

La validation des méthodes d'analyse est aujourd'hui un objectif important. Elle est souvent perçue comme une contrainte car elle fait appel à des démarches statistiques mal maîtrisées par les analystes. Les critères de performance sont exprimés en termes de caractéristiques analytiques. Les caractéristiques classiques qui devraient être prises en compte pour la validation des types d'essais sont la précision, l'exactitude, la limite de détection, la limite de quantification, la sélectivité, l'intervalle de linéarité et la robustesse.

I.1. Limites de détection et de quantification

Bien que la limite de détection (LD) soit un critère très utilisé en chimie analytique, de très nombreuses définitions qui créent des confusions sont rencontrées. Celle proposée par la norme FD V 01-000 est la suivante :

«La limite de détection est la plus petite concentration de l'analyte pouvant être détectée, mais non quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode.»

La définition de la LD en termes statistiques peut être traduite en disant qu'elle correspond à la concentration au-dessus de laquelle une faible probabilité de se tromper existe en acceptant l'hypothèse qu'un échantillon qui ne contient pas l'analyte (blanc échantillon) contient en fait l'analyte. Ce risque d'erreur (dit type I) est habituellement noté α dans les livres statistiques.

Pratiquement, le calcul de la limite de détection revient à faire un test d'égalité entre la valeur de la réponse instrumentale et la réponse pour un échantillon blanc (**Eq1**).

$$Y_{ld} = t_{1-\alpha} S_{bl} \quad (\text{Eq1})$$
$$Y_{NC} = Y_{LD} + t_{1-\beta} S_{bl} = (t_{1-\alpha} + t_{1-\beta}) S_{bl}$$

Avec S_{bl} écart-type d'un blanc,

$t_{1-\alpha}$ et $t_{1-\beta}$ variables de Student exprimées dans les mêmes unités que la réponse.

En outre, on rencontre dans la littérature une autre caractéristique, appelée limite de quantification (LQ), définie de la manière suivante dans la norme FD V 01-000 :

« La limite de quantification est la plus petite concentration de l'analyte pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. ».

Il s'agit de la plus petite concentration qui peut être quantifiée avec sûreté comme étant

différente du blanc. Elle n'a pas de signification statistique mais correspond plutôt à une pratique des analystes qui font la différence entre un échantillon réellement blanc et un échantillon non quantifiable (**Eq 2**). Selon les mêmes notations sa valeur est :

$$X_{LQ} = \frac{a_0 + 10Sa_0}{a_1} \quad (\text{Eq2})$$

a; la sensibilité,

S; Ecart type

D'autres paramètres statistiques existent, nous citons :

I.2. Incertitude de mesure

Selon une définition récente, l'incertitude est un « paramètre associé à une mesure ou à un résultat pour caractériser la dispersion raisonnable qui peut être associée au mesurande ». En outre, les textes les plus récents sur l'assurance qualité prévoient que le laboratoire doit disposer d'une procédure pour estimer l'incertitude de mesure « chaque fois que le client demande les incertitudes de mesure se rapportant à des essais spécifiques ou lorsqu'il est probable que l'incertitude compromettra la conformité à une spécification ».

I.3. Capacité de mesure

Une façon d'appréhender l'utilité d'une méthode d'analyse consiste à vérifier si les résultats qu'elle fournit permettent effectivement de prendre une décision. C'est le concept de capacité de mesure (ou capabilité de mesure) qui permet d'atteindre ce but en intégrant la variabilité du phénomène ou du lot qu'on veut contrôler et l'incertitude des mesurages. Il se définit comme le rapport suivant (**Eq 3**) :

$$\text{Capacité} = \frac{\textit{Tolérance acceptée}}{\textit{Incertitude}} \times 100 \quad (\text{Eq3})$$

I.4. Justesse d'une méthode

La justesse est mesurée en comparant le résultat obtenu avec la méthode en cours de validation et la valeur vraie de l'échantillon.

I.5. Spécificité

Le manque de spécificité d'une méthode peut être d'origine physique, mais la plupart du temps il est dû à la présence d'analytes indésirables qui vont « répondre » comme l'analyte recherché ou, au contraire, gêner sa réponse. Ces analytes sont divers constituants de la matrice et/ou les réactifs utilisés pour préparer l'échantillon : on peut donc parler d'effets de matrice. Les effets de matrice viennent brouiller le signal et entraînent deux conséquences néfastes :

- soit, une surestimation de la concentration de l'échantillon car la réponse est plus élevée que ce qu'elle devrait être ;
- Soit, une sous-estimation car le signal est partiellement masqué.

1.6. Robustesse

La robustesse d'une méthode d'analyse peut être définie comme une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par de petites variations des conditions opératoires. L'intérêt est de fournir une indication sur la stabilité des mesures dans des conditions normales d'utilisation. Le principe du test de robustesse est donc de créer de légères modifications des valeurs sélectionnées pour le mode opératoire normalisé et de vérifier si elles ont une influence sur le résultat. Ces modifications sont définies en fonction des difficultés classiques de contrôle des paramètres opératoires.

I.7. Fonction d'étalonnage

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

Pour établir une fonction d'étalonnage, il faut plusieurs niveaux de concentration de solutions étalons. Ces niveaux peuvent être établis avec ou sans matrice.

Ils sont communément appelés « standard d'étalonnage ». Dans la mesure où, généralement, les paramètres du modèle sont estimés par la méthode des moindres carrés, il est préférable de prendre un niveau de plus que de coefficients à estimer (**voir tableau I**)

Tableau I : Modèles usuels de fonctions d'étalonnages, calcul du modèle inverse, nombre minimal de niveau nécessaires, de répétitions par niveaux et nombre minimal de séries pour établir ce modèle.

Fonction	Etalonnage direct	Etalonnage inverse	Nombre de coefficients	Nombre minima de niveaux	Nombre de répétitions par niveaux	Nombre minimal de répétition par série
linéarité	$Y = a + bx$	$X = \frac{y - a}{b}$	2	3	2	3
Quadratique	$Y = a + bx + cx^2$	$x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4c(a - y)}}{2c}$	3	4	2	3
Puissance	$Y = a \times x^b$	$x = 10^{\frac{\log(y) - \log(a)}{b}}$	2	3	2	3
Logistique à 4 paramètres	$Y = b + \frac{c}{1 + \frac{x^d}{c}}$	$x = c \left[\frac{a - b}{y - b} - 1 \right]^{\frac{1}{d}}$	4	3	2	3

Généralement, sur le plan statistique, la qualité de la relation entre la variable X et la variable Y est décrite par le calcul du coefficient de corrélation (r) ou le coefficient de détermination (r²).

I.8. Sensibilité

Deux types de sensibilité sont généralement définis : la sensibilité analytique et la sensibilité diagnostique. La différence entre ces deux sensibilités repose là-encore sur l'origine du support utilisé. Pour la sensibilité analytique, les supports sont des supports de référence et pour la sensibilité diagnostique, les supports sont issus du terrain.

Dans le domaine de la microbiologie des aliments, le terme « inclusivité » est utilisé quand le calcul est réalisé sur des souches pures, et le terme « sensibilité » est utilisé lorsqu'il est réalisé sur des supports de type aliments. La sensibilité correspond au pourcentage de résultats positifs trouvés parmi les résultats positifs attendus. Dans tous les cas, la sensibilité vise à évaluer la capacité de la méthode soumise à validation à donner une réponse positive quand la cible est présente. Pour les méthodes qualitatives, la sensibilité (Se) se calcule après avoir établi le tableau de contingence des résultats (Tableau II).

Tableau II: Synthèse des résultats obtenus lors de l'étude de caractérisation des performances.

		Statut de l'échantillon	
		<u>Positif</u>	<u>Négatif</u>
Résultats donné par le test à caractériser	Positif	PA = accords positif = vrais positif	PD = déviation positives = faux positifs
	Négatif	NA= Déviation négative = faux négatifs	NA = accords négatifs = vrais négatifs
Sommes		N+	N-

La sensibilité est le pourcentage (%) de résultats positifs trouvés parmi les positifs attendus et se calcule par la formule (Eq 4) :

$$S_e = \frac{PA}{PA+ND} \quad \text{Eq 4}$$

Tels que :

PA = accords positif

NA= Déviation négative

I.9. Caractéristiques de performance à déterminer selon le type de méthode

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

Tableau III : Caractéristiques de performance à déterminer pour les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives.

Etape de processus de validation	Caractéristiques		Caractéristiques de performances à déterminer en fonction de type de méthode	
			Qualitative	Quantitative
Caractéristiques intra laboratoire	Spécificité		X	X
	Sensibilité		X	X
	Fonction d'étalonnage			X
	Fidélité	répétabilité	X	X
		Fidélité intermédiaire	X	X
	Justesse			X
	Exactitude (justesse + fidélité) ^a			X
	Linéarité			X
	Limite de	Quantification	Sans objet	X
		détection	X	X
Domaine de validité		X	X	
Caractéristiques inter laboratoire	Reproductibilité		X	X
	Répétabilité		X	X
	LOQ		X	Sans objet
	LOD		Sans objet	X
	Spécificité ^b		X	Sans objet
	Sensibilité ^c		X	Sans objet
	D'autres caractéristiques non techniques à définir selon les points critiques		X	X

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

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

b : ou taux de faux positifs dans certains référentiels

c : ou taux de faux négatifs dans certains référentiels

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