

La norme ISO/CEI17025 demande de valider les méthodes lorsque les laboratoires utilisent des méthodes non normalisées ou hors du domaine d'application de la norme. Ce référentiel demande également d'évaluer l'incertitude des résultats fournis.

Les laboratoires d'analyses chimiques ont une longue expérience et une longue tradition de validation de leurs méthodes d'analyse mais éprouvent parfois des difficultés pour évaluer l'incertitude de leurs résultats.

Les performances d'une méthode peuvent s'exprimer à l'aide de caractéristiques telles que : la sélectivité, la spécificité, la justesse, la linéarité, la répétabilité, la reproductibilité, la robustesse, les limites de détection... Ces caractéristiques s'évaluent grâce à des travaux expérimentaux, réalisés soit en interne, soit de manière collective en impliquant plusieurs laboratoires.

## V.1. Place de la validation dans la qualité

### V.1.1. Assurance qualité au laboratoire

Parmi les diverses préoccupations des analystes, la place prise par la validation des méthodes, doit être mise en relation avec le développement de l'assurance qualité dans les laboratoires.

Les principes de l'assurance qualité sont l'objet d'une série de normes publiées par l'International Standardisation Organisation (ISO), comme la série des normes ISO 9000.

Elles insistent sur le fait que la qualité des produits ou des services doit être conçue en vue de satisfaire les **besoins d'un client**.

Les objectifs de la qualité d'un produit ou d'un service sont :

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

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

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

- être effectivement contrôlé.

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

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

- les **Bonnes Pratiques de Laboratoire** (BPL) s'appliquent à l'étude et au développement de molécules chimiques, médicaments, des pesticides et, en général, à l'étude de toute substance nouvelle ;
- le **Guide de Bonne Exécution des Analyses** (GBEA) précise comment doit fonctionner le système d'assurance de la qualité d'un laboratoire d'analyse de biologie médicale ;
- l'**accréditation**, qui suit les principes de la norme ISO 17025 et permet d'assurer la compétence d'un laboratoire qui applique un ensemble de recommandations NF EN ISO/CEI 17025 :2005, (NF X 50-061) ;
- la **certification de service** s'appuie sur les normes ISO 9000 et s'applique à une entreprise dans son ensemble et, éventuellement, au laboratoire qui s'y rattache.

### V.1.2. Validation et contrôle de qualité de méthodes de mesure

La validation se définit comme 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 » ISO/CEI17025.

#### V.1.2.1. Organiser la validation d'une méthode

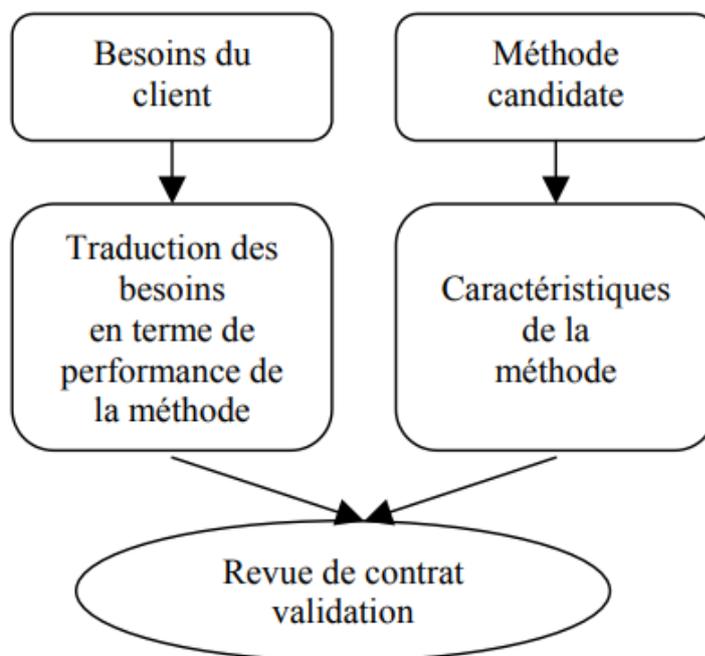
Concrètement, la validation va se solder par la préparation d'un dossier qui contiendra deux types d'information :

- une description écrite des moyens (appareils et réactifs) et du mode opératoire à mettre en œuvre pour appliquer la méthode d'analyse ;
- les résultats numériques d'un ensemble d'expériences et de calculs statistiques qui serviront à établir que ces moyens et ce mode opératoire sont efficaces.

Dix opérations qui débouchent sur la construction d'un profil d'exactitude. On peut déjà en définir des principes généraux :

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

Le laboratoire doit donc traduire les besoins du client en termes de performance pour les comparer ensuite avec les caractéristiques estimées de la méthode candidate (**Figure 1**).



**Figure1** : Relation entre caractérisation et validation d'une méthode analytique

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

Cependant, avant de s'intéresser plus en détail aux différents outils statistiques qui pourront être utilisés pour traiter les données expérimentales, il est utile de replacer la procédure de validation par rapport au cycle de vie d'une méthode d'analyse.

#### V.1.2.2. Cycle de vie d'une méthode d'analyse

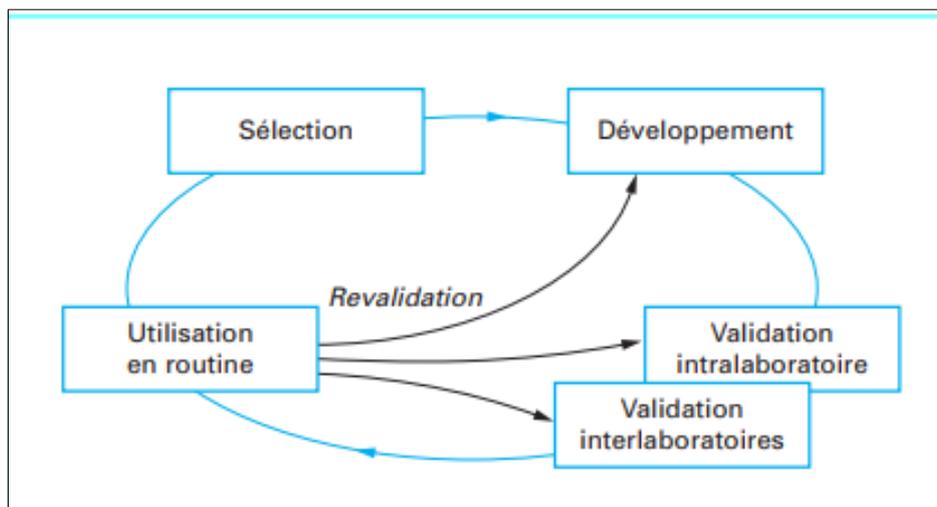
On a trop souvent tendance à décrire les méthodes d'analyse comme des procédures immuables et figées. C'est un peu l'impression que donnent les manuels et autres recueils de normes techniques.

Or, comme tout procédé de production, les méthodes d'analyse naissent, évoluent et meurent. Pour clairement comprendre 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. La figure 2 résume les différentes étapes de ce cycle.

- D'abord on va sélectionner la méthode, c'est-à-dire de choisir parmi toutes les méthodes physico-chimiques connues ou maîtrisées par le laboratoire celle qui doit permettre de déterminer un ou plusieurs analytes représentatifs du problème analytique à traiter.

- Ensuite, il convient de développer la méthode, c'est-à-dire mettre au point le mode opératoire et adapter la méthode aux conditions pratiques où elle va être utilisée.

Lorsque la mise au point est terminée, on dispose de ce que l'on appelle dans le cadre BPL un mode opératoire normalisé ou Standard Operating Procédure (SOP). En particulier, il faut préciser le domaine d'application de la méthode, c'est-à-dire l'ensemble des matrices auxquelles elle s'applique ainsi que la gamme de concentrations utilisables.



**Figure 2** : Cycle de vie d'une méthode d'analyse

On peut proposer cette série d'étapes qui constituera le squelette de cette procédure :

**1.** nommer **un responsable** qui coordonnera l'étude de validation ;

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

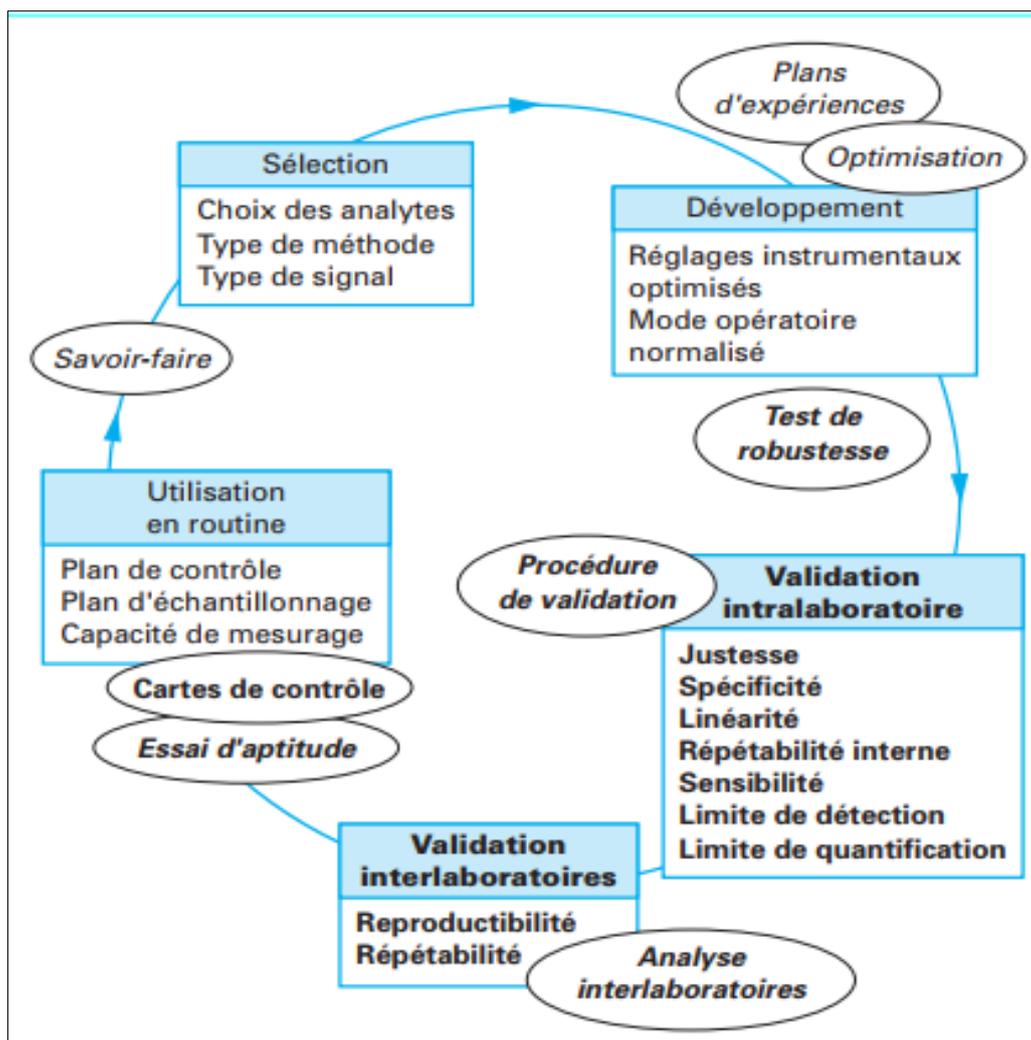
Il est alors possible de définir un certain nombre de types de **dossiers de validation** qui se solderont par des documents présentables à un organisme de contrôle.

Le dossier de validation, une fois constitué, permettra aussi d'établir des valeurs seuils de qualification du matériel de mesure qu'il faudra vérifier, par exemple, avant chaque utilisation.

Ces tests de qualification font l'objet de **fiches de qualification** spécifiques de chaque instrument employé. Une vérification d'aptitude doit aussi avoir lieu si la méthode est transférée sur un autre matériel. Il ne faut donc pas confondre la validation de la méthode avec un test de qualification de l'instrumentation.

#### V.1.2.3. Critères de la validation d'une méthode analytique

La figure 3 précise un ensemble de critères ou de procédures propres à chaque étape du cycle de vie.



**Figure 3** : Critères et procédures de validation liés au cycle de vie d'une méthode d'analyse

### 1. Linéarité

La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité de donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration de la substance analysée dans un échantillon.

### 2. Justesse

La justesse correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention. Elle doit être vérifiée dans le domaine d'utilisation de la méthode d'analyse.

### 3. Fidélité

La fidélité d'une méthode correspond au degré d'accord entre les résultats des mesures obtenues par l'analyse individuelle de plusieurs prélèvements d'un même échantillon homogène, prélevés dans des conditions prescrites.

La fidélité peut s'évaluer à trois niveaux :

Répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité. La fidélité est généralement exprimée par la variance, l'écart-type ou le coefficient de variation d'un ensemble de mesures.

➤ **Répétabilité**

La répétabilité est une expression de la fidélité de l'analyse lorsque celle-ci est reprise dans les mêmes conditions de réalisations, après un court intervalle de temps, et faite dans des conditions qui comprennent la même procédure de mesure, le même opérateur, le même lieu, ainsi que les mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps.

➤ **Fidélité intermédiaire**

La fidélité intermédiaire correspond aux variations survenant dans un même laboratoire : Analyses effectuées pendant des jours différents, par des personnes différentes, au moyen d'appareils différents, etc.

➤ **Reproductibilité**

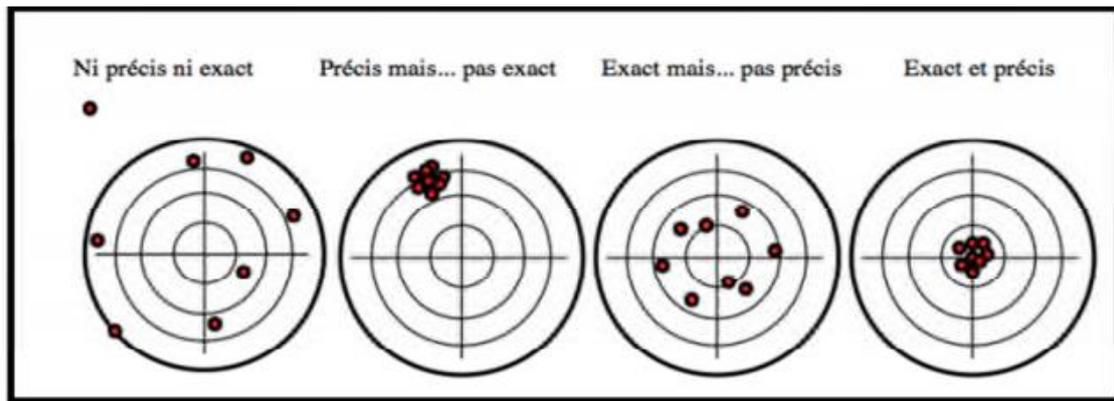
La reproductibilité correspond à la concordance entre laboratoires dans des conditions qui comprennent des lieux, des opérateurs et des systèmes de mesure différents, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires.

#### **4. Limite de quantification**

La limite de quantification est la plus petite concentration de l'analyte pouvant être quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. Elle correspond à la concentration la plus petite du domaine de validité.

#### **5. Exactitude**

L'exactitude est l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'un mesurage et la valeur vraie du mesurande (Figure 4). Cette notion est la combinaison d'une erreur systématique, liée à la justesse de la méthode, et d'une composante aléatoire, liée à la mesure elle-même et qui dépend donc de la fidélité de la méthode



**Figure 4** : Profil d'exactitude comme outil de décision pour quatre méthodes ([media4.obspm.fr](http://media4.obspm.fr)).

#### V.1.2.4. Les type de validation

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

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

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

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

La validation de méthode par un seul laboratoire est adéquate dans plusieurs situations, notamment dans les circonstances suivantes :

- pour s'assurer de la fiabilité de la méthode avant de s'engager dans l'exercice onéreux de l'essai inter-laboratoires formel ;

- pour fournir la preuve de la fiabilité d'une méthode d'analyse lorsque des données d'essai inter laboratoires ne sont pas disponibles ou lorsque l'organisation d'un essai inter-laboratoires formel n'est pas possible ;
- pour s'assurer que des méthodes validées "prêtes à l'emploi" sont correctement utilisées.

## V.2. Validation par étude inter-laboratoire (norme iso 5725)

Nous désignerons par analyses inter laboratoires toute étude expérimentale qui implique la participation de plusieurs laboratoires. Cependant, il faut distinguer plusieurs situations en fonction des objectifs recherchés.

- Les analyses inter laboratoires, au sens de **la norme NF ISO 5725**, doivent réunir au moins **huit laboratoires** qui vont recevoir un ou plusieurs échantillons sur lesquels ils feront de deux à quatre répétitions.

**L'objectif principal est alors de mesurer la répétabilité et la reproductibilité de la méthode.**

Ces études sont généralement lourdes et coûteuses et ne sont entreprises que pour une validation inter laboratoires de la méthode. Elles peuvent être organisées par n'importe quelle structure, par exemple, un laboratoire ou une entreprise qui veut promouvoir une méthode et publier ses caractéristiques dans la littérature.

**La normalisation est un contexte très classique d'organisation d'analyses inter laboratoires puisque les méthodes normalisées doivent être accompagnées de valeurs de reproductibilité.**

Les essais d'aptitude, comme ceux décrits dans le Guide ISO/IEC 43, réunissent de nombreux laboratoires, parfois plusieurs milliers. Les participants n'auront pas à faire de répétition sur le ou les échantillon(s) qu'ils reçoivent car le but est de calculer par consensus une valeur de référence acceptée qui servira à vérifier si un laboratoire est compétent pour exécuter un type de détermination

### V.2.1. Répétabilité et reproductibilité selon la norme NF ISO 5725

Étant donné que la fidélité mesure la dispersion des mesures et que cette dispersion dépend de diverses sources de variation, on a proposé deux situations extrêmes dans lesquelles deux répétitions peuvent être réalisées sur un échantillon commun : à savoir les conditions de répétabilité et les conditions de reproductibilité.

- les conditions de répétabilité sont réalisées lorsque « les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps » ;
- les conditions de reproductibilité sont réalisées lorsque « les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents ».

Comme le propose le document ISO/DTS 21748, à la reproductibilité qui est évaluée collectivement via l'essai inter-laboratoires, on peut ajouter un terme de justesse (noté dans ce document  $\mu^{\wedge}$ ) plus un terme qui comprend toutes les autres contributions à l'incertitude qui n'ont pu être mises en œuvre par l'essai inter-laboratoire.

Le modèle statistique s'écrit (Eq 1) :

$$y = m + \delta + B + \sum_i c_i + e \text{ (Eq 1)}$$

Tels que :

$y$  : résultat de mesure

$m$  : valeur vraie  $\delta$  : justesse de la méthode

$B$  : effet laboratoire

$c_i x_i$  : termes correctifs d'effets non pris en compte lors de l'essai inter-laboratoire

$e$  : erreur résiduelle

En introduisant la variance de reproductibilité

La variance de  $y$  s'écrit alors (Eq 2) :

$$s_{R^2} = u^2(\delta) + u^2(B) + u^2(e) \text{ (Eq 2)}$$

$$u^2(y) = u^2(\hat{u}) + s_{R^2} + \sum c_i^2 u^2(x_i)$$

L'utilisation de résultats provenant d'essais d'aptitude mérite que l'on se préoccupe de la traçabilité de la valeur de référence. En effet dans de très nombreux essais d'aptitude, la valeur de référence par rapport à laquelle sont évalués les écarts des laboratoires est bien souvent la

moyenne (arithmétique ou pondérée) des réponses des laboratoires et la traçabilité de cette valeur aux unités du Système International (SI) n'est pas toujours prouvée.