enregistrement

La limite de détection x_{LD} est définie comme la concentration de l'analyte à un rapport signal/bruit S/N

3 après correction du blanc si possible.

La limite de détection est approchée par $LD = 3 h_{max} \times R$

La limite de quantification est approchée par $LD = 10 h_{max} \times R$ avec

- h_{max} l'amplitude maximale du signal sur une distance égale à vingt fois la largeur à mi-hauteur du pic correspondant à la substance à rechercher.
- R le facteur de réponse quantité / signal, exprimée en hauteur.

c- Estimation avec des valeurs de blanc non nulles

$$x_{LD} = 3 s_0 + x_{Bl} \text{ et } x_{LQ} = 10 s_0 + x_{Bl}$$

où x_{LD} est la limite de détection et x_{LQ} est la limite de quantification

s_0 est l'écart-type des résultats d'un échantillon assimilé à un blanc après élimination des valeurs aberrantes.

x_{Bl} est la concentration moyenne du blanc.

x_{Bl} peut être ignoré si la méthode soustrait la valeur du blanc.

L'estimation de la fidélité s_0 doit être basée sur au moins 5 déterminations en double complètes indépendantes de la concentration en analyte dans un blanc de matrice type ou un matériau de faible niveau, sans rejet de résultats nuls ou négatifs .

Pour ce nombre de déterminations, le facteur 3 correspond à un niveau de confiance de $\alpha=1\%$.

d- Vérification d'une limite de quantification correspondant à une valeur proposée avec la norme NF T90-210

L'objectif est de vérifier qu'une limite de quantification proposée LQ est acceptable dans une matrice considérée avec un écart maximal acceptable.

Étape 1 : réaliser des essais sur un matériau choisi ou préparé à la valeur proposée pour une limite de quantification avec au moins $n \geq 5$ essais sur le matériau et l'analyser dans des conditions de fidélité intermédiaire.

Chaque analyse est répétée au moins $r \geq 2$ fois dans des conditions de répétabilité.

Si l'échantillon est instable procéder à plusieurs préparations.

Quand ce n'est pas possible, le laboratoire préparera une solution synthétique la plus représentative possible de la matrice considérée.

Matériau LQ Série	1	Répétitions	r	Moyenne \bar{z}_i	Variances des séries $S_{série}^2$
1	$z_{1,1}$		$z_{1,r}$	\bar{z}_1	$S_{série1}^2$
...
i	$z_{i,j}$		$z_{i,r}$	\bar{z}_i	$S_{sériei}^2$
...
n	$z_{n,j}$		$z_{n,r}$	\bar{z}_n	$S_{série}^2$

Étape 2 : calculer les paramètres d'exactitudes selon l'annexe B

- L'écart-type de fidélité intermédiaire s_{FI} obtenus sur le matériau LQ.
- La moyenne \bar{z} des résultats obtenus sur le matériau LQ.

Étape 3 : vérifier l'exactitude de la limite de quantification proposée par rapport à un écart maximal acceptable.

🇫🇷 La norme NF T90-210 propose de vérifier les deux inégalités suivantes :

$$(1) \bar{z} - 2 \times s_{FI} \geq LQ - 60 \% \times LQ.$$

$$(2) \bar{z} + 2 \times s_{FI} \leq LQ + 60 \% \times LQ.$$

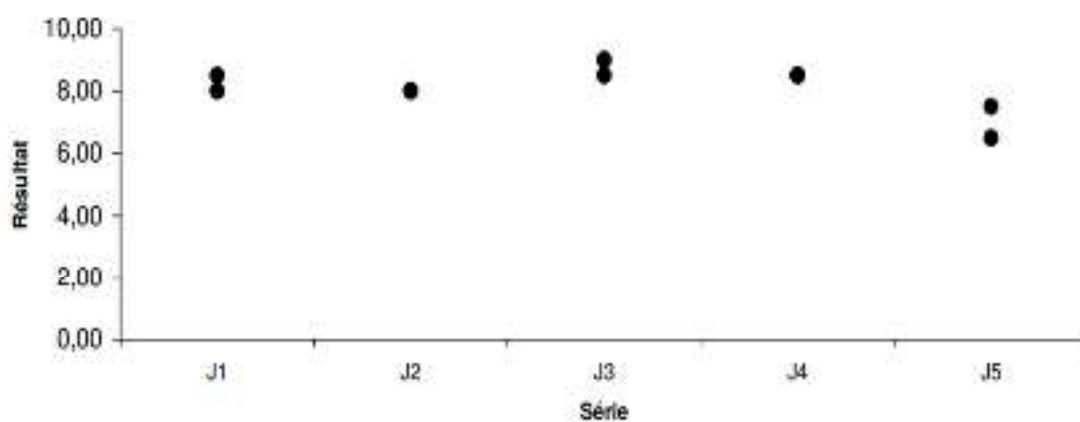
🇫🇷 La valeur de 60% a été définie par convention mais des exigences réglementaires ou des exigences du laboratoire peuvent imposer d'autres limites.

Exemple avec l'estimation de la LD et LQ à partir du Bruit de fond

$$LD = 3 \times Bdf \text{ et } LQ = 10 \times Bdf$$

Exemple avec l'estimation de la LD et LQ à partir des blancs »

Conditions de fidélité intermédiaire Séries	Résultats d'un blanc dans une série		Moyenne	Variance des séries
	n°1	n°2	\bar{z}_i	s_i^2
J1	8,5	8,0	8,25	0,125
J2	8,0	8,0	8,00	0,000
J3	9,0	8,5	8,75	0,125
J4	8,5	8,5	8,50	0,000
J5	6,5	7,5	7,00	0,500



Nombre de séries n	5
Nombre de répétitions par série r	2
Variance de répétabilité : $s_{répét}^2$	0,15000
Variance des moyennes : $s(\bar{z}_i)^2$	0,45625
Variance inter-séries : s_B^2	0,38125
Variance de fidélité intermédiaire s_{Fi}^2	0,53125
Ecart-type de répétabilité : $s_{répét}$	0,38730
CV de répétabilité $CV_{répét}$ en %	4,8%

Moyenne générale \bar{z}	8,10000
Ecart-type de fidélité intermédiaire : s_{Fi}	0,72887
CV de fidélité intermédiaire CV_{Fi} en %	9,0%

Limite de détection	10,3
Limite de quantification	15,4

Exemple avec la vérification d'une LQ proposée »

5 matériaux sont préparés à une valeur de la LQ présumée à 25 puis sont analysés dans des conditions de fidélité intermédiaire. Chaque analyse est répétée 2 fois dans des conditions de répétabilité. (Tableau 06)

Tableau 06 : résultats de la mesure de la Limite de Quantification

Série	répétitions		statistiques élémentaires	
	1	2	moyenne	$Var = s^2$ série série
7-oct.	22,6	22,2	22,40	0,080
15-oct.	24,5	24,1	24,30	0,080
22-oct.	22,7	23,1	22,90	0,080
27-oct.	25,4	25,8	25,60	0,080
30-oct.	24,1	24,7	24,40	0,180

Nombre de séries : n	5
Nombre de répétitions par série : r	2
Variance de répétabilité : Var_{repet}	0,100
Variance des moyennes : $Var_{\bar{z}_i} = s_{\bar{z}_i}^2$	1,637
Variance inter-séries : Var_B	1,587
Variance de fidélité intermédiaire : $Var_{FI} = s_{LQ}^2$	1,687
Moyenne générale : $\bar{\bar{z}}_{LQ}$	23,92
Ecart-type de fidélité intermédiaire : s_{LQ}	1,30
CV de fidélité intermédiaire en % : CV_{LQ}	5,4
Réf	25,00
EMA = 60% × Réf	15,00
LQ + 60 % × LQ.	40,00
$\bar{\bar{z}}_{LQ} + 2 \times s_{LQ}$	26,52
$\bar{\bar{z}}_{LQ} - 2 \times s_{LQ}$	21,32
LQ - 60 % × LQ.	10,00

Paramètres d'exactitude de la limite de quantification présumée

Les deux inégalités $\bar{\bar{z}}_{LQ} - 2 \times s_{LQ} > LQ - 60 \% \times LQ$ et $\bar{\bar{z}}_{LQ} + 2 \times s_{LQ} < LQ + 60 \% \times LQ$ sont vérifiées. L'exactitude de la limite de quantification présumée à 25 est vérifiée.

I.3.5. L'étude de l'exactitude

a. Objectif

Les normes NF T90-210 et NF V03-110 proposent de vérifier l'exactitude d'une méthode autour d'une valeur de référence par rapport à des limites d'acceptabilité ou un écart maximal acceptable (EMA) qui caractérise la performance exigée de la méthode.

b. Procédure

Étape 1 : définition de la quantité mesurée

À partir du mode opératoire de la méthode, définir la quantité mesurée en précisant les formules de calcul du résultat final et la procédure pour établir ce résultat.

Il est recommandé de bien distinguer :

- ✚ Les méthodes « indirectes ou rationnelles » qui exigent une fonction d'étalonnage préalable pour calculer la concentration des échantillons inconnus.
- ✚ Les méthodes « directes ou empiriques » qui exigent une autre méthode de mesure, comme une pesée ou une titrimétrie. (azote organique total de Kjeldahl, extrait sec, lipides totaux, etc...).
- ✚ Remarque :
- ✚ La quantité mesurée lors de l'étude doit être la même que celle qui sera mesurée en routine.
- ✚ Le résultat d'un essai doit correspondre au résultat final issu du mode opératoire.

Étape 2 : définition du domaine de validation

a°) Définir le domaine de validation de la méthode.

b°) Définir une limite d'acceptabilité (λ avec NF V03-110) ou un écart maximal acceptable (EMA avec NF T90-210) pour caractériser la performance exigée de la méthode autour d'une valeur de référence. L'EMA peut être imposé par une exigence réglementaire ou normative ou provenant d'un guide technique ou fixée par le client ou le laboratoire lui-même.

Quelques exemples d'EMA :

- **Modèle développé par Horwitz où $CVR_{Horwitz} = 2 \times Conc^{-0,15}$.**

$$EMA\% = 2 \times 2 \times Conc^{-0,15} \text{ ou } EMA = 2 \times 0,02 \times Conc^{0,85}.$$

- **Estimation de la reproductibilité interlaboratoires avec les comparaisons interlaboratoires,**
- **$EMA\% = 2 \times CV_{Repro}$ ou $EMA = 2 \times S_{Repro}$.**

Étape 3 : sélection des matériaux

a) Choix des matériaux

Les matériaux utilisés pour la validation de la méthode doivent être des matériaux le plus représentatif possible du domaine d'application de la méthode. Ils peuvent inclure différentes matrices pour les méthodes multi-matrices.

Les matériaux doivent être stables et homogènes en quantité suffisante pour réaliser des essais dans des conditions de fidélité intermédiaire.

b) Valeurs de référence

Il faut disposer de matériaux dont la valeur est connue le plus exactement possible avec une incertitude connue.

Cette valeur correspond à la valeur de référence assignée du matériau mesuré, plusieurs cas de valeurs de référence sont acceptés :

- la valeur du certificat d'un matériau de référence certifié (RéfMRC), ou externes (MRE) ou internes (MRI).
- la valeur de consensus issue d'une comparaison interlaboratoires (RéfCIL),
- la valeur ciblée (Réfpréparée) par préparation d'échantillons (ajout ou dilution ou supplémentation de l'analyte dans une matrice représentative du domaine d'application,
- la moyenne arithmétique des valeurs de mesures répétées selon la méthode de référence (RéfMéth).

Étape 4 : organisation des essais et calculs

- ✚ Préparer ou choisir $p \geq 3$ matériaux couvrant le domaine de validation de la méthode en termes de concentration pour une matrice donnée.
- ✚ Il est recommandé que le point estimé de la limite de quantification soit intégré dans le plan.
- ✚ Analyser chaque matériau dans $n \geq 5$ séries (3 ou 4 séries sur justification) dans des conditions de fidélité intermédiaire et dans le temps de stabilité de l'échantillon pour la matrice considérée. Si le matériau est instable procéder à plusieurs préparations.
- ✚ Pour chaque matériau et dans chaque série, effectuer $r \geq 2$ répétitions dans des conditions de répétabilité.
- ✚ une valeur de référence (Réf) est attribuée à chaque matériau.

Tableau 07 : résultats pour un matériau de validation

Série	Répétitions		Moyenne	Variance
	1	r		
1	$z_{1,1}$	$z_{1,r}$	\bar{z}_1	Var_1
...
i	$z_{i,1}$	$z_{i,r}$	\bar{z}_i	Var_i
...
n	$z_{n,1}$	$z_{n,r}$	\bar{z}_n	Var_n

Pour chaque matériau, les paramètres d'exactitude sont calculés selon l'annexe B puis rassemblés dans le tableau suivant :

Tableau 08 : exactitude de la méthode

	Matériau 1	...	Matériau p
Valeur de référence	Réf ₁		Réf _p
Nombre de séries	n ₁		n _p
Nombre de répétitions par série	r ₁		r _p
Moyenne générale	\bar{z}_1		\bar{z}_p
Écart-type de fidélité intermédiaire	SFL ₁		SFL _p
CV de fidélité intermédiaire en %	CV _{FL,1}		CV _{FL,p}
Biais absolu	b ₁		b _p
Biais relatif en %	b% ₁		b% _p

Étape 5 : calcul de l'intervalle de tolérance pour un matériau de validation

La représentation des résultats est exprimée sous forme d'intervalle de tolérance autour de la moyenne générale ou autour du biais ou autour du biais relatif.

L'intervalle de tolérance est $[\bar{z} - k_{FI} \times S_{FI} ; \bar{z} + k_{FI} \times S_{FI}]$.

⇒ L'intervalle de tolérance autour de \bar{z} est : $\bar{z} \pm k_{FI} \times S_{FI}$.

⇒ L'intervalle de tolérance autour du biais b est : $b \pm k_{FI} \times S_{FI}$.

⇒ L'intervalle de tolérance autour du biais relatif b% est : $b\% \pm k_{FI} \times S_{FI} / Réf$.

a) Cas de la norme NF T90-210 : $k_{FI} = 2$

La norme NF T90-210 propose de fixer le facteur d'élargissement égal à 2 par convention, comme le facteur d'interprétation du Z-score dans les comparaisons interlaboratoires ou comme le facteur d'élargissement de l'incertitude élargie.

c) Cas de la norme NF V03-110 : k_{FI} variable La norme NF V03-110 propose un facteur d'élargissement qui dépend d'une probabilité $\pi \geq 80\%$, du nombre de mesures et du rapport R^2 entre la variance de répétabilité et la variance « changement de conditions »

$$k_{FI} = t_{\frac{1-\pi}{2}} \times \sqrt{1 + \frac{1}{n \times r \times \frac{R+1}{(r \times R+1)}}$$

Étape 6 : vérification de l'exactitude de la méthode

L'exactitude de la méthode est vérifiée pour le matériau de valeur assignée Réf par rapport à l'écart maximal acceptable si les inégalités (1) et (2) sont vérifiées :

$$(1) \text{ Réf} - \text{EMA} < \bar{z} - k_{FI} \times s_{FI}$$

$$(2) \bar{z} + k_{FI} \times s_{FI} < \text{Réf} + \text{EMA}$$

ou

$$(1) - \text{EMA}\% < b\% - k_{FI} \times s_{FI} / \text{Réf}$$

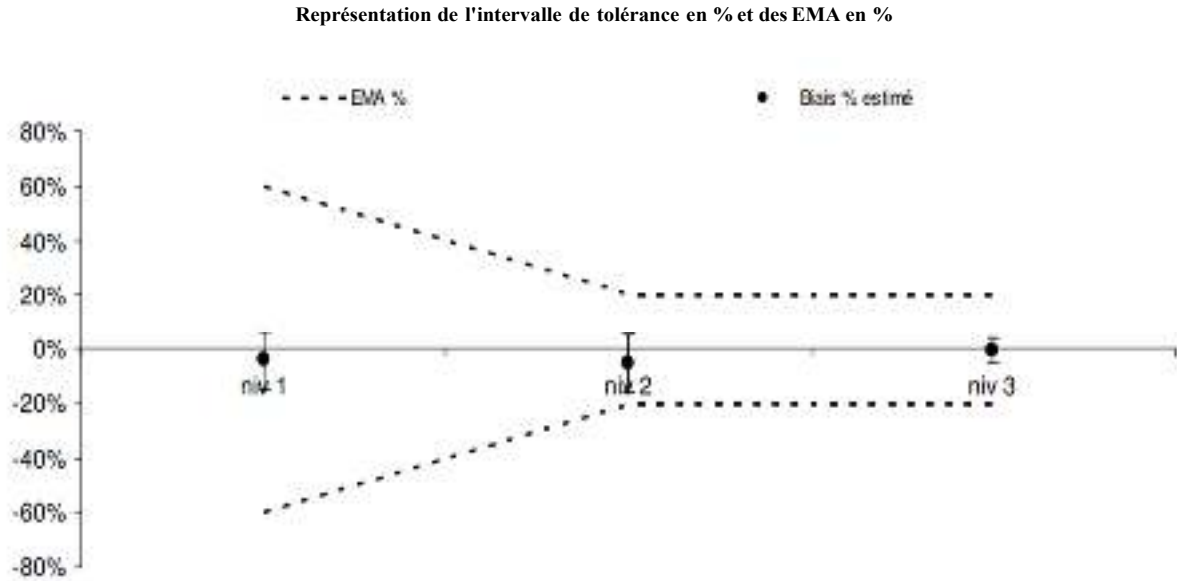
$$(2) b\% - k_{FI} \times s_{FI} / \text{Réf} < \text{EMA}\%$$

La norme NF T90-210 indique le calcul du risque β correspondant à la probabilité de déclarer conforme le matériau testé avec la mesure obtenue lorsque le matériau est réellement non-conforme : faux non-conforme.

Étape 7 : représentation graphique de l'exactitude de la méthode

Il est conseillé de représenter graphiquement l'exactitude de la méthode par niveau selon l'intervalle de tolérance du biais relatif par rapport à l'écart maximal acceptable en pourcentage.

Ce graphique est appelé « profil d'exactitude de la méthode ».



c. Exemple avec les données de la norme NF T 90-210

- 1°) Le domaine de validation de la méthode est [25 ; 400].
- 2°) 3 matériaux de validation associée aux valeurs de référence : 25 – 100 – 300 sont mesurés. L'utilisateur a décidé de vérifier l'exactitude de la méthode selon chaque matériau par rapport l'écart maximal acceptable suivant :
 - Pour la valeur de référence de 25 : EMA% = 60%
 - Pour la valeur de référence de 100 et 300 : EMA% = 20%.

3°) Résultats des plans d'expériences

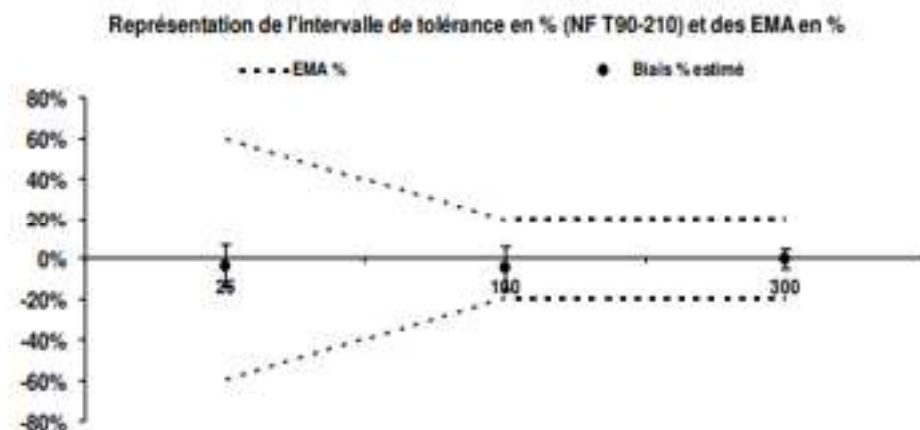
Valeur de référence de niv 1 ou LQ	25	± 60%	Valeur de référence de niv 2	100	± 20%	Valeur de référence de niv 3	300	± 20%
Echantillon supposé identique	Concentration des répétitions		Echantillon supposé identique	Concentration des répétitions		Echantillon supposé identique	Concentration des répétitions	
7-sept.	23	22	7-sept.	95	96	7-sept.	309	306
9-sept.	25	24	9-sept.	101	102	9-sept.	287	291
13-sept.	23	23	13-sept.	90	93	13-sept.	298	295
27-sept.	25	26	27-sept.	88	87	27-sept.	293	295
30-sept.	24	25	30-sept.	97	98			

4°) Calcul des paramètres d'exactitude sur chaque niveau

Niveaux	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Fidélité			
Écart-type de répétabilité ($S_{répét}$)	0,316	1,318	1,886
Écart-type de fidélité (S_{FI})	1,299	5,385	7,347
Coefficient de variation de répétabilité ($CV_{répét}$)	1,32%	1,39%	0,63%
Coefficient de variation de fidélité (CV_{FI})	5,43%	5,68%	2,47%
Justesse			
Valeur moyenne estimée	23,920	94,820	297,820
Biais (%)	-4,32%	-5,18%	-0,73%

5°) Calcul et interprétation des limites de tolérance et des limites d'acceptabilité avec la norme NF T90-210

Niveaux	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Valeur de référence	25,0	100,0	300,0
Ecart Maximal Acceptable en %	+ 60%	20%	20%
-	60%	20%	20%
Etude de l'exactitude avec la norme NF T90-210			
Limite haute d'acceptabilité	40,0	120,0	360,0
Limite haute de tolérance	26,5	105,6	312,5
Limite basse de tolérance	21,3	84,1	283,1
Limite basse d'acceptabilité	10,0	80,0	240,0
Conclusion : l'exactitude de la méthode est	vérifiée	vérifiée	vérifiée
Risque □	0,00%	41,58%	0,02%
Profil d'exactitude par rapport au biais relatif			
Biais %	-4,32%	-5,18%	-0,73%
Ecart Maximal Acceptable en %	+ 60%	20%	20%
-	-60%	-20%	-20%
Limites haute de l'intervalle de tolérance du biais en %	6,1%	5,6%	4,2%
Limites basse de l'intervalle de tolérance du biais en %	-14,7%	-15,9%	-5,6%



d. Exemple avec les données de la norme NF V03-110

Le laboratoire souhaite vérifier l'exactitude de la méthode à quantifier l'acide L-malique dans le jus de raisin entre 0,16 et 2,52 g/l par rapport à des limites d'acceptabilité fixées à $\pm 20\%$.

Les matériaux de validation choisis sont des matériaux de référence dont les valeurs de référence sont :

- AA1 : 0,16 g/l \pm 0,02 g/l.
- BTA : 0,92 g/l \pm 0,08 g/l.
- AA3 : 2,52 g/l \pm 0,12 g/l.

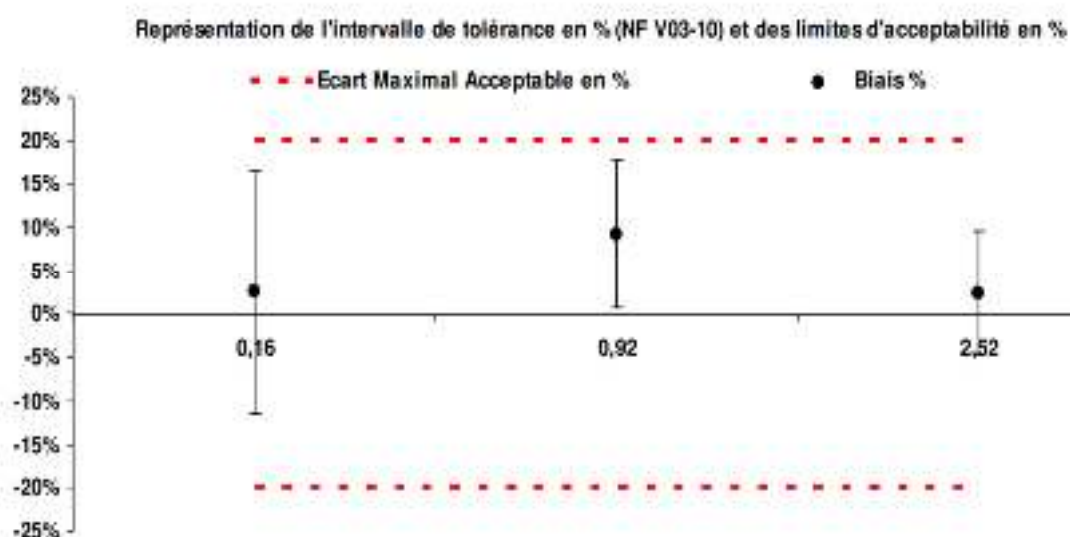
Étape 2 : Calcul des paramètres d'exactitude sur chaque niveau

Niveaux		Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Valeur de référence		0,16	0,92	2,52
Ecart Maximal Acceptable ou λ en %	+	20%	20%	20%
	-	20%	20%	20%
Fidélité				
Écart-type de répétabilité ($s_{\text{répét}}$)		0,007	0,040	0,042
Écart-type de fidélité (s_{F})		0,014	0,052	0,110
Coefficient de variation de répétabilité ($CV_{\text{répét}}$)		4,57%	3,97%	1,64%
Coefficient de variation de fidélité (CV_{F})		8,56%	5,18%	4,27%
Justesse				
Valeur moyenne estimée		0,164	1,005	2,581
Biais (%)		2,56%	9,23%	2,40%

Étape 3 : calcul et interprétation des limites de tolérance et des limites d'acceptabilité

Étude de l'exactitude avec la norme NF V03-110			
Probabilité π	80%	80%	80%
k_{FI} avec la norme V03-110 pour $\pi = 80\%$	1,585	1,510	1,629
Limite haute d'acceptabilité	0,192	1,104	3,024
Limite haute de tolérance	0,186	1,083	2,760
Limite basse de tolérance	0,142	0,926	2,401
Limite basse d'acceptabilité	0,128	0,736	2,016
Conclusion : l'exactitude de la méthode est	vérifiée	vérifiée	vérifiée
Profil d'exactitude par rapport au taux de récupération			
Récupération %	102,56%	109,23%	102,40%
Limite haute d'acceptabilité en %	120%	120%	120%
Limite haute de l'intervalle de tolérance en %	116,5%	117,8%	109,5%
Limite basse de l'intervalle de tolérance en %	88,6%	100,7%	95,3%
Limite basse d'acceptabilité en %	80%	80%	80%
Profil d'exactitude par rapport au biais			
Biais %	2,56%	9,23%	2,40%
Ecart Maximal Acceptable en %	+ 20%	20%	20%
-	-20%	-20%	-20%
Limites haute de l'intervalle de tolérance du biais en %	16,5%	17,8%	9,5%
Limites basse de l'intervalle de tolérance du biais en %	-11,4%	0,7%	-4,7%

Étape 4 : représentation graphique de l'exactitude de la méthode



I.3.6. L'étude des rendements

a- Objectif

La présence dans l'échantillon de constituants autres que l'espèce à analyser constitue une source importante d'erreurs systématiques dans les résultats qui peut entraîner une augmentation ou une suppression de la réponse analytique.

Il est conseillé d'aborder cette étape avant toute étude d'exactitude et de LQ pour tenir compte éventuellement d'un coefficient de correction.

- ✚ La norme NF T90-210 propose un plan d'expérience avec des ajouts connus sur des différents échantillons analysés dans des conditions de fidélité intermédiaire.

La norme indique que l'étude des rendements ne sera pas effectuée s'il n'y a pas de traitement de l'échantillon ou si l'étalonnage tient compte du traitement de l'échantillon.

- ✚ Si l'utilisateur a besoin d'une étude des rendements avec plusieurs échantillons alors l'étude peut être effectuée avec un ajout dans une même série.

b- Étude des rendements en fidélité intermédiaire avec la norme NF T90-210

L'objectif est de caractériser l'influence de l'étape de préparation lorsque celle-ci n'est pas prise en compte dans l'étude de l'étalonnage.

En gamme extraite, l'étude des rendements ne sera pas effectuée.

c- Organisation des essais

Réaliser des essais sur au moins deux niveaux d'ajout d'un même matériau représentatif à l'intérieur du domaine d'application de la méthode.

En absence de valeurs d'intérêt normatives ou réglementaires, les niveaux d'ajout pourront être de 20 % et 80 % de la concentration maximale du domaine d'application.

La norme NF T90-210 propose de réaliser au moins $n \geq 5$ essais à chaque niveau et les analyser dans des conditions de fidélité intermédiaire en incluant l'étape de préparation.

Chaque analyse est répétée au moins $r \geq 2$ fois dans des conditions de répétabilité.

Tableau des résultats pour un niveau d'ajout

Série	Teneur initiale	Teneur	Teneur retrouvée		Rendement en %	
	avant ajout	ajoutée	1	2	1	2
1	z_1	x_1	$z'_{1,1}$	$z'_{1,2}$	$R_{1,1}$	$R_{1,2}$
...
i	z_i	x_i	$z'_{i,1}$	$z'_{i,2}$	$R_{i,1}$	$R_{i,2}$
...
n	z_n	x_n	$z'_{n,1}$	$z'_{n,2}$	$R_{n,1}$	$R_{n,2}$

d- Estimation des paramètres d'exactitude pour un niveau d'ajout

Il s'agit de calculer les statistiques suivantes sur les rendements mesurés pour chaque niveau d'ajout à partir du tableau d'exactitude .

$\overline{\text{Rdt}}$ rendement moyen calculé.

s_{FI} écart-type de fidélité intermédiaire calculé.

Le laboratoire doit définir les protocoles d'évaluation et de suivi de valeurs caractéristiques sur chaque niveau d'ajout selon la moyenne \overline{R} et l'écart-type s_{FI} .

Les valeurs préalablement établies pourront servir de base pour le contrôle qualité.

Le laboratoire définira dans sa documentation si une correction de rendement est appliquée dans l'expression du résultat final. Dans le cas contraire, le laboratoire devra tenir compte, dans le calcul des incertitudes, du biais introduit par l'absence de correction du rendement.

Exemple de la norme NF T90-210

- ✓ Etude des rendements à 20% du domaine

Conditions de fidélité intermédiaire des séries	Teneur initiale avant ajout	Teneur ajoutée	Teneur retrouvée	
			1	2
J1	0	100,000	95,1	96,2
J2	0	100,000	100,5	102,1
J3	0	100,000	90,2	93,4
J4	0	100,000	88,4	86,8
J5	0	100,000	97,3	98,2

Série	Rendements en %		Rendement moyen \bar{R}_i	Variance des séries S_i^2
	1	2		
J1	95,1	96,2	95,65	0,605
J2	100,5	102,1	101,30	1,280
J3	90,2	93,4	91,80	5,120
J4	88,4	86,8	87,60	1,280
J5	97,3	98,2	97,75	0,405

Moyenne générale \bar{R}	94,8
Ecart-type de fidélité intermédiaire : s_{Fi}	5,4
CV de fidélité intermédiaire CV_{Fi} en %	5,7%

Variance de répétabilité : $s_{\text{rép}}^2$	1,738
Variance des moyennes : $s(\bar{R}_i)^2$	28,128
Variance inter-séries : s_B^2	27,259
Variance de fidélité intermédiaire s_{Fi}^2	28,997
Ecart-type de répétabilité : $s_{\text{rép}}$	1,3
CV de répétabilité $CV_{\text{rép}}$ en %	1,4%

✓ Étude des rendements à 80% du domaine

Conditions de fidélité intermédiaire des séries	Teneur initiale avant ajout	Teneur ajoutée	Teneur retrouvée	
			1	2
J1	0	300,000	309,100	306,300
J2	0	300,000	287,300	291,100
J3	0	300,000	297,500	294,800
J4	0	300,000	292,700	295,100
J5	0	300,000	302,400	301,900

Série	Rendements en %		Rendement moyen \bar{R}_i	Variance des séries s_i^2
	1	2		
J1	103,0	102,1	102,57	0,436
J2	95,8	97,0	96,40	0,802
J3	99,2	98,3	98,72	0,405
J4	97,6	98,4	97,97	0,320
J5	100,8	100,6	100,72	0,014

Moyenne générale \bar{R}	99,3
Ecart-type de fidélité intermédiaire : s_{Fi}	2,4
CV de fidélité intermédiaire CV_{Fi} en %	2,5%

Variance de répétabilité : $s_{\text{répét}}^2$	0,395
Variance des moyennes : $s(\bar{R}_i)^2$	5,801
Variance inter-séries : s_0^2	5,603
Variance de fidélité intermédiaire s_{Fi}^2	5,998
Ecart-type de répétabilité : $s_{\text{répét}}$	0,6
CV de répétabilité $CV_{\text{répét}}$ en %	0,6%

- Conclusion : pas d'application de facteur de correction.

I.3.7. L'étude des interférences et de la spécificité

a. Application de la norme NF V03-110

La norme NF V03-110 indique que la spécificité d'une méthode fait plus partie de son développement que de sa validation.

L'annexe I indique que la spécificité peut-être établie en étudiant la capacité de la méthode à correctement quantifier l'analyte recherché en présence d'autres analytes, supposés interférents, intentionnellement introduits dans un échantillon.

Si on suppose que des interférences existent déjà, on peut comparer la méthode à valider avec une autre méthode qui quantifie le même analyte ou tout autre moyen pour s'assurer de l'identité de l'analyte.

b. Application de la norme NF T90-210

La norme NF T90-210 indique que la spécificité est établie par une étude des interférences sur la revue bibliographique des données disponibles concernant l'analyte, la technique analytique et la matrice concernée.

Il appartient au laboratoire de démontrer qu'il a mis en œuvre les moyens adaptés à la mise en évidence d'éventuelles interférences et à leur prise en compte.

Il convient en particulier d'identifier les interférences spécifiques et les interférences non spécifiques.

➤ Interférences spécifiques

Ces interférences agissent directement sur la réponse de l'analyte (variation de pente d'étalonnage, effets de sels, variation de rendements d'ionisation, d'atomisation, ...).

Par exemple, elles peuvent être identifiées et/ou corrigées par des tests d'ajouts dosés, des études de rendements, des comparaisons de techniques...

➤ Interférences non spécifiques

Ces interférences sont liées à la présence d'un composé (différent de l'analyte) qui produit un signal y compris en absence de l'analyte (éléments non séparés en chromatographie, interférences polyatomiques en ICPMS, ..

Ces interférences ne peuvent être corrigées par la méthode des ajouts dosés.

On peut en démontrer la maîtrise par ajouts du composé interférent dans un échantillon de composition connue.

I.3.8. L'étude de la répétabilité

a- Objectif

La répétabilité est étudiée pour calculer la limite de répétabilité, notée r .

La limite de répétabilité correspond à la différence maximale à laquelle on doit s'attendre dans 95% des cas, entre deux mesures effectuées successivement et indépendamment sur un même matériau dans des conditions de répétabilité :

$$r = 2,8 \times s_{\text{répét}} \text{ ou } r\% = 2,8 \times CV_{\text{répét}}$$

Pour une vérification, la répétabilité ($s_{\text{répét}}$ ou $CV_{\text{répét}}$ ou r ou $r\%$) est comparée à une limite acceptable ou admissible, préalablement choisi par rapport à une exigence réglementaire ou normative ou fixé par le client ou le laboratoire lui même.

Cette étude est nécessaire lorsque l'étude de l'exactitude est incomplète en matière de représentation des matériaux analysés.

b- Organisation des essais et calculs

Plusieurs matériaux sont mesurés avec des répétitions dans des conditions de répétabilité. Il est conseillé d'avoir $p \times (n-1) / 30$.

Différents matériaux analysés	Répétitions dans une même série			Variance	CV ²
	1		n		
Matériau 1	$x_{1,1}$		$x_{1,n}$	$S^2_{\text{matériau 1}}$	$CV^2_{\text{matériau 1}}$
...
Matériau i	$x_{i,j}$		$x_{i,r}$	$S^2_{\text{matériau i}}$	$CV^2_{\text{matériau i}}$
...
Matériau p	$x_{p,1}$		$x_{p,n}$	$S^2_{\text{matériau p}}$	$CV^2_{\text{matériau p}}$

L'estimation de la répétabilité avec plusieurs matériaux dépend de la stabilité de la répétabilité dans le domaine étudié.

- Si les écart-types sont jugés significativement constants alors :

l'écart-type de répétabilité est estimé par :

$$s_{\text{répét}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p s_{\text{matériau},i}^2}{p}}$$

Si les CV sont jugés significativement constants alors :

$$CV_{\text{répét}} \text{ le CV de répétabilité est estimé par : } CV_{\text{répét}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p CV_{\text{matériau},i}^2}{p}}$$

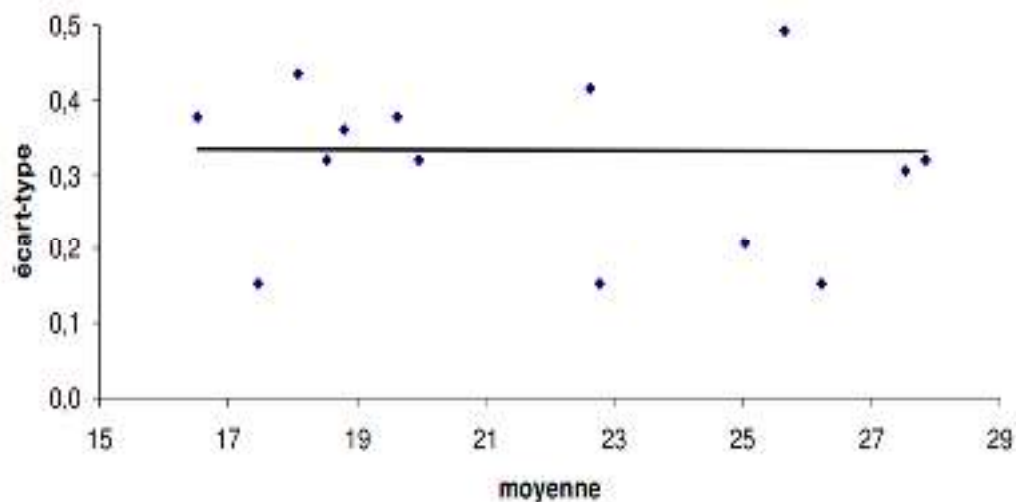
Le test de Cochran ou un graphique permet de vérifier que les écart-types ou les CV sont significativement homogènes .

a. Exemple

Matériaux différents	répétitions			Effectif	moyenne	écart-type	Variance s^2
1	28,0	28,1	27,5	3	27,87	0,32	0,1033
2	25,1	25,2	24,8	3	25,03	0,21	0,0433
3	18,5	18,7	19,2	3	18,80	0,36	0,1300
4	26,2	26,4	26,1	3	26,23	0,15	0,0233
5	20,1	20,2	19,6	3	19,97	0,32	0,1033
6	17,8	17,9	18,6	3	18,10	0,44	0,1900
7	23,1	22,3	22,5	3	22,63	0,42	0,1733
8	16,7	16,8	16,1	3	16,53	0,38	0,1433
9	27,8	27,6	27,2	3	27,53	0,31	0,0933
10	24,9	24,3	25,5	3	24,90	0,60	0,3600
11	18,3	18,4	18,9	3	18,53	0,32	0,1033
12	26,0	25,9	25,1	3	25,67	0,49	0,2433
13	19,9	19,8	19,2	3	19,63	0,38	0,1433
14	17,6	17,5	17,3	3	17,47	0,15	0,0233
15	22,9	22,8	22,6	3	22,77	0,15	0,0233

Nombre de matériaux	15
Nombre de répétitions par matériau	3
Variance absolue de répétabilité s^2	0,127
r	
Ecart-type de répétabilité : $s_{\text{répét}}$	0,36
Limite de répétabilité : r	1,00

Représentation de l'écart-type de répétabilité par rapport à la moyenne



I.3.8. L'étude de la fidélité intermédiaire

a- Objectif

Cette étude est nécessaire lorsque l'étude de l'exactitude est incomplète en matière de représentation des matériaux analysés.

La fidélité intermédiaire est étudiée pour évaluer l'influence des changements de conditions (personne, étalonnage, équipements, environnement, temps écoulé entre mesures) correspondant à une activité normale du laboratoire.

Pour une vérification, la fidélité intermédiaire (s_{FI} ou CV_{FI}) est comparée à une limite acceptable ou admissible, préalablement choisi par rapport à une exigence réglementaire ou normative ou fixé par le client ou le laboratoire lui même.

b- Organisation des essais et calculs

Un matériau est mesuré dans n séries avec des changements de conditions et chaque mesure est répétée r fois dans des conditions de répétabilité.

Série	Répétitions		Moyenne	Variance
	1	r		
1	$z_{1,1}$	$z_{1,r}$	\bar{z}_1	Var_1
...
i	$z_{i,1}$	$z_{i,r}$	\bar{z}_i	Var_i
...
n	$z_{n,1}$	$z_{n,r}$	\bar{z}_n	Var_n

Les calculs sont conduits selon le principe décrit dans la norme ISO 5725-2

Le test de Cochran ou un graphique permet de vérifier que les écart-types sont significativement homogènes .

Le test de Grubbs ou un graphique permet de vérifier que les valeurs et les moyennes sont significativement homogènes .

⇒ La moyenne arithmétique est estimée par : $\bar{z} = \frac{\sum_{i=1}^n z_i}{n}$.

⇒ L'écart-type de fidélité intermédiaire est calculé selon $s_{FI} = \sqrt{Var_{FI}}$.

Si le nombre de répétitions dans chaque série est constant et de valeur r alors :

⇒ $Var_{FI} = Var_R + Var_{Rép}$.

⇒ $Var_{Rép}$ est la variance de répétabilité calculée par :

$Var_{Rép} = \text{moyenne des } n \text{ variances } (var_i)$.

⇒ Var_R est la variance inter-séries calculée par : $Var_R = \text{Max}(0; Var_{\bar{z}} - \frac{Var_{Rép}}{r})$,

avec $Var_{\bar{z}} = \text{variance des } n \text{ moyennes } (\bar{z}_i)$.

⇒ Le coefficient de variation de fidélité intermédiaire est estimé par : $CV_{FI} = 100 * s_{FI} / \bar{z}$ en %.

Le test de Cochran ou un graphique permet de vérifier que les écart-types sont significativement homogènes . Le test de Grubbs ou un graphique permet de vérifier que les valeurs et les moyennes sont significativement homogènes .

Exemple

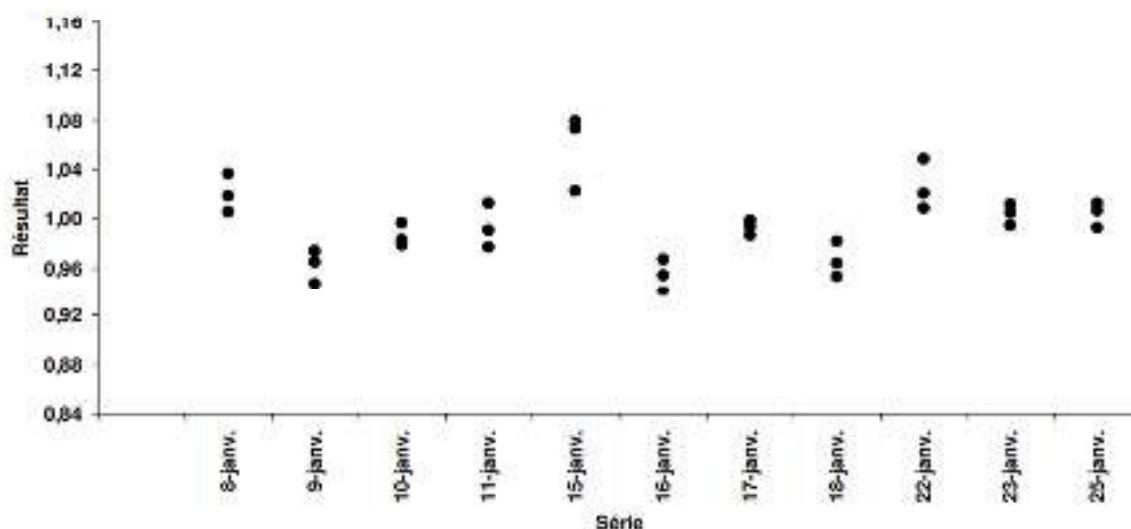
Série	Répétitions			Moyenne \bar{x}_i	Variance des séries $Var_{série} = s_{série}^2$
	1	2	3		
8-janv.	1,018	1,036	1,005	1,0197	0,000242
9-janv.	0,947	0,965	0,974	0,9620	0,000189
10-janv.	0,979	0,997	0,983	0,9863	0,000089
11-janv.	0,977	1,012	0,991	0,9933	0,000310
15-janv.	1,079	1,073	1,022	1,0580	0,000981
16-janv.	0,940	0,954	0,967	0,9537	0,000182
17-janv.	0,994	0,987	0,999	0,9933	0,000036
18-janv.	0,964	0,982	0,953	0,9663	0,000214
22-janv.	1,008	1,020	1,048	1,0253	0,000421
23-janv.	0,995	1,004	1,011	1,0033	0,000064
25-janv.	1,006	0,993	1,012	1,0037	0,000094

Nombre de séries : n	11
Nombre de répétitions par série : r	3

Moyenne générale \bar{x}	0,997
Ecart-type de fidélité intermédiaire : s_H	0,033
CV de fidélité intermédiaire : CV_H	3,3%

Variance de répétabilité : $Var_{série}$	0,000257
Variance des moyennes : $Var_{\bar{x}_i}$	0,000831
Variance inter-séries : $Var_{\bar{x}}$	0,000845
Variance de fidélité intermédiaire Var_H	0,001102

Représentation des résultats



I.3.9. L'étude de la justesse

a. Objectif

Il existe plusieurs approches pour vérifier la justesse d'une méthode :

- Interprétation des résultats obtenus dans des conditions de fidélité intermédiaire sur un matériau de référence.
- Comparaison d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence dans des conditions dans des conditions de répétabilité.
- Interprétation des résultats lors de comparaisons interlaboratoires.

b. Application de l'étude de l'exactitude avec la norme NF T90-210

A partir du plan d'expérience mis en œuvre lors de l'étude de l'exactitude, la justesse d'une méthode est vérifiée lorsque :

⇒ Soit, le biais $|\bar{z} - Réf|$ ou le biais relatif $\frac{|\bar{z} - Réf|}{Réf}$

est inférieur à une limite d'acceptabilité préalablement choisie par rapport à une exigence réglementaire ou normative.

Par exemple, le guide de validation LABERCA rappelle les biais relatifs autorisés par la directive européenne 2002/657/CE pour les analyses des résidus et contaminants par spectrométrie de masse.

- Soit, l'écart normalisé $EN = \frac{|\bar{z} - Réf|}{\sqrt{\frac{s^2}{n}}}$ est inférieur ou égal à 2.

$u_{\text{réf}}$ correspond à l'incertitude-type associée à la valeur Réf selon les cas suivants :

Référence	
Référence	incertitude-type
Réf _{MRC}	$u_{\text{réf}}$ est l'incertitude-type sur la valeur de référence.
Réf _{EIL}	Soit $u_{\text{réf}}$ provient de l'organisateur de la comparaison interlaboratoires. Soit $u_{\text{réf}} = \text{écart-type de reproductibilité interlaboratoires} / \sqrt{p}$ p étant le nombre de laboratoires pris en compte pour le calcul de l'écart-type.
Réf _{Méthode}	$u_{\text{réf}} = \text{écart-type des } p \text{ résultats obtenus avec une méthode de référence} / \sqrt{p}$.
Réf _{Ajout}	$u_{\text{réf}} = \text{écart-type ou incertitude-type caractérisant la valeur de l'ajout du(e) à la préparation, aux matériaux et matériels utilisés}$.

c- Comparaison d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence dans des conditions de répétabilité

La justesse d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence dans des conditions de répétabilité est étudiée en mesurant plusieurs matériaux avec les deux méthodes dans des conditions de répétabilité.

La justesse de la méthode alternative est vérifiée lorsque :

⇒ Soit le critère $w = \frac{\bar{d}}{s_d}$ est inférieur à 2 avec :

- \bar{d} la moyenne des différences $d_i = \bar{x}_i - \bar{z}_i$ entre les deux méthodes sur chaque matériau i.
- s_d l'écart-type des différences $d_i = \bar{x}_i - \bar{z}_i$ entre les deux méthodes sur chaque matériau i.

⇒ Soit les différences $d_i = \bar{x}_i - \bar{z}_i$ ou les rapports \bar{x}_i / \bar{z}_i sont inférieurs à une limite

acceptable ou admissible, préalablement choisi par rapport à une exigence réglementaire ou normative ou fixée par le client ou le laboratoire lui-même.

a. Comparaison d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence sans répétition

La justesse d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence sans répétition est étudiée en mesurant plusieurs matériaux avec les deux méthodes.

Estimer les paramètres de la droite de similitude ($Y = a + bX$) et l'intervalle de confiance de chaque paramètre avec un niveau de confiance de 99%.

$$a \pm t_{5\%,n-1} \times S_a \qquad b \pm t_{5\%,n-1} \times S_b$$

=> Décider de la justesse de la méthode alternative lorsque :

- si l'hypothèse $a - t_{5\%,n-1} \times S_a < 0 < a + t_{5\%,n-1} \times S_a$ est vérifiée
- si l'hypothèse $b - t_{5\%,n-1} \times S_b < \text{Taux théorique} < b + t_{5\%,n-1} \times S_b$ est vérifiée

Exemples

Exemple de la norme NF T90-210

Valeur de référence de niv 1 ou LQ	25	
Echantillon supposé identique	Concentration des répétitions	
7-sept.	23	22
9-sept.	25	24
13-sept.	23	23
27-sept.	25	26
30-sept.	24	25

Valeur de référence de niv 2	100	
Echantillon supposé identique	Concentration des répétitions	
7-sept.	95	96
9-sept.	101	102
13-sept.	90	93
27-sept.	88	87
30-sept.	97	98

Valeur de référence de niv 3	300	
Echantillon supposé identique	Concentration des répétitions	
7-sept.	309	306
9-sept.	287	291
13-sept.	298	295
27-sept.	293	295
30-sept.	302	302

Niveaux	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Valeur de référence	25,00	100,00	300,00
Ecart Maximal Acceptable ou □ en %	+	60%	20%
	-	60%	20%
Fidélité			
Écart-type de répétabilité ($S_{répét}$)	0,316	1,318	1,886
Écart-type de fidélité (S_{FI})	1,299	5,385	7,347
Justesse			
Valeur moyenne estimée	23,920	94,820	297,820
Biais (%)	-4,32%	-5,18%	-0,73%
Conclusion sur le biais avec la NF T90-210	négligeable	significatif	négligeable

Les biais relatifs sont considérés acceptables car ils sont inférieurs à 10% selon les objectifs du laboratoire.

Exemple de comparaisons de méthode

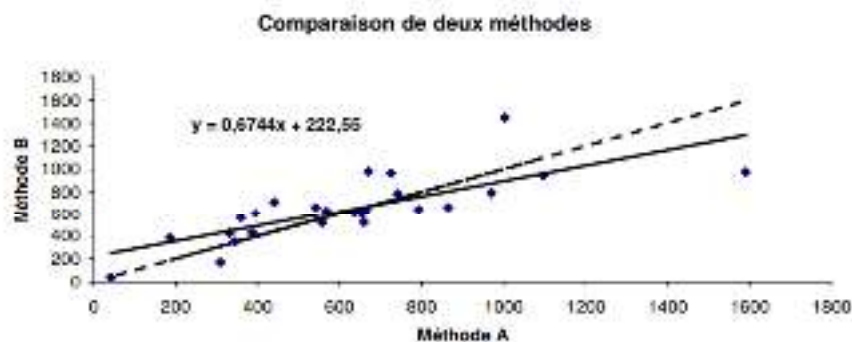
Matériaux Différents	méthode alternative:				méthode de référence:				différence
	répétitions		moyenne	écart-type	répétitions		moyenn e	écart- type	
	1	2			1	2			
1	11,5	11,5	11,500	0,0000	12,0	11,6	11,80	0,2828	0,300
2	16,2	17,4	16,800	0,8485	16,3	16,7	16,50	0,2828	-0,300
3	22,0	22,5	22,250	0,3536	20,5	20,6	20,55	0,0707	-1,700
4	25,8	25,6	25,700	0,1414	24,3	24,2	24,25	0,0707	-1,450
5	27,6	27,5	27,550	0,0707	26,4	26,6	26,50	0,1414	-1,050
6	33,2	34,1	33,650	0,6364	32,6	32,4	32,50	0,1414	-1,150
7	39,3	37,9	38,600	0,9899	40,0	39,9	39,95	0,0707	1,350
8	38,3	38,7	38,500	0,2828	37,8	37,9	37,85	0,0707	-0,650
9	42,2	42,8	42,500	0,4243	43,5	43,4	43,45	0,0707	0,950
10	45,7	44,2	44,950	1,0607	47,0	46,9	46,95	0,0707	2,000

	conclusion
moyenne des différences	-0,170
écart-type des différences	1,267
valeur expérimentale w	0,134
valeur critique (VC) à: 5%	2
test: "justesse entre les deux méthodes"	accepter

Exemple : la similitude des méthodes comparées

Méthode A	Méthode B	Ecart
344	348	-4
541	660	-124
441	712	-271
654	598	58
395	606	-210
865	664	201
742	763	-41
1003	1446	-442
1086	947	149
558	515	43
588	629	-61
381	423	-62
309	166	140
636	607	29
725	965	-240
1500	976	614
42	38	8
659	520	139
359	553	-204
186	384	-198
387	428	-41
664	631	33
792	846	-148
670	981	-311
970	796	175

$a = 0,674391006$ $222,549235$ b
 $s_a = 0,119177116$ $83,2627179$ s_b
 $0,581978418$ $190,543518$
 $32,02121429$ 23
 $1162588,857$ $835057,143$
 Intervalle de confiance sur b : 0,4 0,8
 Intervalle de confiance sur b : 50,3 394,0



Chapitre II: L'estimation des incertitudes

II.1. Introduction

L'incertitude est un outil d'aide à la décision et à l'interprétation.

Son évaluation va permettre de prendre en compte une information importante du processus d'analyse que le résultat seul n'intègre pas.

Les objectifs en matière d'incertitudes sont :

- L'évaluation,
- La mention dans les rapports,
- L'utilisation à des fins de déclaration de conformité.

L'identification et le suivi des composantes d'incertitude contribuent largement à la maîtrise des méthodes d'essais et d'étalonnages.

II.2. Evaluation des incertitudes

La norme ISO 17025 indique que le laboratoire d'essai doit documenter ses dispositions pour l'évaluation des incertitudes de mesure et quantifier ces incertitudes de mesure lorsqu'il existe des méthodes de calcul appropriées.

Plusieurs démarches sont possibles pour obtenir l'incertitude de mesure, telles que :

- l'évaluation par analyse des composantes d'incertitude,
- l'application de la « loi de composition des variances »,
- l'utilisation de la fidélité et de la justesse de la méthode d'essai ou d'analyse,
- la détermination du biais à l'aide de matériau de référence,
- l'utilisation de données d'essais d'aptitude.

Lorsque la norme d'essai n'est pas explicite sur la démarche d'évaluation des incertitudes, et qu'il n'existe pas de position sectorielle consignée dans les guides techniques ou dans les documents d'exigences spécifiques du Cofrac, il est exigé des laboratoires l'approche minimale suivante :

➤ Identification des facteurs susceptibles d'influencer le résultat de mesure (pour tous les essais, y compris les essais qualitatifs).

- .a. Etablir la liste des facteurs ayant potentiellement une influence sur le ou les résultats de l'essai (essai quantitatif ou pas).

Sont bien sûr inclus dans cette liste les paramètres pour lesquels la méthode d'essai (normalisée ou non) fixe une plage de valeurs tolérées.

- .b. Si certains facteurs ont une influence jugée non significative, préciser les éléments qui permettent d'apporter la preuve que l'on peut négliger leur prise en compte.
- .c. Montrer comment on maîtrise les facteurs influents (par exemple, si la méthode d'essai impose de soumettre un objet à une température de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, on doit montrer que la température mesurée affectée de son incertitude de mesure est bien comprise dans cette plage).

II.3. Le recensement des sources d'incertitudes : s'appuie sur l'étude des 5 M (Matériel – Méthode – Main d'œuvre – Matériau – Milieu) en :

- listant toutes les sources d'incertitudes,
- jugeant l'influence de chaque source sur le matériau
- indiquant comment elle sera prise en compte dans l'estimation finale (QIC et/ou un EIL et/ou plan d'expérience et/ou métrologie).

Matériels

Appareils, équipements automate, informatique.

- Métrologie des moyens d'essai : à chaque principaux moyens d'essai (précisés dans la colonne correspondante) est associé le type d'opération à leur appliquer (confirmation métrologique, contrôle fonctionnel...).
- Principaux moyens d'essai pour chaque méthode d'essai : les moyens principaux sur lesquels repose la bonne réalisation de l'essai ont été listés.

Méthode

Mode opératoire ou principe de la méthode d'essai en dégagant les grandes lignes, les principes mis en œuvre et les moyens pour avoir le résultat attendu.

Moyens humains

Prise en compte du changement de personnes

Matériau ou objet soumis à essai

Prise en compte des différents types de matrice

Milieu

Conditions ambiantes (température, pression atmosphérique...)

➤ Quantification (pour les essais dont le résultat s'exprime d'une manière quantitative)

- .a. Lorsqu'on dispose d'études exploitables de la fidélité de la méthode (valeur publiée, cartes de contrôles, essais interlaboratoires, ...), l'écart-type de fidélité est une des composantes de l'incertitude ; l'écart-type de fidélité peut constituer une estimation
- .b. suffisante de l'incertitude-type du résultat de mesure si tous les facteurs listés en 1 ont bien été pris en compte dans l'étude de fidélité.
- .c. L'influence de chaque facteur identifié en 1, dont l'influence est jugée significative et qui n'est pas pris en compte dans une étude de fidélité, doit être analysée et quantifiée (dans l'unité de mesure du résultat).
- .d. Estimer l'incertitude à partir de ces composantes.

Cette démarche est cohérente avec les recommandations du GUM, du fascicule FD X07-021 et des guides internationaux.

Le laboratoire doit identifier la finalité de l'essai, pour confirmer la nécessité de faire figurer, ou non, l'incertitude de mesure sur le rapport sur les résultats.

La mention de l'incertitude dans le rapport sur les résultats est fonction à la fois des exigences exprimées par le client et de celles contenues dans les référentiels.

Tableau conformité aux exigences client, revue de demande

	Exigences du client (traçable au niveau de la revue de demande)	
Exigences du référentiel ⁽¹⁾	Le client du laboratoire lui demande que l'incertitude ⁽³⁾ soit mentionnée dans le rapport	Le client du laboratoire lui demande que l'incertitude ⁽³⁾ <u>ne</u> soit <u>pas</u> mentionnée dans le rapport OU BIEN Le client du laboratoire ne précise rien.
Le référentiel ⁽¹⁾ mentionne explicitement que les limites de spécifications ⁽³⁾ ont été fixées sans tenir compte de l'incertitude ⁽³⁾	L'incertitude ⁽³⁾ doit être indiquée dans le rapport	
Le référentiel ⁽¹⁾ mentionne explicitement que les limites de spécifications ⁽²⁾ ont été fixées en tenant compte de l'incertitude ⁽³⁾ OU BIEN Le référentiel ⁽¹⁾ ne mentionne rien quant aux incertitudes ⁽³⁾	L'incertitude ⁽³⁾ doit être indiquée dans le rapport	L'incertitude ⁽³⁾ peut ne pas être indiquée dans le rapport

(1) Référentiel : la notion de référentiel est à considérer ici au sens large ; il peut s'agir de référentiel réglementaire, de normes nationales, régionales ou internationales, de documents techniques publiés par des organisations techniques de renom, par des revues scientifiques spécialisées ou par le fabricant de l'équipement.

Il peut également s'agir de référentiels clients.

(2) Limite de spécification : cela englobe aussi la notion de tolérance à ne pas dépasser ou de seuils à atteindre.

(3) Incertitude : incertitude associée au résultat final.

II.4. Utilisation des incertitudes de mesure dans le cadre des déclarations de conformité

La manière de prendre en compte l'incertitude de mesure dans les processus de déclaration de conformité n'est pas unique.

Selon les produits, les domaines de mesure, les référentiels, les professions ou encore les pays, les règles et les pratiques diffèrent.

Déclarer conforme ou non-conforme un produit génère deux risques :

le risque dit « client », qui est le risque de déclarer à tort que le produit est conforme

le risque dit « fournisseur », qui est le risque de déclarer à tort que le produit est non conforme.

Le laboratoire ne sait pas toujours si le produit dont on lui demande de vérifier les spécifications doit être examiné sous l'angle du « fournisseur » ou du « client ».

En effet, il intervient en situation de tierce partie, dont les travaux feront l'objet d'utilisation par d'autres entités qui, elles, assument de fait les risques.

Par exemple, ce sont le pollueur (fournisseur) et le citoyen (client), concernés par un effluent toxique (le produit) soumis à une réglementation (la spécification), qui assument les risques issus du travail du laboratoire accrédité caractérisant l'émission d'effluent.

Si pollueur et citoyen veulent étayer leur comportement par la seule déclaration de conformité énoncée, ou non, par le laboratoire accrédité, il est évidemment essentiel qu'ils soient, de façon lisible et transparente, parties prenantes à la définition de la règle appliquée, qui conditionne le risque qu'eux-mêmes acceptent d'assumer.

Lorsque le laboratoire appartient soit au fournisseur (contrôle de production...), soit au client (contrôle de réception...), c'est en fait l'entité qui dispose en son sein de ce laboratoire qui assume le risque, et donc doit contribuer, là encore de façon lisible et transparente, à l'établissement des critères permettant de déclarer, ou non, la conformité. Les données fondamentales sur lesquelles s'appuie la décision sont :

- la (ou les) limite(s) de la spécification qui est imposée à la caractéristique du produit;
- le ou les résultats de mesure/ d'essai de la caractéristique ;
- l'incertitude de mesure affectant le résultat de mesure/ d'essai ;
- le choix du niveau de risque accepté par le client du laboratoire accrédité ;
- la règle de décision (c'est-à-dire la manière de combiner les données précédentes pour déclarer, ou non, la conformité).

En pratique, les principales difficultés rencontrées par les laboratoires pour déclarer, ou non, la conformité, sont les suivantes :

- indisponibilité ou définition insuffisante de la spécification et donc interprétation ambiguë
- difficulté à évaluer l'incertitude, notamment celle associée aux essais qualitatifs
- absence ou méconnaissance de la règle de décision à appliquer

Il est donc fondamental qu'au moment de la revue de la demande, un dialogue s'engage entre le laboratoire et son client afin d'établir le niveau de risque devant être utilisé pour déclarer, ou non, la conformité, et que la règle définie à l'issue de cette discussion soit formalisée dans le « contrat ».

NB : La déclaration de conformité ne relève pas, au sens strict de la norme NF EN ISO/CEI 17025, des avis et interprétations.

Le laboratoire doit identifier avec son client s'il y a lieu d'émettre une déclaration de conformité/non conformité, suivant l'objectif visé par les essais.

Les spécifications et la règle de décision utilisées doivent correspondre au besoin du client.

L'utilisation de l'incertitude de mesure pour déclarer la conformité est fonction à la fois des exigences exprimées par le client et de celles contenues dans les référentiels selon le tableau.

	Exigences du client (traçable au niveau de la revue de demande)	
Exigences du référentiel ⁽¹⁾	Le client du laboratoire lui demande de prendre en compte l'incertitude ⁽³⁾ pour établir la conformité	Le client du laboratoire lui demande de ne pas prendre en compte l'incertitude ⁽³⁾ pour établir la conformité OU BIEN Le client du laboratoire ne précise rien.
Le référentiel ⁽¹⁾ mentionne explicitement que les limites de spécifications ⁽³⁾ ont été fixées sans tenir compte de l'incertitude ⁽³⁾	Déclaration de conformité ⁽⁴⁾ Cas n°1	
Le référentiel ⁽¹⁾ mentionne explicitement que les limites de spécifications ⁽²⁾ ont été fixées en tenant compte de l'incertitude ⁽³⁾	Déclaration de conformité ⁽⁴⁾ Cas n°2	
Le référentiel ⁽¹⁾ ne mentionne rien quant aux incertitudes ⁽³⁾	Déclaration de conformité ⁽⁴⁾ Cas n°1	Déclaration de conformité ⁽⁴⁾ Cas n°2

- (1) Référentiel : la notion de référentiel est à considérer ici au sens large ; il peut s'agir de référentiel réglementaire, de normes nationales, régionales ou internationales, de documents techniques publiés par des organisations techniques de renom, par des revues scientifiques spécialisées ou par le fabricant de l'équipement. Il peut également s'agir de référentiels clients.
- (2) Limite de spécification : cela englobe aussi la notion de tolérance à ne pas dépasser ou de seuils à atteindre.
- (3) Incertitude : incertitude associée au résultat final.
- (4) La déclaration de conformité, lorsque le laboratoire la réalise, s'appuie sur une règle du type :
Cas 1 : décision = fonction (résultat(s) de mesure, incertitude associée, limites de spécification)
Dans ce cas, le rapport doit signaler l'utilisation faite de l'incertitude de mesure.
Exemple ; « Pour déclarer ou non la conformité, l'intervalle de spécifications a été réduit de la valeur de l'incertitude associée au résultat. »
Cas 2 : décision = comparaison de (résultat(s) de mesure) aux (limites de spécification) Dans ce cas, le rapport doit signaler l'utilisation faite de l'incertitude de mesure. Exemple : « Pour déclarer ou non la conformité, il n'a pas été tenu compte de l'incertitude associée au résultat ».
Lorsque des dispositions réglementaires existent, elles prévalent sur les dispositions énoncées dans ce paragraphe

II.5 : Evaluation des incertitudes de mesure des essais

Suivant les exigences de la norme ISO/IEC 17025 : 2017, un laboratoire procédant à des essais doit évaluer l'incertitude de mesure (7.6.3). Cette exigence intervient pour donner une indication quantitative sur la qualité du résultat pour que les utilisateurs puissent estimer sa fiabilité.

La méthode de calcul d'incertitude ainsi utilisée, est basée sur les recommandations, les normes et les guides en vigueur.

II.5.1 Termes et définitions:

Incertitude de mesure : paramètre non négatif qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à une mesurande, à partir des informations utilisées.

Incertitude type : incertitude de mesure exprimée sous la forme d'un écart type

SR : écart type de reproductibilité obtenu lors de la comparaison inter laboratoires

Uref : incertitude de mesure sur la valeur de référence.

Incertitude type composée : incertitude type obtenue en utilisant les incertitudes types associées aux grandeurs d'entrée dans un modèle de mesure.

Incertitude élargie : produit d'une incertitude type et d'un facteur supérieur à 1

Facteur d'élargissement : nombre supérieur à 1 par lequel on multiplie une incertitude type composée pour obtenir une incertitude élargie

u_{RW} : composante d'incertitude type de la reproductibilité intra laboratoire.

U_b : composante d'incertitude type associée au biais de la méthode et du laboratoire.

EMT : valeur extrême de l'erreur de mesure, par rapport à une valeur de référence connue, qui est tolérée par les spécifications ou règlements pour un mesurage, un instrument de mesure ou un système de mesure donné.

II.5.2. Principe

L'incertitude du résultat d'un mesurage reflète l'impossibilité de connaître exactement la valeur du mesurande (3.3.1 : JCGM 100 :2008). Le résultat d'un mesurage après correction des effets systématiques reconnus reste encore seulement une estimation de la valeur du mesurande, en raison de l'incertitude provenant des effets aléatoires et de la correction imparfaite du résultat pour les effets systématiques.

Dans tout processus d'évaluation d'incertitude de mesure, il faut estimer les incertitudes-types $u(x_i)$ de chacune des composantes intervenant dans l'incertitude composée $u_c(x)$.

II.5.3. Analyse du processus de calcul

L'incertitude de mesure comprend en général de nombreuses composantes. Certaines peuvent être évaluées par une **évaluation de type A** de l'incertitude à partir de la distribution statistique des valeurs provenant de séries de mesurages et peuvent être caractérisées par des écarts-types. Les autres composantes, qui peuvent être évaluées par une **évaluation de type B** de l'incertitude, peuvent aussi être caractérisées par des écarts-types, évalués à partir de fonctions de densité de probabilité fondées sur l'expérience ou sur d'autres informations.

II.5.3. a Composante évaluée par une méthode de type A

L'évaluation de type A est une évaluation d'une composante de l'incertitude de mesure par une analyse statistique des valeurs mesurées obtenues dans des conditions définies de mesurage. Elle consiste à réaliser un nombre *n* mesurages et à calculer un **écart-type expérimental**.

II.5.3.b Composante évaluée par une méthode de type B

L'évaluation de type B est une évaluation d'une composante de l'incertitude de mesure par d'autres moyens différents de l'évaluation de type A.

Elle est fondée sur des informations, par exemple:

- Associées à des valeurs publiées faisant autorité (normes, guide...).
- Associées à la valeur d'un matériau de référence certifié.
- Associées aux facteurs d'influence (température, pression...)
- Associées à la quantification des instruments utilisés.
- Obtenues à partir d'un certificat d'étalonnage.
- Obtenues à partir de la classe d'exactitude d'un instrument de mesure vérifié.
- Obtenues à partir de limites déduites de l'expérience personnelle.
- Concernant la dérive.

II.5.3.c Identification des sources d'incertitudes

Pour un calcul rigoureux de l'incertitude, il faut lister l'ensemble des sources éventuelles d'incertitudes. Ces différentes sources sont analysées par le diagramme de causes et effets qui schématise graphiquement les causes aboutissant à un effet sur l'incertitude en relation avec des sources potentiellement significatives (figure 01).

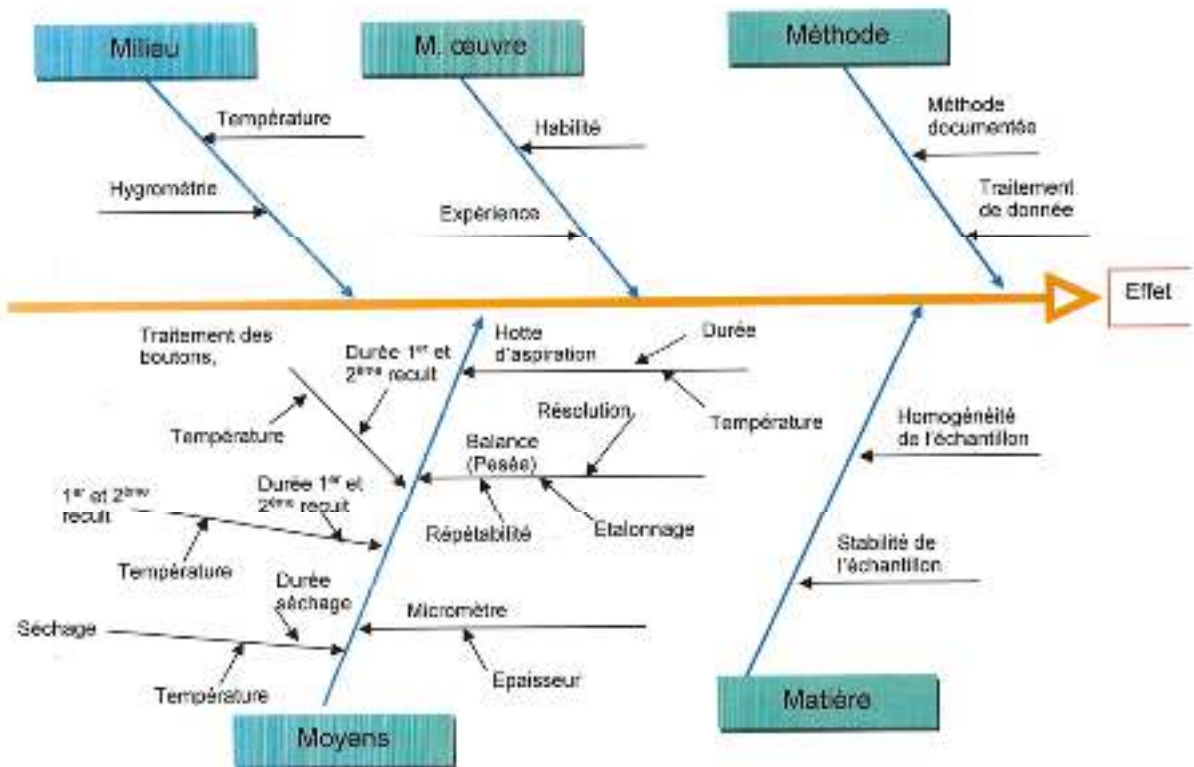


Figure 07 : Diagramme de causes et effet (sources d'incertitudes)

II.5.4. Modélisation du mesurage

Dans de nombreux cas, un mesurande (y) n'est pas mesuré directement mais il est déterminé à partir de n autres grandeurs x_1, x_2, \dots, x_n à travers une relation fonctionnelle f .

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n)$$

Les grandeurs d'entrée x_1, x_2, \dots, x_n dont dépend la grandeur de sortie (y) peuvent elles-mêmes être envisagées comme mesurandes et peuvent elles-mêmes dépendre d'autres grandeurs, y compris les corrections et facteurs de correction pour les effets systématiques, aboutissant de ce fait à une relation fonctionnelle compliquée (f). L'estimation d'une incertitude de mesure va comprendre un certain nombre d'étapes, le parcours de ces étapes constituera la procédure (tableau 1).

– Procédure d'estimation des incertitudes de mesure		
Étapes	Objectifs de l'étape	Opérations élémentaires
1	Calcul du résultat de mesure	<ul style="list-style-type: none"> - Définir le mesurande - Analyser le processus de mesure - Faire un budget des causes d'erreur - Déterminer les corrections et définir les répétitions des observations afin de réduire les erreurs - Établir le mode opératoire - Écrire le modèle du processus de mesure
2	Calcul des incertitudes-types	<ul style="list-style-type: none"> - Évaluer les incertitudes de chacune des composantes intervenant dans le modèle - Application des méthodes de type A - Application des méthodes de type B
3	Calcul de l'incertitude composée	Application de la loi de propagation des incertitudes
4	Expression finale du résultat de mesure	Calcul de incertitude élargie

II.5.4.a Évaluation de Type A

La meilleure estimation disponible de l'espérance mathématique (la moyenne) μ_q d'une grandeur q qui varie au hasard et pour laquelle on a obtenu n observations indépendantes q_k dans les mêmes conditions de mesure est la moyenne arithmétique des n observations.

Elle est calculée comme suit :

$$\bar{q} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n q_k$$

La variance expérimental caractérise la variabilité (dispersion autour de la moyenne) des valeurs observées q_k , ou, plus spécifiquement, leur dispersion autour de leur moyenne \bar{q} , elle est exprimée comme suit :

$$s^2(q_k) = \frac{\sum_{i=1}^n (q_i - \bar{q})^2}{n - 1}$$

Donc l'incertitude-type est donnée par l'équation suivante:

$$u(q_k) = \sqrt{s^2(q_k)} = s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (q_i - \bar{q})^2}{n - 1}}$$

II.5.4.b Évaluation de Type B

Pour une estimation x_i d'une grandeur d'entrée X_i qui n'a pas été obtenue à partir d'observations répétées, l'incertitude-type $u(x_i)$ est évaluée par un jugement scientifique fondé sur toutes les informations disponibles au sujet de la variabilité possible de X_i .

L'ensemble d'informations accumulées peut comprendre :

- Des résultats de mesures antérieures ;
- L'expérience ou la connaissance générale du comportement et des propriétés des matériaux et instruments utilisés ;
- Les spécifications du fabricant;
- Les données fournies par des certificats d'étalonnage ou autres certificats;
- L'incertitude assignée à des valeurs de référence provenant d'ouvrages et manuels.

Les $u(x_i)$ évalués de cette façon sont appelés incertitude-type de Type B.

Exemple :

- Le constructeur fournit l'incertitude-type $u(m)$. Dans ce cas, on utilise directement son incertitude.
- Pour une mesure avec un instrument à graduation (appareil à cadran, lecture d'un réglet, d'un thermomètre ...), l'incertitude type de lecture est : $u = \frac{q}{\sqrt{6}}$ (q : étant la graduation).

- Pour une mesure avec un instrument à affichage numérique, si la résolution est q , l'incertitude-type de lecture est donnée par la relation $u = \frac{q}{2\sqrt{3}}$
- Pour vérifier qu'un instrument est conforme à une classe : si la classe est $\pm a$, l'incertitude-type est : $u = \frac{a}{\sqrt{3}}$

II.5.4.c Détermination de l'incertitude composée :

L'incertitude-type de y , où y est l'estimation du mesurande Y , donc le résultat du mesurage, est obtenue par une composition appropriée des incertitudes-types des estimations d'entrée x_1, x_2, \dots, x_n . Cette incertitude-type composée de l'estimation y est notée $u_c(y)$ dans le cas où toutes les grandeurs d'entrée sont indépendantes.

L'incertitude-type composée $u_c(y)$ est la racine carrée de la variance composée $u_c^2(y)$, donnée par :

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N \left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^2 u^2(x_i)}$$

Si on effectue des mesures indépendantes a, b, c et d , l'incertitude type composée sur le résultat de mesure X est $u_c(y)$. Selon la loi de propagation des incertitudes, $u_c(y)$ s'écrit sous la forme suivante :

Si

$$y = a + b + c + d$$

Alors

$$u_c^2(y) = u^2(a) + u^2(b) + u^2(c) + u^2(d)$$

Ou

$$u_c(y) = \sqrt{u^2(a) + u^2(b) + u^2(c) + u^2(d)}$$

Avec :

- $u^2(a)$: incertitude-types évaluée par la méthode type A
- $u^2(b), u^2(c)$ et $u^2(d)$: incertitude-types évaluée par la méthode type B

Si

$$y = (a \times b)/(c \times d)$$

Alors

$$u_c^2(y) = \frac{u^2(a)}{a^2} + \frac{u^2(b)}{b^2} + \frac{u^2(c)}{c^2} + \frac{u^2(d)}{d^2}$$

Ou

$$u_c(y) = \sqrt{\frac{u^2(a)}{a^2} + \frac{u^2(b)}{b^2} + \frac{u^2(c)}{c^2} + \frac{u^2(d)}{d^2}}$$

II.5.4.d Détermination de l'incertitude élargie

L'incertitude élargie $U(x)$ est définie comme étant l'incertitude-type composée $u_c(y)$ multipliée par un facteur d'élargissement k (généralement $K = 2$ avec une confiance à environ 95%).

Donc

$$U(x) = u_c \times k$$

II.5.5. Interprétation des résultats :

Au finale le résultat d'analyse s'écrit comme suit

$$\bar{X} \pm U(x)$$

Avec :

- \bar{X} : Valeur brutes.
- $U(x)$: Incertitude élargie associée à la valeur mesurée.

Les valeurs de \bar{X} et $U(x)$ doivent être exprimés avec le même nombre de décimale et la même unité avec la précaution d'arrondir la valeur de \bar{X} et majoré la valeur de $U(x)$ au plus à deux (02) décimal après la virgule.

II.6. Estimation des incertitudes de mesure en microbiologie

II.6.1 Termes et définitions :

Échantillon : un ou plusieurs individus (ou une fraction de matière) sélectionnés de différentes façons dans une population.

Échantillon pour laboratoire : échantillon dans l'état de préparation où il est envoyé au laboratoire et destiné à être utilisé pour un contrôle ou pour des essais.

Échantillon pour essai : échantillon préparé à partir de l'échantillon pour laboratoire selon le mode opératoire spécifié dans une méthode d'essai, et à partir duquel les prises d'essai sont prélevées.

Prise d'essai : échantillon représentatif mesuré (volume ou masse) prélevé sur l'échantillon pour laboratoire.

Mesurande : Grandeur particulière soumise à mesurage

Conditions de fidélité intermédiaire : conditions où les résultats d'essai ou résultats de mesure sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai/de mesure identiques sur la même installation d'essai ou de mesure, dans différentes conditions de fonctionnement données.

Conditions de reproductibilité : conditions où les résultats d'essai/de mesure indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai/de mesure identiques sur différentes installations d'essai ou de mesure avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents

Reproductibilité intra laboratoire

Fidélité intermédiaire : Étroitesse d'accord entre des résultats d'essai obtenus par la même méthode, sur des matériels d'essai identiques ou similaires, dans le même laboratoire, avec différents opérateurs utilisant des équipements différents

Incertitude de mesure (IM) : Paramètre, associé au résultat d'un mesurage, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourraient raisonnablement être attribuées au mesurande

incertitude-type u : Incertitude du résultat d'un mesurage exprimée sous la forme d'un écart-type

incertitude-type composée $u_c(y)$: incertitude-type du résultat d'un mesurage, lorsque ce résultat est obtenu à partir des valeurs d'autres grandeurs, égale à la racine carrée d'une somme de termes,

ces termes étant les variances ou covariances de ces autres grandeurs, pondérées selon la variation du résultat de mesure en fonction de celle de ces grandeurs

Incertitude élargie U : grandeur définissant un intervalle autour du résultat d'un mesurage, dont on puisse s'attendre à ce qu'il comprenne une fraction élevée de la distribution des valeurs qui pourraient être attribuées raisonnablement au mesurande

Incertitude technique : Incertitude découlant de la variabilité opérationnelle associée aux étapes techniques du mode opératoire d'analyse.

Incertitude de matrice : Incertitude découlant du fait que la prise d'essai n'est pas véritablement représentative de l'échantillon pour laboratoire

Incertitude de distribution : Incertitude découlant de la variabilité intrinsèque associée à la distribution de microorganismes dans l'échantillon, la suspension mère et les dilutions suivantes

II.6.2 Principe

En absence de matériau de référence certifié (MRC) qui peut être utilisé comme matériau d'essai, le calcul des incertitudes du laboratoire se base sur utilisation des données des résultats du contrôle qualité analytique obtenus sur dix échantillons de différentes matrices dans le domaine de l'analyse des produits rentrant dans la portée de l'accréditation de notre laboratoires.

L'estimation de l'incertitude technique, nécessite de calculer, la reproductibilité intra laboratoire des résultats obtenus selon un protocole d'analyse de deux prises d'essai à partir de chaque échantillon bien préparé pour réduire le plus possible les contributions de l'incertitude de matrice, en mélangeant correctement les échantillons avant de prélever les prises d'essai. L'incertitude de matrice découle du mélange imparfait de l'échantillon pour laboratoire, ce qui entraîne une mauvaise reproductibilité des niveaux microbiens entre les prises d'essai, pouvant être importante pour les matrices solides, et plus particulièrement pour les produits alimentaires composés. L'incertitude de matrice est estimée pour chaque type de matrice. Même en cas de matériau homogène, la distribution aléatoire des micro-organismes donne lieu à une incertitude de distribution.

On calcule l'incertitude-type composée comme la racine carrée de la somme des carrés de l'incertitude-type technique, de l'incertitude-type de matrice et de toute incertitude-type de distribution.

II.6.3 Incertitude technique :

L'incertitude technique est estimée à partir de l'écart-type de reproductibilité, s_R , sur le résultat final du processus de mesure.

II.6.3.a Préparation de l'échantillon pour laboratoire :

avant de prélever les prises d'essai, il est fortement recommandé de réaliser une homogénéisation appropriée en mélangeant correctement les échantillons pour laboratoire qui peuvent être :

- des liquides non visqueux et des poudres (lait de vache, lait de coco ou lait en poudre par exemple) ;
- des solides émincés/hachés finement ou des suspensions/émulsions (viande hachée, viande séparée mécaniquement, merguez, crème fouettée, crème glacée par exemple).

II.6.3.b Prises d'essai

Prélever au moins deux prises d'essai sur chaque échantillon pour laboratoire (ou pour essai) afin de permettre des mesures répétées.

II.6.3.c Suspension mère

Réaliser les analyses sur chaque prise d'essai comme s'il s'agissait d'essais de routine, en préparant une série de dilutions décimales, en ensemençant une ou deux boîtes par dilution.

II.6.3.d Calculs
Pour les techniques par comptage des colonies, s'assurer qu'un nombre suffisamment grand de colonies comptées puisse être utilisé pour effectuer les calculs. Il convient d'exclure les résultats de dénombrement fondés sur moins de 30 colonies comptées, cette limite de 30 colonies veut dire la somme des nombres totaux de colonies comptées sur l'ensemble des boîtes, ΣC pour un seul résultat. Tout comme les comptages supérieurs au nombre maximal par boîte (300 UFC/boîte dans la plupart des cas).

II.6.4. L'incertitude de Reproductibilité intra laboratoire L'opération exige d'établir clairement et sans ambiguïté ce qui va être mesuré et de donner une expression quantitative reliant la valeur du mesurande aux paramètres dont il dépend.

L'estimation des incertitudes dans nos laboratoires n'est pas associée à la procédure d'échantillonnage et qui ne doit être prise en compte. Une fois la mesurande est défini, l'étape suivante consiste à quantifier l'incertitude générée par les différentes sources d'incertitudes.

Dans les Conditions de reproductibilité intra laboratoire, l'estimation des variations aléatoires des résultats de mesure de chaque échantillon analysé en double dans une période de son stabilité et qui doit être réalisée dans les mêmes conditions que pour l'analyse de routine. Ainsi, Au moins dix mesures sont nécessaires (séries) pour l'estimation de cette composante d'incertitude sont à effectuer dans des «conditions intra laboratoire». Ces conditions comprises entre les conditions de répétabilité et les conditions de reproductibilité sont appelées «reproductibilité intra laboratoire». Ces conditions sont généralement employées lorsque les échantillons de contrôle qualité qui sont analysés sont similaires aux échantillons d'essai.

Une série peut être représentée par un jour mais aussi par une combinaison de diverses sources d'incertitude, comme plusieurs appareils, plusieurs opérateurs et plusieurs jours. Pour les n (au moins 10) échantillons pour laboratoire, les résultats (y_{1A} et y_{1B}) de chaque prise d'essai sont utilisés pour calculer l'écart-type de reproductibilité intra laboratoire, s_{RI} , tel que dans la Formule suivante :

$$s_{RI} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

Où

i est l'indice de l'échantillon, $i = 1$ à n ($n \geq 10$); y_{iA} , y_{iB} sont les données logarithmiques, exprimées en \log_{10} UFC/g ou ml, à partir des conditions A et B respectivement. Comme le veut l'usage en microbiologie alimentaire, transformer le résultat de chaque prise d'essai en UFC/g ou ml en \log_{10} UFC/g ou ml avant de procéder aux calculs.

II.6.5 Incertitude de matrice :

C'est la variation entre les résultats de différentes prises d'essai prélevées sur le même échantillon pour laboratoire à cause de la distribution microbienne dans une matrice donnée. Pour les

échantillons homogènes ou bien qui on subit une homogénéisation approprié, leur incertitude de matrice est relativement faible, en général $u_{\text{matrice}} = 0,1 \log_{10} \text{ UFC/g ou ml}$.

Autrement dit, Sous réserve que l'intégralité de l'échantillon pour laboratoire puisse être homogénéisée avant le prélèvement de la prise d'essai, l'incertitude de matrice peut être prise à une valeur fixe de $u_{\text{matrice}} = 0,1 \log_{10}$.

II.6.6 Incertitude de distribution :

L'incertitude de distribution découle de la distribution aléatoire des micro-organismes dans le matériau d'essai. Pour les méthodes d'analyses fondées sur une technique par comptage des colonies, l'incertitude de distribution, dépend du nombre total de colonies comptées utilisées dans le calcul du résultat, ΣC et elle se calcul à l'aide de la formule suivante :

$$u_{\text{Poisson}} = \frac{1 / \ln(10)}{\sqrt{\Sigma C}} = \frac{0,4343}{\sqrt{\Sigma C}}$$

Calcul de l'incertitude-type composée : L'incertitude-type composée est fondée sur l'une une combinaison des estimations réalisées séparément de:

- 1) l'incertitude-type technique ;
- 2) l'incertitude-type de matrice ;
- 3) les incertitudes-type de distribution ; Selon l'Équation :

$$u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tech}}^2 + u_{\text{matrice}}^2 + u_{\text{Poisson}}^2}$$

Calcul de l'incertitude élargie :

En appliquant un facteur d'élargissement $k = 2$ avec approximativement à un intervalle de confiance symétrique de 95 %, l'incertitude élargie, U , est calculé selon l'équation suivant :

$$U = 2 u_c(y)$$

II.7. Estimation des incertitudes de mesure en physicochimie

II.7.1. Principe

En absence de matériau de référence certifié (MRC) qui peut être utilisé comme matériau d'essai, le calcul des incertitudes du laboratoire se base sur utilisation des données des analyses de participation aux essais inter laboratoires et les résultats du contrôle qualité analytique obtenus sur le matériau d'essai fourni par le PROVIDER dans le domaine de l'analyse des produits.

L'estimation de l'incertitude, nécessite de calculer indépendamment, la reproductibilité intra laboratoire pour estimer l'incertitude lié aux erreurs aléatoires et l'incertitude associé au biais de la méthode et du laboratoire due aux erreurs systématiques au moyen des données appropriées issues des essais inter laboratoires et des résultats du contrôle qualité analytique.

L'incertitude de mesure composée calculée comme la somme quadratique de la composante d'incertitude de la reproductibilité intra laboratoire et de la composante d'incertitude associée au biais de la méthode et du laboratoire, est multipliée par un facteur d'élargissement égal à 2 pour obtenir l'incertitude élargie à un niveau de confiance d'environ 95 %.

II.7.2. Calcul de l'incertitude de Reproductibilité intra laboratoire

L'opération exige d'établir clairement et sans ambiguïté ce qui va être mesuré et de donner une expression quantitative reliant la valeur du mesurande aux paramètres dont il dépend. L'estimation des incertitudes du laboratoire n'est pas associée à l'échantillonnage et qui ne doit pas être prise en compte. Une fois la mesurande est définit, l'étape suivante consiste à quantifier l'incertitude générée par les différentes sources d'incertitudes.

Dans les Conditions de reproductibilité intra laboratoire l'estimation des variations aléatoires des résultats de mesure de chaque échantillon analysé en double dans une période de son stabilité et qui doit être réalisée dans les mêmes conditions que pour l'analyse de routine. Ainsi, Au moins huit

mesures sont nécessaires (séries) pour l'estimation de cette composante d'incertitude sont à effectuer dans des «conditions intra laboratoire». Ces conditions comprises entre les conditions de répétabilité et les conditions de reproductibilité appelées «reproductibilité intra laboratoire».

Ces conditions sont généralement employées lorsque les échantillons de contrôle qualité qui sont analysés sont similaires aux échantillons d'essai. Une série peut être représentée par un jour mais aussi par une combinaison de diverses sources d'incertitude, comme plusieurs appareils, plusieurs opérateurs et plusieurs jours. Pour l'estimation de la composante d'incertitude de la reproductibilité intra laboratoire, u_{RW} , L'approche suivante est adoptée et décrite comme suit : Les échantillons de contrôle qualité (QC) stables, subissant l'intégralité du processus et la démarche pour réaliser un contrôle interne est la suivante :

- Réalisation au moins huit mesures pour un essai donné ;
- Entrer les données dans les colonnes du tableau de calcul ;
- Avant de passer au calcul de l'écart type de fidélité intermédiaire, il est indispensable de vérifier au préalable l'homogénéité des valeurs trouvées par le test de Grubbs autrement dit, la détection de valeurs aberrantes pourra être étudiée à travers le test de Grubbs comme suit : On lit la valeur de C table dans la table de Grubbs qui se trouve en annexe pour un risque α généralement choisi à 5% et pour n, nombre des échantillons analysés et k, nombre des répétitions par échantillons.

Après l'application de l'équation citée en annexes, si la valeur mesurée est plus petit ou gal à la valeur tabulée, alors on accepte la valeur. Lorsque l'on rencontre des valeurs extrêmes ou aberrantes, il faut les supprimer et les différents calculs se feront sur les résultats acceptables.

- Calculer la moyenne et l'écart-type de ces données en appliquant les formules utilisées dans la macro relative au calcul de la fidélité ;
- La composante d'incertitude de la reproductibilité intra laboratoire, u_{RW} , est estimée à partir de l'écart-type de ces résultats QC comme suit :



Où s_{Rw} est l'écart-type des résultats QC

II.7.3 Calcul de l'Incertitude du Biais de la méthode et du laboratoire

Les résultats des comparaisons inter laboratoires sont utilisés de la même manière que ceux des analyses des matériaux de référence. Pour déterminer une estimation du biais à partir des résultats de la comparaison inter laboratoires, le laboratoire doit analyser au moins six échantillons différents provenant d'une campagne de comparaisons inter laboratoires.

Plus le nombre d'échantillons est élevé, plus le niveau de confiance dans l'estimation augmente. L'incertitude du biais est calculée à partir de deux composantes, la première, les différences, D_i , entre les résultats de mesure et les valeurs assignées aux différents échantillons et la seconde est l'incertitude moyenne des valeurs assignées aux échantillons des comparaisons inter laboratoires qui ont été calculées sous forme de moyenne robuste ou de moyenne arithmétique à partir des résultats des laboratoires participants. La composante d'incertitude du biais peut être négligée si elle est $< u_{Rw} / 3$

- Toutes les valeurs de différence servent à estimer la moyenne quadratique des différences, D_{rms} , est calculé comme suit :

$$D_{rms} = \sqrt{\frac{\sum D_i^2}{n_{ilc}}}$$

Où

D_i : est la différence entre le résultat de mesure et la valeur assignée au i ème échantillon provenant de la comparaison inter laboratoires ;

n_{ilc} : est le nombre d'échantillons analysés lors de la comparaison inter laboratoires.

- L'incertitude moyenne des valeurs assignées aux échantillons est calculée comme suit:

$$u_{Ci\ ref} = \frac{\sum u_{Ci\ ref}}{n_{ilc}}$$

Où

$u_{Ci\ ref}$, est l'incertitude de la valeur assignée à l'échantillon i inter laboratoires ;

n_{ic} est le nombre d'échantillons analysés lors de la comparaison inter laboratoires.

Enfin, la composante d'incertitude-type associée au biais de la méthode et du laboratoire, u_b , est calculée comme suit :

$$u_b = \sqrt{\frac{Drms^2}{n_{ic}} + u_{Créf}^2}$$

$Drms$: est la moyenne quadratique des différences ;

$u_{Créf}$: est l'incertitude moyenne des valeurs assignées aux échantillons des comparaisons inter laboratoires.

II.7.4 Calcul de l'incertitude-type composée :

L'incertitude-type composée est calculée selon l'Équation

$$u_c = \sqrt{u_b^2 + u_{Créf}^2}$$

II.7.5 En appliquant un facteur d'élargissement $k = 2$ avec approximativement à un intervalle de confiance symétrique de 95 %, l'incertitude élargie, U , est calculé selon l'équation suivant :

$$U = 2 u_c$$

$$U_{rel} = 2 u_{c,rel}$$

ANNEXE

Exemple de présentation des résultats de lecture en microbiologie avec estimation de l'incertitude sur 10 matrices différentes de denrées alimentaires : lait reconstitué, semoule, eau de boisson, viande

PARTIE II : VALIDATION D'UNE METHODE ANALYTIQUE CONTROLE QUALITE EN PRELEVEMENTS

hachée, lait en poudre, fromage à patte molle, lait cru, farine panifiable, pattes raviolis, viande de poulet. Chaque essai est répété 2fois

O	Prise d'essai	Facteur de dilution (d) / Coloniés comptées C				Somme des coloniés
		d ₁	C ₁	d ₂	C ₂	
1	A	2	29	3	6	35
	B	3	59	4	4	63
2	A	5	61	6	6	67
	B	5	66	6	8	74
3	A	4	168	5	18	186
	B	4	86	5	7	93
4	A	5	266	6	25	291
	B	5	140	6	16	156
5	A	6	45	7	5	50
	B	5	129	6	15	144
6	A	4	129	5	12	141
	B	4	117	5	10	127
7	A	2	92	3	8	100
	B	2	131	3	13	144
8	A	3	139	4	13	152
	B	3	143	4	15	158
9	A	1	49	2	5	54
	B	1	129	2	13	142
10	A	4	142	5	13	155
	B	3	227	4	26	253

Ecart-type de reproductibilité intralaboratoire s_{Rj}

Somme des carrés des écarts	SR_j	Incertitude technique	Incertitude élargié
2,8572	0,3780	0,7559	0,7559

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ACS (1980) Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry, *Analytical chemistry*, 52, 14, 2242-2249

AFNOR (1994a) Norme française NF X 07-001 -Vocabulaire International des termes fondamentaux et généraux de métrologie AFNOR (1994b)

Norme NF ISO 5725-1 : Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 1 : Principes généraux et définitions.

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

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.

AFNOR (1996) Métrologie dans l'entreprise : outil de la qualité.

AFNOR (1998) Norme NF ISO 5725-5 : Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 5 : Méthodes alternatives pour la détermination de la fidélité d'une méthode de mesure normalisée.

AFNOR (1999) Norme XP T90-210 : Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence.

Feinberg M. (2000) La validation des méthodes d'analyse. *Le cahier des Techniques de l'Inra*, 44, 19-49.

Feinberg M. (2003) L'incertitude des mesures analytiques. *Le cahier des Techniques de l'Inra*, 50, 3-10

Feinberg, M. (2006) Approche globale et harmonisée de la validation. *Spectra Analyse*, 249, avril-mai 2006, 16-23.

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, 13-25

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 (1997) Guide 32 : Étalonnage en chimie analytique et utilisation de matériaux de référence certifiés

NF ISO 5725-1, (Décembre 1994) Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 1 : Principes généraux et définitions.

NF V03-110, (Décembre 1998) Procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence. AFNOR

NF ISO/CEI 17025, (2017) Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. AFNOR

Commission européenne (2002) Décision de la commission 2002/657 du 12 août 2002 portant 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

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

FAO (1997) Manuel sur le contrôle de la qualité des produits alimentaires. 14 : Assurance de la

qualité dans le laboratoire d'analyse chimique des aliments, Rome,

<http://www.fao.org/docrep/T0845F/t0845f00.HTM>

GEN 10 Rév 02 Politique sur les incertitudes dans le domaine d'étalonnage d'ALGERAC du 19-03-2018.

ILAC P14:01/2013 Politique de l'ILAC sur l'incertitude dans l'étalonnage.

EA-4/02 M: 2013 Evaluation de l'incertitude de mesure dans l'étalonnage.

JCGM 100:2008 Evaluation des données du mesure – Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure.

JCGM 200:2012 Vocabulaire international de métrologie — Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM).

ILAC P10: 01 /2013 Politique de l'ILAC sur la traçabilité des résultats de mesure.