

Liste des Publications

1. ***Validation and Measurement Uncertainty Assessment of a Microbiological Method using Generalized Pivotal Quantity Procedure and Monte-Carlo Simulation.***

S. Alaoui Sosse, T. Saffaj, B. Ihssane.

Journal of AOAC International Vol. 101, no. , 2018 (in press).

2. ***An Innovative Strategy Based on Uncertainty Profile for the Validation of Microbiological Methods for Counting Enterobacteriaceae in Foods.***

F. Jhilal, T. Saffaj, B. Ihssane, **S. Alaoui Sosse**, H. Bouchafra, M. Sfaira, Y. Benchakroun, H. Haidara, O.A. Hmedane, E. M. El hadrami.

International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Vol.8, 2016.

3. ***Application of a New Strategy of Validation Based on “ β,γ -Content Tolerance Interval” for Checking the Chiral Chromatography Method for Quantification of the Chiral Impurity of Levofloxacin.***

Houda Bouchafra, Miloud El karbane, Mohamed Azougagh, Fayssal Jhilal, **Saad Alaoui Sosse**, EL Mestafa El Hadrami, Taoufiq Saffaj and Bouchaïb Ihssane.

Journal of the Brizilian Chemical Society, vol. 27, N°3, 2016.

4. ***Large-Scale Retrospective Evaluation of Regulated Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Bioanalysis Projects Using Different Total Error Approaches.***

Aimin Tan, Taoufiq Saffaj, Adrien Musuku, Kayode Awaiye, Bouchaib Ihssane, Fayssal Jhilal, **Saad Alaoui Sosse**, Fethi Trabelsi.

Journal of chromatography B, 983-984 (2015), 68-754.

5. ***Monitoring and Performance Control of RP-HPLC Method for Simultaneous Quantification of Water-Soluble Vitamins during its Life Cycle.***

H. Bouchafra, M. Elkarbane, B. Ihssane, M. Azougagh, F. Jhilal, **S. A. Sosse**, E. El Hadrami and T. Saffaj.

Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2014, 6(6):2610-2623.

6. ***An Overall Uncertainty Approach for the Validation of Analytical Separation Methods.***

T. Saffaj, B. Ihssane, F. Jhilal, H. Bouchafra, S. Laslami and **S. Alaoui Sosse**.

Analyst, 2013, 138, 4677.

Liste des Communications Orales

1. *A New Overall Uncertainty Approach for Validation: Application to an Alternative Microbiological Method.*

S. Alaoui Sossé, T. Saffaj, B. Ihssane, F. Jhilal, H. Bouchafra, Y. H. Benchekroun, O. A. Hamedane.

Third International Conference on New Trends in Chemometrics and Applications (NTCA-2016)
Antalya, Turkey.

2. *The Credibility of the Uncertainty Profile for the Validation of ICP-AES Procedure*

O. Alami Hamedane, T. Saffaj, B. Ihsassne, **S. Alaoui Sossé**, Y. Hamed Benchekroun, F. Jhilal, R. El hajji,

Third International Conference on New Trends in Chemometrics and Applications (NTCA-2016)
Antalya, Turkey.

3. *Ensuring the Quality of Drinking Water Using a New Overall Uncertainty Approach for Analytical Method Validation.*

S. Alaoui Sossé, T. Saffaj, B. Ihssane, F. Jhilal, H. Bouchafra, Y. H. Benchekroun, O. A. Hamedane.

Colloque International ERVD'4 «Eau, Recyclage et Valorisation des Déchets », à l'Université Al Akhawayn, les 26 et 27 octobre 2016, à Ifrane.

4. *Uncertainty Profile; a Global Strategy for Validation and Estimation of Uncertainty: Application to a High-Performance Thin-Layer Chromatographic Method.*

Y. H. Benchekroun, T. Saffaj, B. Ihssane, F. Jhilal, **S. Alaoui Sossé**, H. Bouchafra.

6th International Conference and Exhibition on Analytical & Bioanalytical Techniques, September 01-03 2015, Valencia, Spain.

5. *Transfer of Analytical Methods Using Uncertainty as Decision Criterion.*

F. Jhilal, T. Saffaj, B. Ihssane, **S. Alaoui Sossé**, H. Bouchafra, M. Sfaira, Y. Benchekroun, Chimiométrie XVI, Genève, le 21 Janvier 2015.

6. *Using Uncertainty Profile Approach for Application to Analytical Method Validation*

S. Alaoui Sossé, T. Saffaj, B. Ihssane, F. Jhilal, H. Bouchafra, Y. H. Benchekroun.

1^{ère} Rencontre Internationale de Chimie moléculaire, Chimiométrie et Applications. Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal les 29 et 30 Mai 2014.

7. Amélioration du Contrôle de Qualité des Médicaments à Base d'Amodiaquine et d'Artésunate en Utilisant des Outils Chimométriques.

H. Bouchafra, M. El Karbane, B. Ihssane, M. Azougar, F. Jhilal, S.A. Sosse, E. El Hadrami, T. Saffaj.

Colloque internationale : Santé Environnement et Entreprise 21 et 22 Novembre 2014 FST-Mohammedia.

8. Contrôle de L'effet de Phase du Cycle de Vie sur la Performance d'une Méthode Chromatographique Liquide pour la Quantification de Cinq Vitamines Hydrosolubles dans Une Forme Pharmaceutique.

H. Bouchafra, B. Ihssane, M. El karbane, M. Azougagh, F. Jhilal, S. Laslami, S. Alaoui Sosse, E. EL Hadrami and T. Saffaj.

Congrès international de Chimométrie 2013 du 25 au 26 septembre 2013 – Brest- France.

9. Détermination des Limites de Détection et de Quantification par le Profil d'Incertitude

F.Jhilal, T.Saffaj, B.Ihssane, S.Alaoui Sosse, H.Bouchafra, M.Sfaira, E.M.El Hadrami
Deuxième symposium sur la chimie analytique pour le développement durable-ACSD
2013 et la 4^{ème} Fédération des sociétés africaines de chimie (FASC) -7-9 mai 2013 – Marrakech.

Liste des Communications Affichées

1. *Application d'une Approche Globale pour la Validation et l'Estimation de l'Incertitude de Mesure d'une Méthode Microbiologique.*

S. Alaoui Sossé, T. Saffaj, B. Ihssane, F. Jhilal, Y. H. Bencheckroun, O. A. Hamedane, R. Elhajji.
1^{ères} Journées Pratiques Francophones des Sciences Analytiques (JPFSA), le jeudi 27 et le vendredi 28 avril 2017 à Marrakech.

2. *Ensuring the Quality of Drinking Water Using a New Overall Uncertainty Approach for Analytical Method Validation.*

S. Alaoui Sossé, T. Saffaj, B. Ihssane, F. Jhilal, H. Bouchaфра, Y. H. Bencheckroun, O. A. Hamedane.

Colloque International ERVD'4 «Eau, Recyclage et Valorisation des Déchets », à l'Université Al Akhawayn, les 26 et 27 octobre 2016, à Ifrane.

4. *Application d'une Approche Globale de L'incertitude pour la Validation d'une Méthode Bioanalytique.*

S. Alaoui Sossé, T. Saffaj, B. Ihssane, F. Jhilal, H. Bouchaфра, Y. H. Bencheckroun, O. A. Hamedane.

Congrès international sur le dosage des médicaments : validation analytique et application clinique, à la faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès, les 11, 12 et 13 Juin 2015.

5. *L'application d'une Nouvelle Stratégie de Vlidation Fondée sur β,γ -Content tolérance intervalle pour la Détermination Quantitative de la Lovastatine, la Simvastatine, la Pravastatine, L'atorvastatine et la Rosuvastatine dans des Spécialités Pharmaceutiques.*

H. Bouchaфра, M. El Karbane, B.Ihssane, M. Azougar, F. Jhilal, **S.A. Sosse**, L.L. Zaari, E. El Hadrami, T.Saffaj.

Rencontres Francophones sur la Qualité et la Mesure Édition 2015 du 28 au 30 avril 2015, Angers France.

6. *Application of Chemometric Tools for Development and Validation of Chromatographic Method for Quantification of the Levofloxacin and its (R)-Enantiomer in Drug Formulations.*

H. Bouchaфра, M. El karbane, B. Ihssane, M. Azougagh, F. Jhilal, **S. A. Sosse**, EL. Elhadrami and T. Saffaj.

Congrès international de Chimiométrie 2015 du 19 au 21 Janvier 2015, Université de Genève, Suisse.

7. *Using Uncertainty Profile as New Approach in Analytical Method Transfer.*

F. Jhilal, T.Saffaj, B.Ihssane, S. Alaoui Sosse, H. Bouchafra, M. Sfaira, Y. Benchakroun.

1^{ère} Rencontre Internationale de Chimie Moléculaire, Chimiométrie et Applications (RIMCA 2014), 29 & 30 May, Bni Mellal.

8. *La Chimiométrie et ses Applications dans le Domaine Pharmaceutique : Dosage des Vitamines Hydrosoluble par HPLC.*

H. Bouchafra, M. El Karbane, B.Ihssane, M. Azougar, F. Jhilal, S.A.Sosse, E. El Hadrami, T.Saffaj.

1^{er} Congrès International : Substances Naturelles et Modélisation. 15-16 décembre 2014 Faculté Polydisciplinaire de Taza.

9. *Validation d'une Procédure Analytique par le Profil d'Incertitude.*

S. Alaoui Sossé, T. Saffaj, B. Ihssane, F. Jhilal, H. Bouchafra, El. M. El Hadrami.

5^{ème} Rencontre Internationale sur la Chimiométrie et la Qualité 25-27 avril 2013, FST-FES.

Je souhaite dédier ce modeste travail à tous les membres de ma famille. Je voudrais tout particulièrement exprimer ma reconnaissance à mes parents, Monsieur Tayeb ALAOUI SOSSE et Madame Fatiha BOUAYAD, qui ont été pour moi une source d'inspiration et n'ont cessé de m'encourager. Je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance à ma chère épouse Khaoula CHRAIBI. Sa patience, son réconfort et son affectueux soutien tout au long de ce travail m'ont été d'une très grande aide. Que ma sœur Asmae et mes frères trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Saad ALAOUI SOSSE

Ce projet de recherche n'aurait pas pu aboutir sans la collaboration et l'aide précieuse et le soutien infaillible de nombreuses personnes. Je désire leur témoigner ma gratitude via ces quelques lignes.

*En premier lieu, je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Taoufiq SAFFAJ**, le directeur de cette thèse, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail de doctorat, mais également, pour sa disponibilité, son soutien et ses conseils qui ont été nombreux et importants. Pr. SAFFAJ a beaucoup œuvré pour la mise en valeur de mon travail, et j'ai extrêmement apprécié ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de la préparation de cette thèse. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse toute ma reconnaissance.*

*Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur **El Mestafa EL HADRAMI**, de me faire l'honneur de présider le jury. Je le remercie également pour m'avoir donné l'opportunité de bénéficier de la formation spécialisée du master chimométrie et analyse chimique, là où j'ai pu acquérir et approfondir mes connaissances dans ce domaine. Par ailleurs, je ne peux m'empêcher de le remercier pour ses conseils, son soutien et sa disponibilité.*

*Mes sincères remerciements s'adressent aux rapporteurs : Monsieur **Mohamed EL ACHOURI**, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure de Rabat, Monsieur **Abdelaziz BOUKLOUZE**, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Monsieur **Mustafa TALEB**, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès, pour le temps qu'ils ont accordé à la lecture de cette thèse et de m'avoir fait l'honneur de rapporter ce travail.*

*Je tiens à remercier également Monsieur **Bouchaib IHSSANE**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, pour son aide et sa disponibilité tout au long de ce doctorat et pour avoir accepté de juger mon travail en tant qu'examinateur. Merci pour votre enseignement et vos conseils précieux.*

*Je suis extrêmement reconnaissant à Monsieur **Mouhcine SFAIRA**, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès et aussi à Monsieur **Hicham ZAITAN**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, d'avoir accepté d'examiner mon travail.*

*Je remercie très vivement toute l'équipe de recherche en chimiométrie et en particulier mon collègue le Docteur **Fayssal JHILAL** pour son soutien permanent et ses conseils judicieux, ainsi que mes collègues les doctorants : **Yassine HAMEDA BENCHEKROUN**, **Omar ALAMI HAMEDANE** et **Ridouane EL HAJJI**, pour leurs encouragements incessants.*

Enfin, j'aimerais remercier mes amis, mes proches ainsi que les personnes qui, de près ou de loin, m'ont soutenu par leurs paroles et leurs encouragements.

Ce travail de thèse traitant la problématique relative à la performance des méthodes d'analyse, dévoile des outils chimiométriques capables de garantir et d'assurer la fiabilité des mesures. Nous avons porté une attention toute particulière à deux concepts habiles à statuer sur la qualité et la qualimétrie des procédures analytiques à savoir : la validation analytique et l'incertitude de mesure.

Au premier abord, nous sommes orientés vers le développement d'une nouvelle stratégie statistique à caractère globale basée sur le concept d'incertitude à travers une méthodologie statistique de type « β, γ -content tolérance intervalle ». Nous voulons, dès lors, faire d'une pierre deux coups : la validation analytique et l'estimation de l'incertitude, sans avoir recours à des expériences supplémentaires. Cette stratégie a été convertie en un dispositif décisionnel graphique baptisé profil d'incertitude. Trois voies de calcul ont été investies pour prédire l'intervalle de tolérance et approcher l'incertitude de mesure : (i) l'approximation de Satterthwaite, (ii) la simulation de Monte Carlo et (iii) la procédure MLS (Modified Large Simple). Aussi étrange que cela puisse paraître, les trois méthodes de calcul aboutissent à des estimés d'incertitude comparables.

Par ailleurs, nous avons démontré l'adaptation et l'adéquation du profil d'incertitude à apprécier la performance des méthodes Bioanalytiques. Il s'agissait d'une étude détaillée des données de validation d'une méthode de dosage de la vitamine B3 dans le lait par HPLC par les algorithmes de notre profil de décision. Rétrospectivement, nous avons conduit une analyse comparative de notre démarche avec celle adoptée par la SFSTP via les résultats collectés en phase de validation de trois méthodes de séparation soit : HS-GC-MS, électrophorèse capillaire en milieu non aqueux et CE-ESI/MS.

D'autre part, nous avons attesté l'universalité du profil d'incertitude en l'étendant à la validation des méthodes Microbiologiques. A cet effet, nous avons incontestablement confirmé que cet outil peut être efficacement appliqué pour décider conformément aux instructions de la norme ISO 16140 dans le cadre d'une étude interlaboratoire, nonobstant le problème de manque de normalité des données générées lors des dénombrements bactériens.

Mots-clés : Validation analytique, Profil d'incertitude, β, γ -Content tolérance intervalle, Incertitude de mesure, Méthode Microbiologique, Méthode Bioanalytique

This thesis dealing with the issue concerning the performance of analytical methods reveals chemometric tools capable of guaranteeing and ensuring the reliability of measurements. We have paid particular attention to two concepts skillful to rule on the quality and qualimetry of analytical procedures, namely: analytical validation and measurement uncertainty.

At first glance, we are oriented towards the development of a new global statistical strategy based on the concept of uncertainty through a statistical methodology called " β, γ -content tolerance interval". We therefore want to kill two birds with one stone: analytical validation and uncertainty estimation, without resorting to additional experiments. This strategy has been converted into a graphical decision-making tool named the uncertainty profile. Three ways of calculation were used to predict the tolerance interval and assess the measurement uncertainty: (i) the Satterthwaite approximation, (ii) the Monte Carlo simulation and (iii) the MLS procedure (Modified Large Simple). Strange as it may seem, the three methods of calculation result in comparable uncertainty estimates.

In addition, we have demonstrated the adaptation and the adequacy of the uncertainty profile to assess the performance of Bioanalytical methods. It is a detailed study of the validation data of a method for the determination of vitamin B3 in milk by HPLC using the algorithms of our decision profile. Retrospectively, we conducted a comparative analysis of our approach versus that adopted by the SFSTP via the results collected during the validation phase of three separation methods: HS-GC-MS, non-aqueous capillary electrophoresis (NACE) and CE-ESI / MS.

On the other hand, we have confirmed the universality of the uncertainty profile by extending it to the validation of Microbiological methods. To this end, we have undeniably proved that this tool can be effectively applied to decide pursuant to ISO 16140 guidelines in the framework of an interlaboratory study, notwithstanding the problem of non-normality of the generated data during bacterial counts.

Keywords: Analytical Validation, Uncertainty Profile, β, γ -Content Tolerance Interval, Measurement Uncertainty, Microbiological Method, Bioanalytical Method.

λ	Limite d'acceptabilité	$\hat{\sigma}_m^2$	Variance totale
β	Proportion des résultats conformes	$R\%$	Recouvrement
γ	Niveau de confiance	$\hat{y}_i$	Valeur expliqué ou estimée par le modèle
σ_e^2	Variance intra-série	LQ	Limite de quantification
σ_b^2	Variance inter-série	LD	Limite de détection
MS_b	Carré moyen inter-série	X_A et X_B	Abscisses des deux niveaux A et B
MS_e	Carré moyen intra-série	X_{At} et X_{Bt}	Ordonnées à l'origine de la limite supérieure (ou inférieure) de l'intervalle d'incertitude
j	Indice de répétition	X_{Aa} et X_{Ba}	Ordonnées à l'origine de la limite supérieure (ou inférieure) d'acceptabilité
i	Indice de série	X_{LQ}	Abscisse du point d'intersection, avec $LQ = X_{LQ}$
m	Indice de niveaux	X_A et X_B	Abscisses des deux niveaux A et B
n	Nombre de répétitions	β, γ -CTI	β -content, γ -confiance tolérance intervalle
a	Nombre de séries	β -ETI	β -expectation tolérance intervalle
p	Nombre de niveaux	CV	Coefficient de variation
μ_T	Valeur vraie d'une mesure	BPL	Bonne pratique de laboratoire
w	Facteur de pondération	FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
k	Facteur de couverture	IC	Intervalle de confiance
p -value	Probabilité de significativité	ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
$\sim$	Suit une loi de probabilité	AMC	<i>Analytical Methods Committee</i>
$\pi(\theta)$	Loi a priori pour θ	SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>
$P(\theta x)$	Distribution a posteriori de θ	MLS	<i>Modified Large Simple</i>
$IG(d, s)$	Densité gamma inverse de paramètres d et s	GPQ	<i>Generlized pivotal quantity</i>
R^2	Coefficient de détermination	$SFSTP$	Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques
S_R	Reproductibilité	SE	Standards d'étalonnage (calibration)
$\bar{Y}$	Moyenne arithmétique	SV	Standards de validation
M	Nombre de simulations	GUM	<i>Guide to the expression of Uncertainty in Measurement</i>
Y_i (yi)	Réponse analytique	FI	Fidélité intermédiaire
v, f, ddl	Degré de liberté	MRC	Matériau de référence certifié
D_1	Marge d'erreur statistique	VIM	Vocabulaire international de métrologie
Z_i	Mesure	$HPLC$	Chromatographie en phase liquide à haute performance
$u(Z_i)$	Incetitude de mesure	USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
SS_b	Somme des carrés des écarts inter-série	DOE	<i>Design of Experiments</i>
SS_e	Somme des carrés des écarts intra-série	$C_{alternative}$	Concentration de la méthode alternative
H_0	Hypothèse nulle	$C_{référence}$	Concentration de la méthode de référence
H_1	Hypothèse alternative	PON	Procédure opérationnelle normalisée
Q_t	Quantile de distribution Student	CE -ESI/MS	Electrophorèse capillaire-ionisation par électronébuliseur-spectrométrie de masse
χ_{v1}^2	Loi de khi-carré	HS -GS-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse après introduction par espace de tête
$u(\delta)$	Incetitude associée au biais de la méthode	PP -HD	Précipitation de protéines, PP- Hydrodynamique, HD
$\sum c_i^2 u^2(x_i)$	Somme de tous les effets de déviations	$NACE$	Electrophorèse capillaire en milieu non aqueux
$\hat{\sigma}_r^2$	Ecart type de répétabilité	LLE -EK	Extraction liquide-liquide, LLE- Electrocinétique, injections d'EK
$\hat{\sigma}_{FI}^2$	Ecart type de fidélité intermédiaire	CFU	<i>Colony-Forming Unit</i>

Liste des Tableaux

Chapitre I : Validation des Méthodes Analytiques

Tableau II.1 :	<i>Tests statistiques utilisés pour la validation analytique.....</i>	18
-----------------------	---	-----------

Chapitre II : Incertitude de Mesure et Profil d'Incertitude

Tableau II.1 :	<i>Exemples de fonctions de réponse.....</i>	49
Tableau II.2 :	<i>Exemples de prédictions inverses des concentrations introduites selon les fonctions de réponses adoptées.....</i>	50

Chapitre III : Validation des Méthodes Bioanalytiques par Approche du Profil d'Incertitude

Tableau III.1 :	<i>Les données d'étalonnage et de validation d'une méthode de détermination du nicotinamide dans le lait par HPLC avec détection fluorométrique.....</i>	59
Tableau III.2 :	<i>Les données d'étalonnage et de validation d'une méthode de détermination de l'acide nicotinique dans le lait par HPLC avec détection fluorométrique</i>	59
Tableau III.3 :	<i>Paramètres de régression relatifs aux différents modèles pour le nicotinamide.....</i>	62
Tableau III.4 :	<i>Paramètres de régression relatifs aux différents modèles pour l'acide nicotinique.....</i>	63
Tableau III.5 :	<i>Paramètres de la justesse pour le nicotinamide.....</i>	65
Tableau III.6 :	<i>Paramètres de la justesse pour l'acide nicotinique.....</i>	66
Tableau III.7 :	<i>CV de fidélité intermédiaire et intervalles de tolérance pour les deux formes de la vitamine B3.....</i>	67
Tableau III.8 :	<i>Résultats de validation de la méthode HPLC pour le dosage du nicotinamide ($\beta = 66.7\%$ et $\gamma = 90\%$).....</i>	71
Tableau III.9 :	<i>Résultats de validation de la méthode HPLC pour le dosage du nicotinamide ($\beta = 80\%$ et $\gamma = 90\%$).....</i>	74
Tableau III.10 :	<i>Résultats de validation de la méthode HPLC pour le dosage du nicotinamide ($\beta = 90\%$ et $\gamma = 90\%$).....</i>	77
Tableau III.11 :	<i>Résultats de validation de la méthode HPLC pour le dosage de l'acide nicotinique ($\beta = 66.7\%$ et $\gamma = 90\%$)</i>	80
Tableau III.12 :	<i>Résultats de validation de la méthode HPLC pour le dosage de l'acide nicotinique après correction ($\beta = 66.7\%$ et $\gamma = 90\%$).....</i>	83
Tableau III.13 :	<i>Résultats de validation de la méthode HPLC pour le dosage de l'acide nicotinique après correction ($\beta = 80\%$ et $\gamma = 90\%$).....</i>	86
Tableau III.14 :	<i>Estimation de la LQ en utilisant les résultats de la validation du nicotinamide ($\beta = 66.7\%$ et $\gamma = 90\%$ et λ de $\pm 20\%$).....</i>	88
Tableau III.15 :	<i>Estimation de la LQ pour le nicotinamide en utilisant 13 modèles ($\beta = 66.7\%$, 80% et 90%).....</i>	89
Tableau III.16 :	<i>Paramètres de validation de la Méthode HS-GC-MS pour la détermination du monoxyde de carbone dans le sang humain.....</i>	93
Tableau III.17 :	<i>Résultats de validation de la Méthode HS-GC-MS pour la détermination du CO dans le sang humain par le profil d'exactitude ($\beta=90\%$) et le profil d'incertitude ($\beta=66.7\%$ et $\gamma=90\%$). (Limite d'acceptabilité $\lambda= 30\%$).....</i>	93
Tableau III.18 :	<i>Résultats de validation de la Méthode HS-GC-MS pour la détermination du CO dans le sang humain par le profil d'incertitude ($\beta=80\%$, 90% et $\gamma=90\%$). (Limite d'acceptabilité $\lambda= 30\%$).....</i>	94

Tableau III.19 :	<i>Paramètres de validation de la méthode d'électrophorèse capillaire pour la détermination de la pureté énantiomérique du S-timolol.....</i>	95
Tableau III.20 :	<i>Résultats de validation de la méthode d'électrophorèse capillaire par le profil d'exactitude ($\beta=90\%$) et le profil d'incertitude ($\beta=66.7\%$ et $\gamma=90\%$). (Limite d'acceptabilité $\lambda = \pm 10\%$).....</i>	96
Tableau III.21 :	<i>Résultats de validation de la méthode d'électrophorèse capillaire par profil d'incertitude ($\beta=80\%$, 90% et $\gamma=90\%$). (Limite d'acceptabilité $\lambda = \pm 10\%$).....</i>	97
Tableau III.22 :	<i>Paramètres de validation de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et de S-MTD dans le plasma traité par la procédure PP-HD.....</i>	98
Tableau III.23 :	<i>Paramètres de validation de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et de S-MTD dans le plasma traité par la procédure LLE-EK.....</i>	98
Tableau III.24 :	<i>Résultats de validation par profil d'exactitude et profil d'incertitude de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et S-MTD dans le plasma traité par la procédure PP-HD.....</i>	99
Tableau III.25 :	<i>Résultats de validation par le profil d'incertitude de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et S-MTD dans le plasma traité par la procédure PP-HD.....</i>	101
Tableau III.26 :	<i>Résultats de validation par le profil d'exactitude et le profil d'incertitude de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et S-MTD dans le plasma traité par la procédure LLE-EK.....</i>	102
Tableau III.27 :	<i>Résultats de validation par le profil d'incertitude de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et S-MTD dans le plasma traité par la procédure LLE-EK.....</i>	104
Tableau III.28 :	<i>Tableau récapitulatif montrant l'applicabilité du profil d'incertitude pour valider différentes méthodes de séparation avec différentes matrices et différents modèles de régression.....</i>	105
Tableau III.29 :	<i>Comparaison de l'incertitude de mesure obtenue lors de la validation de la méthode (β, γ-content tolérance intervalle) avec celle obtenue lors de l'utilisation en routine de la méthode chromatographique pour la détermination du cidofovir.....</i>	107

Chapitre IV : Validation des Méthodes Microbiologiques par Approche du Profil d'Incertitude

Tableau IV.1 :	<i>Paramètres de validation de la méthode alternative.....</i>	112
Tableau IV.2 :	<i>Résultats de validation de la méthode alternative en utilisant le profil d'incertitude. (Limite d'acceptabilité λ est de $\pm 0.3 \log \text{CFU}/100 \text{ mL}$).....</i>	113
Tableau IV.3 :	<i>Résultats de validation de la méthode alternative en utilisant le profil d'incertitude après correction. (Limite d'acceptabilité λ est de $\pm 0.3 \log \text{CFU}/100 \text{ mL}$).....</i>	117
Tableau IV.4 :	<i>Estimation de la LQ en utilisant les résultats de validation de la méthode alternative après correction ($\beta = 66.7\%$ et $\gamma = 95\%$ et λ de $\pm 0.3 \log \text{CFU}/100 \text{ mL}$).....</i>	119
Tableau IV.5 :	<i>Résultats statistiques de la méthode Petrifilm EB en Log (CFU/g).....</i>	121
Tableau IV.6 :	<i>Résultats de validation de la méthode Petrifilm EB en utilisant le profil d'incertitude. (Limite d'acceptabilité λ est de $\pm 0.3 \log \text{CFU/g}$).....</i>	122

Liste des Figures

Chapitre I : Validation des Méthodes Analytiques

Figure I.1 :	<i>Le cycle de vie d'une méthode analytique.....</i>	9
Figure I.2 :	<i>Application de l'approche par différence pour statuer sur la validité de 5 méthodes par rapport au biais relatif.....</i>	20
Figure I.3 :	<i>Application de l'approche par différence comme règle de décision pour statuer sur la validité de 5 méthodes. (La limite d'acceptabilité est fixée à $\pm 5\%$).....</i>	21
Figure I.4 :	<i>Illustration des deux cas de la validation ; μ_T est la valeur vraie ; $\bar{X}$ est la moyenne des résultats ; le cercle rouge est la limite d'acceptabilité.....</i>	22

Chapitre II : Incertitude de Mesure et Profil d'Incertitude

Figure II.1 :	<i>Comparaison d'un résultat (point noir) avec et sans son incertitude de mesure (barres verticales) à des limites d'acceptabilité ($\pm \lambda$).....</i>	35
Figure II.2 :	<i>Composition de l'erreur d'un résultat analytique liée à l'incertitude de mesure [67].....</i>	39
Figure II.3 :	<i>Exemple de profil d'incertitude.....</i>	54

Chapitre III : Validation des Méthodes Bioanalytiques par Approche du Profil d'Incertitude

Figure III.1 :	<i>Droites d'étalonnage observées sur trois jours pour le nicotinamide.....</i>	60
Figure III.2 :	<i>Droites d'étalonnage observées sur trois jours pour l'acide nicotinique.....</i>	61
Figure III.3 :	<i>Profils d'incertitude du nicotinamide ($\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : linéaire simple, B : linéaire pondéré $1/X$, C : Quadratique, D : Racine carré, E : Logarithme, F : 0-max).....</i>	72
Figure III.4 :	<i>Profils d'incertitude du nicotinamide ($\beta = 80\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : linéaire simple, B : linéaire pondéré $1/X$, C : Quadratique, D : Racine carré, E : Logarithme, F : 0-max).....</i>	75
Figure III.5 :	<i>Profils d'incertitude du nicotinamide ($\beta = 90\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : linéaire simple, B : linéaire pondéré $1/X$, C : Quadratique, D : Racine carré, E : Logarithme, F : 0-max).....</i>	78
Figure III.6 :	<i>Profils d'incertitude de l'acide nicotinique ($\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : linéaire simple, B : linéaire pondéré $1/X$, C : Quadratique, D : Racine carré, E : Logarithme, F : 0-max).....</i>	81
Figure III.7 :	<i>Linéarité entre les concentrations calculées et les concentrations introduites.....</i>	82
Figure III.8 :	<i>Profils d'incertitude de l'acide nicotinique après correction ($\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : linéaire simple, B : linéaire pondéré $1/X$, C : Quadratique, D : Racine carré, E : Logarithme, F : 0-max).....</i>	84
Figure III.9 :	<i>Profils d'incertitude de l'acide nicotinique après correction ($\beta = 80\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : linéaire simple, B : linéaire pondéré $1/X$, C : Quadratique, D : Racine carré, E : Logarithme, F : 0-max).....</i>	87
Figure III.10 :	<i>(A) : Profil d'exactitude ($\beta=90\%$) et (B) : Profil d'incertitude ($\beta=66,7\%$ et $\gamma=90\%$) de la méthode HS-GC-MS pour la détermination du CO dans le sang humain. (Limite d'acceptabilité $\lambda = 30\%$).....</i>	93
Figure III.11 :	<i>Profils d'incertitude de la méthode HS-GC-MS pour la détermination CO dans le sang humain. A : $\beta = 80\%$ et $\gamma = 90\%$ et B : $\beta = 90\%$ et $\gamma = 90\%$. (Limite d'acceptabilité $\lambda = 30\%$).....</i>	94

Figure III.12 :	(A) : Profil d'exactitude ($\beta=90\%$) et (B) : Profil d'incertitude ($\beta=66.7\%$ et $\gamma=90\%$) de la méthode d'électrophorèse capillaire pour la détermination de la pureté énantiomérique du S-timolol. (Limite d'acceptabilité $\lambda = \pm 10\%$).....	96
Figure III.13 :	Profils d'incertitude de la méthode d'électrophorèse capillaire pour la détermination de la pureté énantiomérique du S-timolol. A : $\beta = 80\%$ et $\gamma = 90\%$ et B : $\beta = 90\%$ et $\gamma = 90\%$. (Limite d'acceptabilité $\lambda = \pm 10\%$).....	97
Figure III.14 :	Profils d'exactitude (A : S-MDMA et C : S-MTD) et profils d'incertitude (B : S-MDMA et D : S-MTD) de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et S-MTD dans le plasma traité par la procédure PP-HD. Les limites d'acceptabilité sont fixées à 30%.....	100
Figure III.15 :	Profils d'incertitude de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et S-MTD dans le plasma traité par la procédure PP-HD. A : S-MDMA avec $\beta = 80\%$, B : S-MDMA avec $\beta = 90\%$, C : S-MTD avec $\beta = 80\%$ D : S-MTD avec $\beta = 90\%$. Les limites d'acceptabilité sont fixées à 30%.....	101
Figure III.16 :	Profils d'exactitude (A : S-MDMA et C : S-MTD) et profil d'incertitude (B : S-MDMA et D : S-MTD) de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et S-MTD dans le plasma traité par la procédure LLE-EK. Les limites d'acceptabilité sont fixées à 30%.....	103
Figure III.17 :	Profils d'incertitude de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et S-MTD dans le plasma traité par la procédure LLE-EK. A : S-MDMA avec $\beta = 80\%$ et $\gamma = 90\%$, B : S-MDMA avec $\beta = 90\%$ et $\gamma = 90\%$, C : S-MTD avec $\beta = 80\%$ et $\gamma = 90\%$ et D : S-MTD avec $\beta = 90\%$ et $\gamma = 90\%$. Les limites d'acceptabilité sont fixées à 30%.....	104
Figure III.18 :	Tracé des moindres carrés moyens d'incertitude en fonction des études de validation (β, γ -content tolérance intervalle), essai de routine 1 et essai de routine 2.....	107

Chapitre IV : Validation des Méthodes Microbiologiques par Approche du Profil d'Incertitude

Figure IV.1 :	Profils d'incertitude de la méthode alternative (A : $\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$, B : $\beta = 66.7\%$, $\gamma = 95\%$, C : $\beta = 80\%$, $\gamma = 90\%$ et D : $\beta = 80\%$, $\gamma = 95\%$). (λ de $\pm 0.3 \log \text{CFU}/100 \text{ mL}$).....	114
Figure IV.2 :	Vérification de la linéarité (Bas, moyen et haut sont les trois niveaux de contamination).....	116
Figure IV.3 :	Profils d'incertitude de la méthode alternative après correction (A : $\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$, B : $\beta = 66.7\%$, $\gamma = 95\%$, C : $\beta = 80\%$, $\gamma = 90\%$ et D : $\beta = 80\%$, $\gamma = 95\%$). (λ de $\pm 0.3 \log \text{CFU}/100 \text{ mL}$).....	118
Figure IV.4 :	Profils d'incertitude de la méthode Petrifilm EB (A : $\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$, B : $\beta = 66.7\%$, $\gamma = 95\%$, C : $\beta = 80\%$, $\gamma = 90\%$ et D : $\beta = 80\%$, $\gamma = 95\%$). (λ de $\pm 0.3 \log \text{CFU/g}$).....	123

Annexe : Profils d'incertitude du nicotinamide et l'acide nicotinique

Figure V.1 :	Profils d'incertitude du nicotinamide ($\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : Linéaire pondéré $1/X^2$, B : Quadratique pondéré $1/X$ et $1/X^2$, C : Racine carré pondéré $1/X$, D : Racine carré pondéré $1/X^2$, E : Logarithmique pondéré $1/X$, F : Logarithmique pondéré $1/X^2$).....	136
Figure V.2 :	Profils d'incertitude du nicotinamide ($\beta = 80\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : Linéaire pondéré $1/X^2$, B : Quadratique pondéré $1/X$ et $1/X^2$, C : Racine carré pondéré $1/X$, D : Racine carré pondéré $1/X^2$, E : Logarithmique pondéré $1/X$, F : Logarithmique pondéré $1/X^2$).....	137
Figure V.3 :	Profils d'incertitude du nicotinamide ($\beta = 90\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : Linéaire pondéré $1/X^2$, B : Quadratique pondéré $1/X$ et $1/X^2$, C : Racine carré pondéré $1/X$, D : Racine carré pondéré $1/X^2$, E : Logarithmique pondéré $1/X$, F : Logarithmique pondéré $1/X^2$).....	138

Figure V.4 :	<i>Profils d'incertitude de l'acide nicotinique ($\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : Linéaire pondéré $1/X^2$, B : Quadratique pondéré $1/X$ et $1/X^2$, C : Racine carré pondéré $1/X$, D : Racine carré pondéré $1/X^2$, E : Logarithmique pondéré $1/X$, F : Logarithmique pondéré $1/X^2$).....</i>	139
Figure V.5 :	<i>Profils d'incertitude de l'acide nicotinique après correction ($\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : Linéaire pondéré $1/X^2$, B : Quadratique pondéré $1/X$ et $1/X^2$, C : Racine carré pondéré $1/X$, D : Racine carré pondéré $1/X^2$, E : Logarithmique pondéré $1/X$, F : Logarithmique pondéré $1/X^2$).....</i>	140
Figure V.6 :	<i>Profils d'incertitude de l'acide nicotinique après correction ($\beta = 80\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : Linéaire pondéré $1/X^2$, B : Quadratique pondéré $1/X$ et $1/X^2$, C : Racine carré pondéré $1/X$, D : Racine carré pondéré $1/X^2$, E : Logarithmique pondéré $1/X$, F : Logarithmique pondéré $1/X^2$).....</i>	141

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : VALIDATION DES METHODES ANALYTIQUES	5
I. INTRODUCTION	6
II. HISTORIQUE DE LA VALIDATION	6
III. DEFINITION DE LA VALIDATION ANALYTIQUE	8
IV. VALIDATION ET CYCLE DE VIE D'UNE METHODE ANALYTIQUE.....	8
1. Sélection	10
2. Développement	11
3. Validation.....	12
3.1. Critères de validation.....	13
4. Routine	15
5. Revalidation.....	16
V. STRATEGIES DE VALIDATION DES METHODES ANALYTIQUES	16
1. Approches de validation classiques	16
1.1. Les fondements statistiques	16
1.2. Classification des approches conventionnelles.....	18
2. Validation basée sur le profil d'exactitude et l'erreur totale	22
2.1. Objectif de la validation et objectif de la méthode.....	22
2.3. β -Expectation tolérance intervalle	25
2.4. Procédure de construction du profil d'exactitude	31
VI. CONCLUSION	31
CHAPITRE II : INCERTITUDE DE MESURE ET PROFIL D'INCERTITUDE	33
I. INTRODUCTION	34
VII. CONCEPT D'INCERTITUDE DE MESURE.....	34
1. L'approche ISO 98-3 "bottom-up"	35
2. Les approches "top-down " ou descendantes	37
2.1. Approche inter-laboratoires	37
2.2. Approche basée sur la validation analytique	37
3. Expression de l'incertitude.....	38
VIII. NOTIONS DE INCERTITUDE Vs. ERREUR TOTALE	38
1. Relation entre Incertitude et Erreur	38

2. Différentes sources de l'incertitude	39
IX. PROFIL D'INCERTITUDE.....	41
1. β, γ -Content tolérance intervalle.....	41
1.1. <i>Approximation de Satterthwaite</i>	41
1.2. <i>Simulation de Monte Carlo</i>	43
1.3. <i>Procédure MLS</i>	44
2. Nouvelle stratégie pour l'estimation de l'incertitude de mesure.....	44
X. PROCEDURE DE CONSTRUCTION DU PROFIL D'INCERTITUDE.....	46
1. Démarches pratiques	47
1.1. <i>Plans expérimentales d'étalonnage et de validation</i>	47
1.2. <i>Fonction de réponse</i>	48
1.2.1. <i>Ajustement des fonctions de réponse</i>	49
1.2.2. <i>Prédiction inverse</i>	50
1.3. <i>Linéarité</i>	51
1.4. <i>Justesse</i>	51
1.5. <i>Fidélité</i>	51
1.6. <i>Limite de quantification (LQ)</i>	52
2. Interprétation du profil d'incertitude	53
3. Application du profil d'incertitude.....	54
XI. CONCLUSION	55
CHAPITRE III : VALIDATION DES METHODES BIOANALYTIQUES PAR APPROCHE DU PROFIL D'INCERTITUDE.....	56
I. INTRODUCTION	57
II. VALIDATION PAR PROFIL D'INCERTITUDE D'UNE METHODE HPLC DE DOSAGE DE LA VITAMINE B3 DANS LE LAIT	57
1. Domaine d'application [73]	57
2. Les plans d'étalonnage et de validation.....	58
3. Analyse de la fonction de réponse.....	60
4. Justesse	64
5. Fidélité intermédiaire et intervalles de tolérance	66
6. Estimation de l'incertitude de mesure.....	68
6.1. <i>Exemple de calcul de l'incertitude de mesure</i>	68
7. Construction des profils d'incertitude.....	70
7.1. <i>Le nicotinamide</i>	70

7.2. <i>L'acide nicotinique</i>	79
8. Limite de quantification	88
9. Discussion.....	90
III. ETUDE COMPARATIVE ENTRE LE PROFIL D'INCERTITUDE ET L'APPROCHE ADOPTÉE PAR LA SFSTP	92
1. Méthode HS-GC-MS pour la détermination du monoxyde de carbone dans le sang humain ...	92
2. Electrophorèse capillaire pour la détermination de la pureté énantiomérique du S-timolol.....	95
3. Méthode CE-ESI/MS pour la détermination de l'ecstasy et de la méthadone.....	97
3.1. <i>Procédure PP-HD</i>	99
3.2. <i>Procédure LLE-EK</i>	102
4. Discussion.....	105
IV. CONCLUSION	108
CHAPITRE IV : VALIDATION DES METHODES MICROBIOLOGIQUES PAR APPROCHE DU PROFIL D'INCERTITUDE.....	109
I. INTRODUCTION	110
II. METHODE COLILERT-18/QUANTI-TRAY POUR LE DENOMBREMENT DES BACTERIES ESCHERICHIA COLI DANS L'EAU POTABLE.....	111
1. Domaine d'application.....	111
2. Résultats et discussion.....	112
III. METHODE PETRIFILM EB D'ENUMERATION DES ENTEROBACTERIES DANS LES ALIMENTS	120
1. Domaine d'application.....	120
2. Résultats et discussion.....	121
IV. CONCLUSION	125
CONCLUSION GENERALE	126
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	129
ANNEXE : PROFILS D'INCERTITUDE DU NICOTINAMIDE ET DE L'ACIDE NICOTINIQUE	135

Introduction Générale

La fiabilité des mesures en Chimie Analytique constitue une importante problématique qui a été traitée par de multiples auteurs dans divers domaines de l'analyse. Ce sujet est d'autant plus crucial à étudier aujourd'hui à cause de sa perception généralisée, surtout en ce qui concerne l'objectif des méthodes analytiques, qu'il existe un problème d'incompatibilité entre la validation des méthodes, d'une part, et l'estimation de l'incertitude de mesure, d'autre part. Cette perception est remise en question dans différents domaines socio-économiques, sachant que l'analyse tant chimique, physique que biologique, est de nature sectoriel.

Notre mémoire cherche à contribuer à une meilleure compréhension des questions relatives à la performance des procédures analytiques et à la qualité de leurs mesures en présentant une étude approfondie des dispositifs statistiques existants, dans le but d'offrir aux analystes des nouveaux outils pour juger adéquatement les résultats d'analyse.

A une époque où il est difficile d'exploiter un résultat, à bon escient, en absence de son exactitude, on peut comprendre pourquoi la validation analytique a fait couler beaucoup d'encre et à susciter l'intérêt des scientifiques. En effet, un survol de la littérature dévoile que ce domaine est hautement normalisé et réglementé (ISO, ICH, FDA, AOAC, EURACHEM...). En dépit de ces efforts, de nombreux obstacles demeurent sur la voie de regrouper et d'approcher les méthodologies statistiques existantes pour aboutir à une démarche globale, harmonieuse et flexible capable d'apprécier la performance des méthodes analytiques quel que soit l'élément à analyser et quelle que soit sa matrice.

En 2003, la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) a proposé une nouvelle démarche statistique pour valider les procédures analytiques dans le but de remonter les faiblesses et les limitations des approches conventionnelles que la pratique a pu mettre en évidence. Cette démarche nommée profil d'exactitude, a pu introduire la notion de l'erreur totale et le « *β -expectation tolérance intervalle*» pour statuer sur la validité des méthodes analytiques. Cet outil décisionnel graphique a permis de restreindre les règles de diagnostic et d'extraire les règles de décisions tout en engendrant une adhérence entre les objectifs d'une validation et ceux d'une méthode d'analyse. Bien que l'efficacité de cette stratégie par rapport à celles classiques, soit désormais sans équivoque, il n'en reste pas moins que des interrogations demeurent sur la capacité du profil d'exactitude à estimer l'incertitude de mesure.

En ce qui concerne l'incertitude de mesure, c'est un paramètre dont sa détermination est primordiale car il donne une indication de la qualité d'un résultat d'analyse et de la fiabilité qu'on peut lui accorder. Ceci explique pourquoi les standards qui s'attachent à l'assurance qualité dans

les laboratoires d'analyses chimiques, biologiques et médicales, en particulier ISO 17025 et 15189, exigent l'évaluation et l'introduction de l'incertitude lors de l'émission des bulletins d'analyse.

Toutefois, quoique le concept d'incertitude soit hautement réglementé et clairement établi depuis un certain temps (approches GUM, EURACHEM, AMC, ISO11352...), il n'en existe pas moins un fossé entre ces exigences normatives et la pratique journalière des laboratoires. En fait, les analystes galèrent quotidiennement pour satisfaire convenablement à ces exigences normatives d'autant plus que ces documents standardisés engendrent des problèmes d'ordre économique et technique quasi-insolubles.

Au regard de ce qui précède, il apparaît important et indispensable pour nous, de développer une stratégie statistique à caractère globale capable de surmonter toutes les faiblesses et les inconvénients de ces prédécesseurs.

A cet égard, ce travail de thèse a l'ambition de présenter une démarche innovante servant à examiner si une méthode d'analyse est bien adaptée à ses objectifs. A ce stade, nous voulons introduire le concept d'incertitude allié avec l'intervalle de tolérance de type « β, γ -content », et le transposé en un outil décisionnel graphique hors pair, dans le but de minimiser le risque de prendre des décisions absurdes. Baptisé profil d'incertitude, cette stratégie va offrir aux analystes l'opportunité d'accéder à la validation analytique et l'estimation de l'incertitude de mesure sans avoir recours à des expériences complémentaires. Notre profil étant basé sur les statistiques de « β -content, γ -confiance tolérance intervalle », nous avons proposé trois approches chimiométriques différentes pour son calcul et pour le calcul de l'incertitude de mesure.

Par ailleurs, nous avons entamé l'approbation de notre démarche en la testant sur des méthodes Biologiques et Microbiologiques. Le choix de ces deux classes de procédures, se justifie par le fait que la majorité des approches de validation anciennes et récentes trouvent des difficultés pour évaluer statistiquement la fiabilité de leurs résultats de mesure, sachant que souvent les données générées par ces méthodes ne suivent pas la loi de probabilité gaussienne.

La structure de cette thèse s'articule autour de quatre chapitres :

- Dans le premier chapitre, nous avons dressé la problématique et l'état de l'art du sujet, en rappelant le contexte général de l'étude. Il concerne, en fait, une synthèse bibliographique relative aux stratégies de validation analytique. Dans un premier temps, un aperçu sur les critères de performance et le cycle de vie des procédures analytiques sont rapportés. Puis, nous avons discuté les bases statistiques des approches classiques de validation. En dernier lieu,

nous avons mis la lumière sur les avantages et les limitations de la stratégie de l'erreur totale, introduite par la SFSTP.

- Le deuxième chapitre est consacré à la mise en exergue d'une nouvelle démarche de la validation analytique et l'estimation de l'incertitude de mesure en lui attribuant le nom de « profil d'incertitude ». Trois méthodologies chimiométriques sont proposées pour construire l'intervalle de tolérance de type (β -content, γ -confidence), à savoir : l'approximation de Satterthwaite, la simulation de Monte Carlo et la procédure MLS (Modified Large Simple). Par ailleurs, nous avons dévoilé une formule pionnière pour l'estimation de l'incertitude en exploitant de manière univoque les données de validation et sans avoir recours à des expériences supplémentaires. Cette stratégie de validation globale a été transposée en un outil décisionnel capable de juger graphiquement la qualimétrie des méthodes analytiques.
- Le troisième chapitre est dédié à démontrer l'applicabilité et la convenance du profil d'incertitude à statuer décemment sur la validité des méthodes Bioanalytiques. A ce stade, nous avons illustré toutes les étapes nécessaires pour appliquer les algorithmes accompagnant cet outil décisionnel en exploitant les données de validation d'une méthode chromatographique destinée pour le dosage de la vitamine B3 dans le lait. Néanmoins, pour trancher sur la pertinence de cette stratégie une comparaison avec la démarche introduite par SFSTP s'impose. A cet égard, nous avons mené une analyse comparative de cette nouvelle approche avec celle de l'erreur totale à travers l'étude des résultats de validation de trois méthodes Bioanalytiques, utilisant différentes techniques de séparation soit : HS-GC-MS, électrophorèse capillaire en milieu non aqueux et CE-ESI/MS.
- Le dernier chapitre, est réservé à élargir le domaine d'application du profil d'incertitude dans le but de démontrer son universalité. Le profil est appliqué afin d'évaluer la performance des méthodes Microbiologiques. En effet, la stratégie innovante développée dans le cadre de cette thèse, est exploitée dans deux domaines de la Microbiologie soit : la Microbiologie de l'eau et des aliments. L'objectif est d'expliquer éventuellement comment cette démarche à caractère holistique peut être efficacement appliquée conformément aux instructions de la norme ISO 16140 dans le cadre d'une étude interlaboratoire.

Enfin, une conclusion générale couronne ce rapport de thèse, tout en exposant les points forts de ce travail aussi bien que les limitations et les perspectives envisagées.

Chapitre I

Validation des Méthodes

Analytiques

I. INTRODUCTION

Un aperçu de la bibliographie traitant du concept de la validation révèle que ce domaine est fortement réglementé [1-5]. En effet, des efforts considérables ont été réalisés dans le domaine de la chimie analytique sans combiner avec succès les approches de validation existantes en une seule démarche claire et harmonieuse capable d'évaluer la performance d'une méthode analytique, indépendamment de la nature de l'analyte, de la matrice et du champ d'application.

Par ailleurs, la stratégie de validation préconisée par plusieurs standards et guides est l'approche dite conventionnelle basée sur l'estimation statistique de plusieurs critères en testant l'hypothèse nulle. Cela peut expliquer pourquoi elle est encore utilisée dans plusieurs domaines malgré les multiples faiblesses qu'elle présente [6]. L'un de ses inconvénients majeurs est que les méthodes ayant une faible précision sont plus difficiles à valider que celles présentant une précision élevée. On est déjà dans la situation paradoxale et frustrante pour l'analyste où une méthode ayant une meilleure qualité métrologique est jugée comme non valide [7]. Par conséquent, la pratique a montré la difficulté d'appliquer ce type de tests aux données analytiques [6]. De plus, ces approches n'offrent pas un équilibre adéquat entre le risque du consommateur et le risque du producteur. Pour cette raison, nous croyons que l'harmonisation des modes de calcul des critères de validation des méthodes représente une approche qui, à l'heure actuelle, permettra de mieux résoudre ces problèmes.

A cet égard, le but de ce chapitre est d'effectuer une synthèse bibliographique relative aux stratégies de validation analytique en vue de dresser la problématique et l'état de l'art du sujet, en rappelant le contexte général de l'étude. Dans un premier temps, un aperçu sur les critères de performance et le cycle de vie des procédures analytiques seront rapportés. Puis, nous allons discuter les bases statistiques des approches classiques de validation. En dernier lieu, nous allons mettre la lumière sur les fondements de la stratégie de l'erreur totale, introduite par la SFSTP.

II. HISTORIQUE DE LA VALIDATION

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 [8].
- 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 [9].
- Toujours en 1989, la pharmacopée américaine publie, dans son 9^{ème} supplément, «1225», "validation of compendial methods", texte officialisé dans cette même pharmacopée le 1^{er} janvier 1990 [10].
- En 1992, la société française SFSTP publie, dans STP Pharma Pratiques, un guide pour la validation analytique [11, 12].
- 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) » [13]. Cette publication est complétée en 1996 par une seconde publication (Q2B) expliquant comment on peut conduire une validation analytique « Validation of analytical procedure: Methodology » [14].
- 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”, [15].
- En 1995, FDA publie une procedure de validation, « Guideline on validation of analytical procedures, definitions and terminology » [16]. Cette publication est suivie, en 1997, par une autre développant la methodologie de la validation, « Guideline on validation of analytical procedures, methodology » [17].
- 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 » [18].
- En 1998, FDA republie le Guide pour les industries « Guidance for Industry: Bioanalytical Methods Validation for Human Studies (Draft guidance) » [19].
- Eurachem propose en 1998 le guide “ The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to methods validations and related topics” [20].
- FDA, Draft republie en août 2000 « Guidance for Industry - Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation » [21].
- En 2002, la commission européenne fait sortir la décision 2002/657/CEE (SANCO) [22].
- La pharmacopée américaine (USP) republie, en 2003, General information <1225>, « Validation of compendial methods » [23].

- En vue d'une harmonisation, la société française SFSTP republie dans STP Pharma Pratiques en deux parties : « Validation des procédures analytiques quantitatives ; Harmonisation des démarches »
 - Partie I -Généralités: STP Pharma Prat., 7, 101-138, 2003 [6].
 - Partie II et III Statistiques et exemples : STP Pharma Prat., 16, 1-31, 2006 [24, 25].

III. DEFINITION DE LA VALIDATION ANALYTIQUE

La validation analytique est l'élément clé pour évaluer et démontrer la fiabilité et l'aptitude d'une méthode pour un usage déterminé. En effet, elle doit apporter la confiance aux laboratoires dans les résultats qui seront générés, puisque ces derniers sont utilisés pour prendre des décisions cruciales.

D'ailleurs, la norme ISO 17025 [5] définit la validation comme étant « la confirmation par examen et fourniture de preuves réelles que les exigences particulières d'un usage projeté donné sont remplies ». Cela veut dire qu'elle a pour objectif de prouver avec traçabilité qu'une méthode d'essai livre des résultats permettant ainsi de vérifier le respect de spécifications préétablies.

Qu'il soit reconnu que la validation n'est pas seulement requise par les autorités réglementaires, mais elle est aussi une phase décisive du cycle de vie d'une méthode. Dès lors, l'objectif d'une méthode d'analyse quantitative est de mesurer l'analyte cible avec une exactitude connue et appropriée. Pour ce faire, d'abord, une décision sur la validité de la méthode basée sur la prédiction est proposée, c'est-à-dire une méthode est déclarée appropriée pour l'application de routine si l'on considère que la plupart des futurs résultats générés seront suffisamment exacte.

IV. VALIDATION ET CYCLE DE VIE D'UNE METHODE ANALYTIQUE

Afin de bien concevoir la place de la validation, il est intéressant d'introduire un concept qui y est la base de la norme ISO 17025, à savoir le cycle de vie d'une méthode. L'idée fondamentale est que la méthode d'analyse n'est pas statique, elle est une entité dynamique qui passe par plusieurs étapes dépendantes. Trop souvent, une méthode est décrite comme une procédure constante et invariable, ce qui est l'impression de nombreux guides et normes. Or, comme tous les procédés de production, les méthodes d'analyse naissent, évoluent, et meurent. Différents schémas sont proposés pour décrire ce cycle de vie spécifique, mais nous jugeons

que la représentation la plus commode est résumée dans la Figure I.1 car elle montre la méthode comme étant un cycle continu.

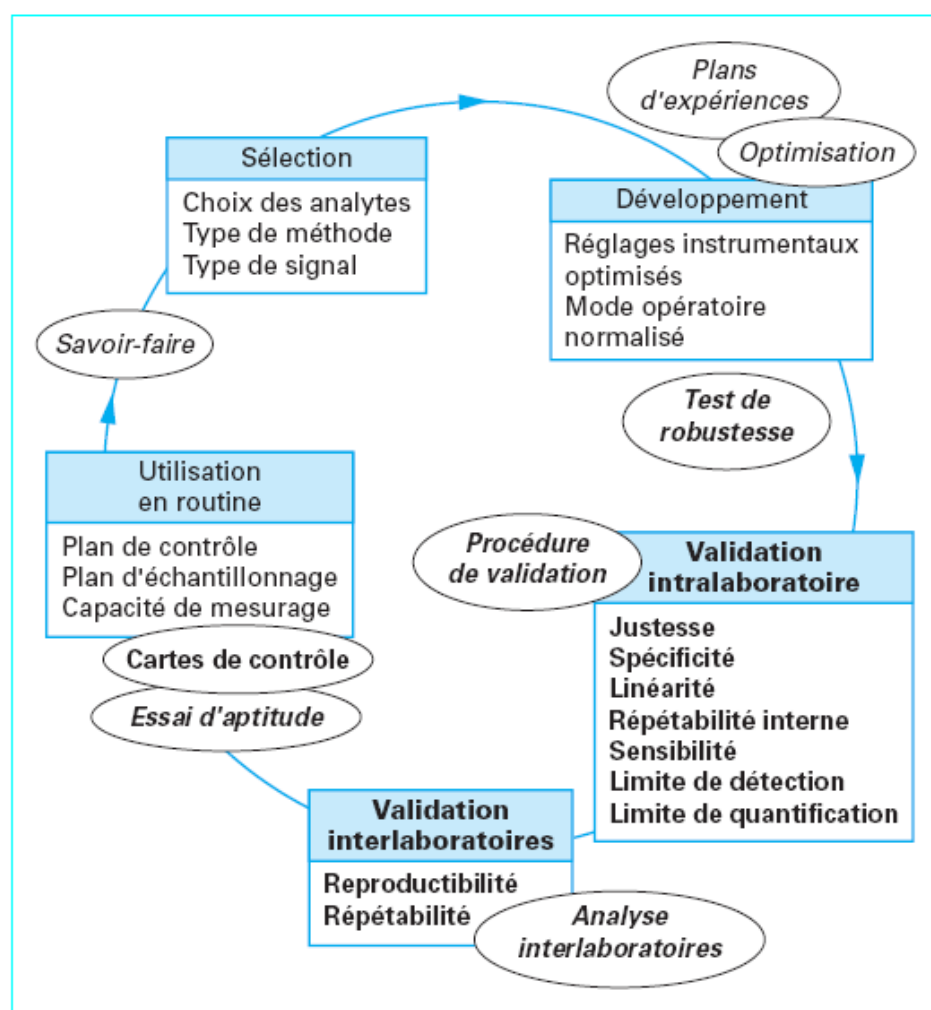


Figure I.1 : Le cycle de vie d'une méthode analytique

Telle qu'illustrée dans la Figure I.1, la mise en œuvre d'une méthode d'analyse peut être décomposée en plusieurs étapes : sélection, développement, validation, étude de robustesse, études interlaboratoires, et enfin utilisation en routine. Après un certain laps de temps, la méthode peut être inexplorée et obsolète ou vu qu'il y a de nouvelles besoins et exigences apparaissent, en conséquent, un autre cycle d'une nouvelle méthode commence. Il peut donc être entendu que chaque étape du cycle de vie doit permettre de s'assurer que la procédure analytique est capable de quantifier chacune des quantités présentes dans un échantillon.

1. Sélection

Concernant la sélection d'une méthode, il est indiqué dans la norme ISO 17025 [5] que : « Le laboratoire doit utiliser des méthodes d'essai et/ou d'étalonnage, y compris des méthodes d'échantillonnage, qui répondent aux besoins du client et qui conviennent aux essais et/ou étalonnages qu'il effectue, de préférence les méthodes publiées comme normes internationales, régionales ou nationales ». De cette indication, on comprend que l'étape de sélection est critique pour l'analyste.

Pour mener à bien cette étape, l'analyste doit être formé aux différentes techniques d'analyse existantes. Il doit être expert et connaître les concepts de base de la chimie, sachant qu'il arrive souvent qu'un composé donné puisse être dosé par des méthodes différentes. Choisir une bonne méthode, et si possible la meilleure, exige la connaissance de beaucoup de paramètres. On doit se poser tout un ensemble de questions pour bien définir les besoins :

- Quelle est la nature de l'analyte à analyser ?
- De quel type d'échantillon s'agit-il (acier, terre, eau...) ?
- Est-ce un constituant majeur, mineur ou à l'état de trace ?
- S'agit-il d'une analyse partielle ou complète de l'échantillon ?
- L'échantillon doit-il être récupéré après la mesure ?
- L'analyse demandée est-elle unique ou sera-t-elle répétitive ?
- Quel est le degré d'exactitude nécessaire ?
- Dispose-t-on du personnel compétent pour mener à bien l'analyse ?
- Quel sera le coût de l'analyse ?
- Quel est le laps de temps dont on dispose pour fournir le résultat ?
- Quelle est la fiabilité des résultats de la méthode envisagée ?
- Quelles sont les conséquences d'erreurs possibles ?
- Quelle est la limite de détection et la sensibilité de la méthode envisagée ?
- L'analyse est-elle destructive ou non ?
- Autre...

La réponse minutieuse à ces questions permettra de bien définir ces besoins et par conséquent de sélectionner adéquatement la bonne méthode.

2. Développement

La méthode étant choisie, il convient de la développer, c'est-à-dire optimiser les différentes étapes du mode opératoire et paramètres de la procédure pour les adapter aux conditions pratiques où elle sera utilisée. Pour cela la méthodologie des plans d'expériences, en particulier, les surfaces de réponses sont maintenant largement reconnue comme les approches les mieux adaptées à cet objectif. Toutefois, quelle que soit la nature du plan d'expérience adopté, les valeurs minimales et maximales de chaque facteur devront être définies afin de déterminer le domaine expérimental qui sera étudié lors de l'optimisation.

Les designs les plus communs utilisés pour construire les surfaces de réponse sont : le plan central composite, le plan Box-Behnken, le plan Doehlert et les plans de mélange. Toutefois, les plans factoriels sont aussi souvent utilisés pour déterminer les facteurs qui affectent significativement les résultats. Les étapes habituelles pour l'optimisation des méthodes analytiques en utilisant les plans d'expériences (DOE) sont les suivantes :

- i. Définir les critères d'optimisation : simple ou multicritères qui seront sélectionnés (résolution, intensité, exactitude, ...) ;
- ii. Définir les facteurs à considérer, par exemple pour les méthodes spectroscopiques d'émission atomique, il y a un grand nombre de facteurs à prendre en considération : le pH, la puissance du générateur, le débit plasma, la vitesse de la pompe...
- iii. Le choix des niveaux des facteurs en vue de définir le domaine expérimental ;
- iv. Criblage de ces facteurs afin de trouver les plus significatifs à l'aide des plans Plackett-Burman ou des plans factoriels fractionnaires ;
- v. Choisir un modèle statistique pour étudier le domaine expérimental d'intérêt pour les facteurs importants en vue de définir une surface de réponse ;
- vi. Effectuer les expériences généralement dans un ordre aléatoire ;
- vii. Effectuer une analyse de variance pour évaluer le modèle le plus approprié ;
- viii. Effectuer la validation du modèle afin de savoir si la méthode est efficacement optimisée ;

L'utilisation des plans d'expériences en phase de développement avant de commencer la validation, est d'une grande importance, car cela permet d'obtenir des informations indispensables sur les performances de la procédure analytique. Ces prérequis à la validation concernent notamment la pertinence du modèle de régression retenu pour établir la fonction de

réponse, la connaissance de la variabilité des résultats, les limites de quantification et l'intervalle de dosage.

A la fin, lorsque la phase développement est achevée, la procédure est formalisée sous la forme de ce qu'on appelle dans le cadre des pratiques de laboratoires (BPL) un mode opératoire normalisé ou Standard Operating Procedure (SOP).

3. Validation

Les méthodes analytiques sont utilisées pour générer des données dans différents domaines d'application. Comme ces données servent de base aux décisions, leur validité est extrêmement importante. Ainsi, les méthodes doivent être en mesure de fournir ces données en qualité constante. L'étape de validation intervient après le développement d'une nouvelle procédure d'analyse. En effet, les performances de la méthode vont évoluer tout au long du cycle de vie, et plus particulièrement au cours des deux premières étapes. Ainsi, la fiabilité du résultat analytique fourni par la méthode doit être améliorée lors de ces premières phases, pour tendre vers une confiance accrue qui sera attestée durant cette troisième étape de validation.

On distingue deux types de validation, la validation inter-laboratoire et la validation intra-laboratoire. La première concerne principalement les méthodes analytiques destinées à être utilisées par plusieurs laboratoires, ou bien dont les résultats vont servir lors d'échanges commerciaux. Ainsi, ce type de validation se rencontre rarement dans l'industrie pharmaceutique où les méthodes sont utilisées en interne, et très fréquemment dans l'industrie agro-alimentaire. En effet, il faut impérativement réaliser une validation inter-laboratoire pour des méthodes destinées à mesurer la conformité d'une denrée lors d'un échange commercial. Ce type de validation permet en outre de calculer les limites de reproductibilité de la méthode. La validation intra-laboratoire est une validation interne concernant l'ensemble des méthodes analytiques développées par un laboratoire.

Les méthodes analytiques doivent être validées, vérifiées ou revalidées dans les cas suivants :

- Avant la première utilisation dans les tests de routine.
- Lorsqu'elles sont transférées à un autre laboratoire.
- Chaque fois que les conditions ou les paramètres de la méthode, pour lesquels elle a été validée, changent (par exemple, un instrument avec des caractéristiques différentes ou

des échantillons avec une matrice différente) et que la modification est en dehors de la portée originale de la méthode.

L'étude de validation devrait inclure les sources de variabilité qui peuvent être couramment rencontrés lors de l'application de la méthode en routine et au moins différents types d'équipement et différents analystes qui vont appliquer la méthode tous les jours. Si l'analyse est effectuée toujours avec le même équipement et par le même opérateur, d'autres équipements ou opérateurs ne devront donc pas être pris en compte. Enfin, avant que l'équipement ne soit utilisé pour l'étape de validation ainsi que pour des analyses de routine, sa performance doit être vérifiée [26].

3.1. 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 :

- Spécificité-sélectivité ;
- Fonction de réponse (courbe d'étalonnage) ;
- Linéarité ;
- Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) ;
- Justesse ;
- Exactitude ;
- Limite de détection (LD) ;
- Limite de quantification (LQ) ;
- Intervalle de dosage ;
- 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 ;
- Autre...

Plusieurs documents normatifs et réglementaires ont défini les critères de validation à tester d'une façon hétérogène [1-5]. En conséquence, des confusions existent entre certains critères. C'est ainsi que la notion de linéarité apparaît ou non et que son interprétation peut être différente d'un document à l'autre. Il en va de même avec la justesse qui, selon les documents, est confondue avec l'exactitude. C'est pourquoi, nous avons jugé nécessaire de définir les termes fréquemment rencontrés en validation et qui créent confuses.

3.1.1. Linéarité

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (exemple : concentration) en analyte dans l'échantillon [4].

3.1.2. Fonction de réponse (courbe d'étalonnage)

La fonction de réponse d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existant entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée « courbe d'étalonnage » [2].

La fonction de réponse peut être linéaire (droite), mais il n'y a aucune raison de la rattacher obligatoirement à ce type de modèle. En effet, il existe des situations de non linéarité liées notamment à certains systèmes de détection ou à l'étendue de l'intervalle de dosage. En revanche, il est nécessaire que la fonction de réponse soit strictement croissante ou décroissante, c'est-à-dire monotone. Signalons encore que l'estimation d'une telle fonction par les méthodes habituelles d'ajustement (exemple : méthode des moindres carrés) postule la constance de la variabilité (variance) de la réponse à toutes les concentrations (homoscédasticité) ; or cette hypothèse ne se vérifie pas toujours lorsque l'intervalle de dosage est plus étendu.

3.1.3. Justesse

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée (standard international, standard pharmacopée) [27].

La mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de recouvrement et de biais absolu ou relatif (erreur systématique).

3.1.4. Exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie [27].

L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité.

4. Routine

Si la validation analytique d'une procédure s'est avérée conforme. La vie de cette procédure se poursuit par son utilisation en routine. Cependant, le contrôle journalier de la performance des résultats rendus est obligatoire. Pour effectuer ce contrôle, on s'appuie, tout d'abord, sur les connaissances acquises lors du développement et de la validation de la méthode mais aussi sur des outils de qualité telle que les cartes de contrôle. A ce propos, la norme ISO 17025 nécessite, que les méthodes analytiques devraient être surveillées pendant l'utilisation de routine afin de garantir la fiabilité des résultats analytiques qui sont produites quotidiennement.

De ce point de vue, les cartes de contrôle sont des outils très efficaces pour vérifier la stabilité dans le temps d'une méthode d'analyse utilisée en routine. Le principe des cartes de contrôle se base sur la mesure régulière d'une caractéristique d'un matériau cible (échantillon de contrôle, témoin, référence, étalon, ...) et les valeurs obtenues sont reportées par ordre chronologique de collecte sur un graphique. Ce graphique comprend une ligne centrale qui représente la valeur cible du processus de contrôle (moyenne, valeur de référence, ...) et deux lignes horizontales dites limite de contrôle inférieure et limite de contrôle supérieure. D'autres lignes de référence peuvent être représentées (limites de surveillance, ...). Les limites de contrôle sont choisies de façon que presque toutes les valeurs soient comprises entre ses limites aussi longtemps que le processus reste sous contrôle :

- Si la carte montre qu'il y a des variations aléatoires autour de la valeur cible et que les limites de ces variations restent entre les limites de contrôle fixées, on dit que le système est sous contrôle statistique.

- Si la carte montre qu'il y a des variations autres que celles liées au hasard, on peut supposer que le système est perturbé.

5. Revalidation

Au cours de l'utilisation en routine de la méthode analytique, certaines améliorations peuvent être apportées à la méthode. Ces modifications vont alors conduire à une procédure plus ou moins complète de revalidation. Un test simple devra être effectué pour déterminer l'impact de ces modifications. En règle générale, une modification de réglage est considérée comme mineure, tandis qu'une modification affectant le principe de la méthode est considérée comme majeure. Dans ce dernier cas, une procédure de validation complète devra de nouveau être appliquée.

V. STRATEGIES DE VALIDATION DES METHODES ANALYTIQUES

La validation est fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables. Donc, elle a pour but de démontrer qu'elles correspondent à l'utilisation pour laquelle elles sont proposées.

En effet, plusieurs approches ont été élaborées pour valider les procédures analytiques [11, 16-18, 28-30]. D'un point de vue statistique, elles présentent certaines insuffisances, notamment le manque de considération de la prise de décision en fonction de limites d'acceptabilité définies a priori et du risque relatif à l'usage futur de la méthode. En outre, certaines de ces approches définissent les critères de validation à tester, mais ne proposent pas des approches expérimentales et se limitent surtout à des notions générales [6]. Comme les documents réglementaires relatifs à la validation analytique sont d'ordre général, il y a place à l'interprétation par les analystes afin de choisir la règle de décision qui permettra de déclarer valide une méthode analytique. Face à cette situation, de nouvelles approches de validation ont été proposées dans le but de surmonter ces difficultés et faciliter la prise de décision aux analystes.

1. Approches de validation classiques

1.1. Les fondements statistiques

L'approche de validation classique (ou conventionnelle) consiste à définir des critères qui vont servir à valider une procédure quantitative, vérifier ces critères par des tests d'hypothèses

statistiques, dans le but de démontrer si une méthode analytique est bien adaptée à ses objectifs. Elle permet l'évaluation distincte de l'ensemble des critères de performance de la méthode.

1.1.1. Test d'hypothèse

Lorsqu'on examine la situation actuelle en ce qui concerne les règles de décision utilisées par les approches classiques de validation, on constate que ces dernières reposent sur l'utilisation du test d'hypothèse. En effet, les tests d'hypothèses ou test de signification ont pour but de vérifier, à partir des données d'un ou plusieurs échantillons, la validité de certaines hypothèses relatives à une ou plusieurs populations.

1.1.2. Principe des tests

D'une manière générale, dans tout test de signification, on émet pour commencer une hypothèse dite hypothèse nulle, généralement désignée par le symbole H_0 . On mesure ensuite l'écart observé, soit entre certaines caractéristiques de la population et de l'échantillon, dans le cas des tests d'ajustement et de conformité, soit entre certaines caractéristiques des divers échantillons, dans le cas des tests d'égalité, et on calcule la probabilité d'observer, quand l'hypothèse nulle est vraie.

Si cette probabilité est relativement élevée, on considère l'hypothèse émise au départ comme plausible, et on l'accepte. Par contre, si la probabilité calculée est faible, et plus précisément si elle est inférieure ou égale à un niveau de signification préalablement fixé, l'écart observé apparaît comme peu compatible avec l'hypothèse, et on rejette H_0 en admettant implicitement la validité d'une autre hypothèse H_1 , dite alternative ou opposée.

1.1.3. Les étapes d'un test d'hypothèse

Différentes étapes doivent être suivies pour tester une hypothèse :

- Définir l'hypothèse nulle (notée H_0) à contrôler et l'hypothèse alternative (notée H_1) ;
- Définir le niveau de signification du test ou région critique notée α ;
- Choisir un test statistique ou une statistique pour contrôler H_0 ;
- Calculer, à partir des données fournies par l'échantillon, la valeur de la statistique ;
- Prendre une décision concernant l'hypothèse posée et faire une interprétation.

1.1.4. Tests statistiques appliqués aux approches classiques de validation

Dans la littérature, on trouve une liste abondante des tests statistiques. Il en existe plusieurs centaines. Parmi ceux-ci, seulement un nombre restreint connaît des applications régulières. En ce qui concerne les tests statistiques souvent rencontrés et indispensables à la validation classique des procédures analytiques, sont rassemblés dans le tableau suivant :

Test	Objectif
Test de Cochran	Vérifier l'homogénéité de plusieurs variances
Test de Student	Vérifier l'égalité de deux moyennes
Test de Fisher	Vérifier l'égalité de deux variances
Test de Dixon	Rechercher les données aberrantes
Test de Grubbs	Rechercher les moyennes aberrantes
ANOVA	Vérifier l'égalité de plusieurs moyennes
	Vérifier la linéarité d'un modèle d'étalonnage (Pente significatif - Manque d'ajustement)

Tableau I.1 : Tests statistiques utilisés pour la validation analytique

1.2. *Classification des approches conventionnelles*

Si on regarde les processus de décision classiques rencontrés pour la validation analytique, soit à l'échelle industrielle ou dans la littérature scientifique, on remarque qu'ils peuvent être classés en trois groupes selon la stratégie statistique adoptée :

- Approche descriptive ;
- Approche par la différence ;
- Approche par équivalence.

1.2.1. Approche descriptive [31]

Usuellement, avec des résultats analytiques quantitatifs, les critères de décision portent sur les deux types d'erreur que sont l'erreur systématique ou manque de justesse (biais) et l'erreur aléatoire ou défaut de fidélité (variance). Il faut ainsi montrer que :

- en moyenne, le biais global de la méthode à valider est comparable à une limite d'acceptabilité (justesse),
- la variabilité des résultats (fidélité) de la méthode étudiée est acceptable.

Si ces deux critères sont remplis, alors la méthode peut être acceptée.

La première approche statistique que nous décrivons dans ce paragraphe est purement descriptive, elle est basée sur l'estimation et la comparaison du biais et des coefficients de variations des résultats.

Justesse

La justesse est évaluée par la comparaison à chaque niveau de concentration de l'estimation du biais relatif à une valeur limite (limite d'acceptabilité λ), définie a priori. Par exemple, en industrie pharmaceutique la limite d'acceptabilité du biais relatif est fixée à 2%.

Fidélité

De la même manière, il faut démontrer que le coefficient de variation (CV) de la fidélité intermédiaire pour chaque niveau de concentration est inférieur à une valeur limite λ pour que la méthode soit acceptée au niveau étudié.

Dans une étude par simulation, Bouabidi et al. [32] ont démontré que l'approche descriptive n'est pas un outil de décision adéquat car elle ne contrôle ni le risque de rejeter une méthode valide (risque fournisseur), ni celui d'accepter une méthode non valide dans la réalité (risque consommateur).

1.2.2. Approche par différence [31, 33, 34]

Justesse

L'approche par différence consiste que la justesse de la procédure analytique est évaluée sur la base du test t de Student classique. On construit un intervalle de confiance à un niveau de confiance $(1-\alpha)$ pour le biais relatif global, c'est-à-dire un intervalle dans lequel on a de bonnes raisons de croire qu'il contient la valeur zéro. La décision s'effectue comme suit :

- si l'intervalle de confiance de biais global calculé contient la valeur 0, la justesse est alors satisfaisante ;
- sinon la méthode est rejetée pour ce critère.

Fidélité

L'évaluation de la fidélité par cette approche tend à observer si la valeur maximale du coefficient de variation de la fidélité intermédiaire (CV_{FI}) est incluse à l'intérieur de l'intervalle de confiance de 95 % de CV_{FI} observé et cela, pour chaque niveau de concentration. Une revue critique de l'approche par différence [32] a montré qu'il n'est pas compatible avec l'objectif de la validation analytique :

- Si la méthode n'est pas fidèle, c'est à dire plus grande est la variance, plus il est probable que l'intervalle de confiance contient la valeur 0% de biais relatif comme illustré par la situation 4 et 5 de la Figure I.2.
- Plus petite est la variance, c'est à dire une excellente fidélité, plus il est probable que l'intervalle de confiance ne contient pas la valeur 0% de biais relatif, conduisant à rejeter la procédure comme l'illustre le cas 2 de la Figure I.2. En conséquence, l'hypothèse nulle ne peut pas donc être utilisée pour statuer sur la validité d'une procédure analytique.

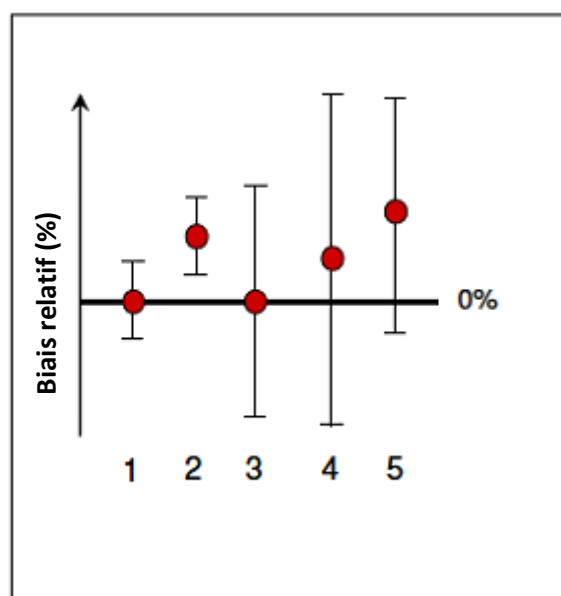


Figure I.2 : Application de l'approche par différence pour statuer sur la validité de 5 méthodes par rapport au biais relatif.

1.2.3. Approche par équivalence [31, 33-35]

Justesse

Le test de justesse se fait en pratique par la construction de l'intervalle de confiance $(1-2\alpha)$ pour le biais relatif à chaque niveau de concentration que l'on compare aux limites $\pm\lambda$.

La décision sur la justesse de la méthode se prend alors comme suit :

- si l'intervalle de confiance à $(1-2\alpha)$ pour le biais relatif n'est pas inclus dans l'intervalle $[-\lambda, \lambda]$, alors la méthode ne peut être considérée comme juste ;
- sinon la méthode est considérée comme juste.

Fidélité

Cette stratégie consiste à comparer la borne supérieure L_S de l'intervalle de confiance unilatéral à $(1-\alpha)$ du coefficient de variation de fidélité intermédiaire de la méthode à une limite d'acceptabilité λ fixée a priori. Si la borne supérieure L_S est inférieure à λ , alors la méthode peut être acceptée au niveau de la fidélité.

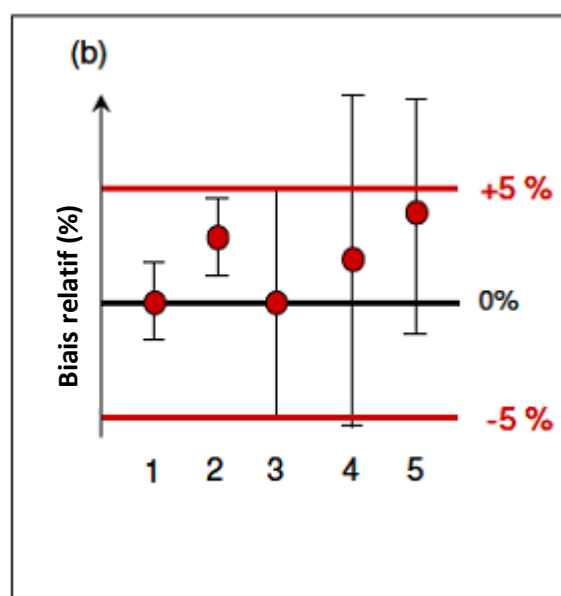


Figure I.3 : Application de l'approche par différence comme règle de décision pour statuer sur la validité de 5 méthodes. La limite d'acceptabilité est fixée à $\pm 5\%$.

Bien que le risque est minime d'accepter une méthode non valide et de refuser une méthode valide, l'approche par équivalence présente des faiblesses en tant que règle de décision. Elle ne répond pas à l'objectif de la validation analytique. En effet, les bonnes méthodes ne fournissent pas nécessairement de bons résultats comme le montre le cas (a) de la Figure I.4. Ce n'est pas parce qu'on a le biais relatif et la fidélité intermédiaire sont inclus dans des limites prédéfinies que les résultats sont acceptables. Toutefois, le contraire est toujours vrai : des résultats acceptables sont obtenus par des méthodes d'analyse avec des biais et de fidélité intermédiaire acceptables (cas (b) de la Figure I.4).

Pour récapituler, on peut dire qu'une analyse détaillée de ces trois approches conventionnelles dévoile des inconvénients et des faiblesses pour statuer sur la validité d'une méthode. En effet, ces approches se basent sur le test d'hypothèse comme un outil statistique décisionnel et qui y'est malheureusement inapproprié avec l'objectif de la validation analytique. Si on revient à la définition fournie par la norme ISO17025, il apparaît qu'il est impératif de confronter la méthode à son objectif pour décider de sa validité : la validation ne peut pas être une simple caractérisation de la méthode à l'aide d'une liste plus au moins longue de caractéristiques statistiques. Ainsi, dire qu'un coefficient de variation de fidélité intermédiaire ou le biais est de X% ne signifie pas qu'une méthode est valide.

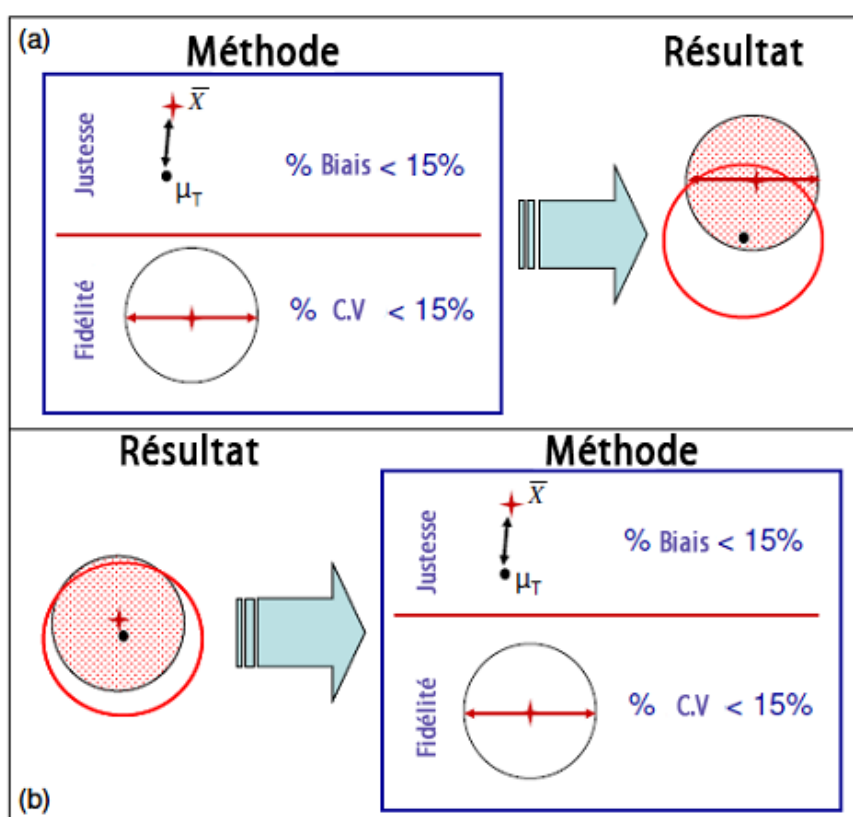


Figure I.4 : Illustration des deux cas de la validation ; μ_T est la valeur vraie ; $\bar{X}$ est la moyenne des résultats ; le cercle rouge est la limite d'acceptabilité.

2. Validation basée sur le profil d'exactitude et l'erreur totale

2.1. Objectif de la validation et objectif de la méthode

Le fait de croire et de dire que la validation n'est qu'un ensemble de tests statistiques risque de ne pas saisir l'importance de cette étape dans le cycle de vie d'une méthode. Ainsi pour bien cadrer l'objectif de la validation, il faut tout d'abord, éclaircir l'objectif d'une méthode.

En effet, une méthode analytique a pour objectif de pouvoir quantifier le plus exactement et le plus précisément possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à évaluer. En conséquence, l'objectif de la validation analytique n'est pas uniquement, d'appliquer des tests statistiques pour vérifier certaines hypothèses, encore moins d'obtenir des estimateurs de la justesse et de la fidélité. Néanmoins, la validation a pour but de donner au laboratoire et aux autorités compétentes des garanties suffisantes que chacune de ces mesures qui seront réalisées en routine avec une méthode donnée seront proches de la "vraie valeur".

Au déchiffrement de cet objectif, deux notions fondamentales émergent, celles de :

- ✓ « proche de la vraie valeur », signifiant qu'il faut fixer une limite d'acceptabilité, au-delà de laquelle la mesure réalisée en routine ne doit pas dépasser, puisque la vraie valeur en réalité restera toujours inconnue ;
- ✓ « garanties », signifiant, qu'il faut minimiser le risque d'accepter une procédure qui ne serait pas suffisamment exacte (risque client) ou, au contraire, de rejeter une procédure qui serait valide (risque producteur).

Dans cette perspective, il est d'une importance capitale de faire la différence entre les critères qui permettent de prendre des décisions sur la validité de la procédure, de celles qui servent à faire des diagnostics, tel que par exemple de vérifier la linéarité de la courbe d'étalonnage. A cet effet, il faut savoir que la justesse, la fidélité et la linéarité sont seulement que des critères utilisés pour confirmer la performance d'une méthode et ne constituent en aucun cas des objectifs d'une procédure. En d'autres termes, ce que l'analyste attend d'une procédure analytique, c'est que la différence entre le résultat rendu et la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon, qui par ailleurs restera toujours inconnue, soit petite ou du moins inférieure à une limite d'acceptabilité. Pour cette raison, il faut choisir une règle de décision en harmonie avec l'objectif de la méthode pour permettre à la validation de remplir sa mission.

2.2. Règles de décision

L'objectif suprême de toute méthode d'analyse, c'est qu'elle soit susceptible de fournir un résultat aussi exact que possible pour chaque échantillon inconnu à venir. Cela peut être traduit par l'équation I.1, qui stipule que la différence entre une mesure (x) et sa vraie valeur (μ_T) doit être inférieure à une limite d'acceptabilité (λ) définie a priori.

Le choix de la valeur de λ dépend largement du contexte d'application, et qui peut être variable selon les exigences de l'analyse ou la finalité de la procédure analytique.

Communément admises, la limite d'acceptabilité est de 1% ou 2 % pour le dosage de principes actifs dans une matière première [36], de 5 % pour les formes pharmaceutiques et de 15 % pour les analyses dans les matrices biologiques ou environnementales [37].

$$|x - \mu_T| < \lambda \quad (I.1)$$

Dès lors, il paraît raisonnable de prétendre que l'objectif de la validation analytique est de fournir des garanties aux demandeurs d'analyse et/ou aux autorités de contrôle que chaque résultat qui sera obtenu en routine -une fois la procédure validée- sera suffisamment proche de la vraie valeur inconnue de l'échantillon ou du moins compris dans une limite acceptable. En d'autres termes, le but est de minimiser le risque tant au niveau du producteur de résultat que du futur utilisateur. Par conséquent, en phase de validation l'objectif n'est pas simplement, contrairement à ce que la pratique courante ou la lecture de certains guides de validation pouvaient laisser entrevoir, d'obtenir des estimations correctes de la justesse et de la fidélité. Toutefois, il n'en reste pas que ces critères sont des éléments indispensables à l'établissement des garanties précitées.

Ainsi, traduire cet objectif en termes statistiques, signifie que l'analyste veut connaître la probabilité selon laquelle la différence entre la valeur mesurée (x) et la valeur de référence (μ_T) reste inférieure à une limite d'acceptabilité fixée à l'avance et, si possible mais non nécessairement, que cette différence soit petite. Cet objectif peut alors être représenté par l'équation I.2.

$$\Pr(|x - \mu_T| < \lambda) \geq \beta \quad (I.2)$$

Avec β la probabilité considérée acceptable que l'erreur sur les futures mesures réalisées, une fois la méthode validée, se situent en dessous de la limite d'acceptabilité fixée.

Dans ce contexte, une nouvelle approche statistique a été introduite, par une commission SFSTP en 2003 [6, 24, 25] pour statuer sur la validité d'une procédure analytique. Cette approche est née sur le constat d'une part des limitations des approches statistiques conventionnelles et, d'autre part, qu'une méthode juste et fidèle ne donne pas nécessairement des résultats exacts. En effet, cette nouvelle stratégie se base sur l'estimation de l'erreur totale, c'est-à-dire la combinaison des erreurs systématique et aléatoire, de la méthode analytique en utilisant un outil statistique appelé « β -expectation tolérance intervalle» qui a été transformé en un outil de décision final appelé profil d'exactitude. Ce profil permet de garantir qu'une proportion définie des futurs résultats qui seront fournis par la méthode lors de son utilisation

en routine sera bien incluse dans les limites d'acceptabilité fixées a priori en fonction des besoins des utilisateurs.

2.3. *β -Expectation tolérance intervalle*

La théorie et le calcul des intervalles de tolérance ont été développés à un rythme exponentiel au cours de ces dernières décennies. Aujourd'hui, les statistiques des limites de tolérance sont appliquées dans des domaines tels que : le contrôle de qualité, l'environnement, l'industrie, la santé et autres . . .

Deux principaux types d'intervalles de tolérance ont reçu une attention considérable :

- β -expectation tolérance intervalle (β -ETI) ;
- β -content, γ -confidence tolérance intervalle (β, γ -CTI).

Dans cette section, nous discutons les modalités de calcul du β -expectation tolérance intervalle bilatérale dans le cas d'une ANOVA équilibré à un seul facteur en utilisant trois différentes méthodes.

2.3.1. Approximation de Satterthwaite

Durant la validation des méthodes analytiques, le plan expérimental consiste à faire des mesures répétitives dans des jours différents. Le modèle statistique pour décrire les valeurs mesurées est donné par :

$$Y_{ij} = \mu + b_i + e_{ij} ; j = 1, 2, \dots, n ; i = 1, 2, \dots, a \quad (I.3)$$

Où Y_{ij} désigne la mesure du $j^{\text{ème}}$ répétition faite au $i^{\text{ème}}$ jour, μ la moyenne générale inconnue, b_i représente l'effet aléatoire inter-séries, e_{ij} représente les termes d'erreur intra-séries. On suppose que b_i et e_{ij} sont tous indépendants ayant des distributions $b_i \sim N(0, \sigma_b^2)$ et $e_{ij} \sim N(0, \sigma_e^2)$.

Donc $Y_{ij} \sim N(\mu, \sigma_b^2 + \sigma_e^2)$ et σ_b^2 et σ_e^2 représentent les deux composantes de la variance du model.

Nous définissons :

$$\bar{Y} = \frac{1}{an} \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n Y_{ij}, \bar{Y}_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n Y_{ij}, SS_b = n \sum_{i=1}^a (\bar{Y}_i - \bar{Y})^2 \text{ et } SS_e = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2 \quad (I.4)$$

Également, nous identifions les carrés moyens sous le modèle (I.3) :

$$MS_b = \frac{SS_b}{a-1} \text{ et } MS_e = \frac{SS_e}{a(n-1)} \quad (I.5)$$

Les estimateurs ANOVA de σ_b^2 et σ_e^2 sont donnés par :

$$\hat{\sigma}_b^2 = \frac{1}{n}(MS_b - MS_e) \text{ et } \hat{\sigma}_e^2 = MS_e \quad (I.6)$$

Les intervalles de tolérance bilatéraux que nous allons construire seront des fonctions de $\bar{Y}$, $\hat{\sigma}_b^2$ et $\hat{\sigma}_e^2$. Ils seront comme suit :

$$\bar{Y} \pm k\hat{\sigma}_m \quad (I.7)$$

Où :

$$\hat{\sigma}_m^2 = \hat{\sigma}_b^2 + \hat{\sigma}_e^2 \quad (I.8)$$

Et, k est le facteur de tolérance à déterminer. Ainsi, k doit satisfaire la condition suivante :

$$P_{\bar{Y}, \hat{\sigma}_b^2, \hat{\sigma}_e^2} \{[\bar{Y} - k\hat{\sigma}_m < Y < \bar{Y} + k\hat{\sigma}_m]\} = \beta \quad (I.9)$$

Puisque $\bar{Y} \sim N\left(\mu, \frac{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{an}\right)$ indépendamment de $N(\mu, \sigma_b^2 + \sigma_e^2)$, nous avons :

$$\frac{Y - \bar{Y}}{\sqrt{(\sigma_b^2 + \sigma_e^2) + \frac{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{an}}} \sim N(0,1) \quad (I.10)$$

Si nous utilisons l'approximation de Satterthwaite pour obtenir une approximation du khi-carré de la distribution associé à $\hat{\sigma}_m^2$. Nous écrivons :

$$R = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_e^2} \text{ et } R_0 = \frac{\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2} = \frac{R+1}{nR+1} \quad (I.11)$$

Il faut noter que :

$$\frac{SS_b}{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2} \sim \chi_{a-1}^2 \text{ et } \frac{SS_e}{\sigma_e^2} \sim \chi_{a(n-1)}^2 \quad (I.12)$$

Ensuite, on peut conclure que :

$$\frac{\hat{\sigma}_m^2}{\sigma_m^2} \sim \frac{\chi_f^2}{f} \quad (I.13)$$

La condition à satisfaire par k peut être exprimée par :

$$P \left(-k \leq \frac{Y - \bar{Y}}{\sqrt{(\sigma_b^2 + \sigma_e^2) + \frac{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{an}}} / \frac{\hat{\sigma}_m^2}{\sigma_m^2} \leq k \right) = \beta \quad (I.14)$$

Compte tenu de l'approximation de Satterthwaite, le facteur k peut être obtenu selon la distribution de Student. Cela donne :

$$k = t_{f; \frac{1+\beta}{2}} \sqrt{1 + \frac{1}{anR_0}} \quad (I.15)$$

Avec :

$$f = \frac{(R + 1)^2}{(R + n^{-1})^2 / (a - 1) + (1 - n^{-1}) / (an)} \quad (I.16)$$

Cependant, l'intervalle de tolérance ne peut pas être calculé en utilisant le facteur k ci-dessus, car il dépend de R_0 , qui est une fonction du ratio de variances inconnues $\frac{\sigma_b^2}{\sigma_e^2}$. Mee [38] recommande de remplacer R par l'estimation :

$$\hat{R} = \max \left[0, \frac{1}{n} \left(\frac{MS_b}{MS_e} - 1 \right) \right] \quad (I.17)$$

Ainsi l'estimation de f est donnée par :

$$\hat{f} = \frac{(\hat{R} + 1)^2}{(\hat{R} + n^{-1})^2 / (a - 1) + (1 - n^{-1}) / (an)} \quad (I.18)$$

Par conséquent l'estimation de k est :

$$\hat{k} = t_{\hat{f}; \frac{1+\beta}{2}} \sqrt{1 + \frac{1}{an\hat{R}_0}} \quad (I.19)$$

Finalement, le β -expectation tolérance intervalle est donné par :

$$\bar{Y} \pm t_{\hat{f}; \frac{1+\beta}{2}} \sqrt{1 + \frac{1}{an\hat{R}_0}} \times \sqrt{\hat{\sigma}_m^2} \quad (I.20)$$

2.3.2. Simulation de Monte Carlo

Afin d'estimer le β -expectation tolérance intervalle, Lin et Liao [39] ont utilisé l'idée de l'intervalle de confiance pivotale généralisé. Leur procédure consiste que l'intervalle de tolérance prend la forme suivante :

$$\bar{Y} \pm D_1 \quad (I.21)$$

Avec D_1 est la marge d'erreur statistique à déterminer. La condition à remplir par D_1 est :

$$\begin{aligned} \beta &= P(-D_1 \leq Y - \bar{Y} \leq D_1) \\ &= P(-D_1 \leq Z \sqrt{(\sigma_b^2 + \sigma_e^2) + \frac{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{an}} \leq D_1) \end{aligned} \quad (I.22)$$

Avec :

$$Z = \frac{Y - \bar{Y}}{\sqrt{(\sigma_b^2 + \sigma_e^2) + \frac{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{an}}} \sim N(0,1) \quad (I.23)$$

Puisque Z a une distribution qui est symétrique autour de zéro, D_1 peut être considéré comme le $\left(\frac{1+\beta}{2}\right)$ quantile de cette variable aléatoire. Pour un tel choix de D_1 , $-D_1$ sera le $\left(\frac{1-\beta}{2}\right)$ quantile de la même variable aléatoire. Cependant, puisque σ_b^2 et σ_e^2 sont inconnus, Lin et Liao recommande qu'elles soient remplacées par des quantités pivotales généralisées (GPQs) avant de calculer le $\left(\frac{1+\beta}{2}\right)$ quantile. Notant que :

$$(\sigma_b^2 + \sigma_e^2) + \frac{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{an} = \frac{1}{n} \left(1 + \frac{1}{a}\right) (n\sigma_b^2 + \sigma_e^2) + \left(1 - \frac{1}{n}\right) \sigma_e^2 \quad (I.24)$$

Le (GPQs) est donné par :

$$\frac{1}{n} \left(1 + \frac{1}{a}\right) \left(\frac{ss_b}{U_b^2}\right) + \left(1 - \frac{1}{n}\right) \frac{ss_e}{U_e^2} \quad (I.25)$$

Où les ss_b et ss_e désignent les valeurs observées de la SS_b et SS_e , respectivement, et U_b^2 et U_e^2 sont des variables aléatoires indépendantes suivant la loi khi-carré avec un $a-1$ et $a(n-1)$ degré de liberté respectivement. Par conséquent, La marge d'erreur statistique D_1 , est considérée comme le $\left(\frac{1+\beta}{2}\right)$ quantile de la variable aléatoire suivante :

$$Z \sqrt{\frac{1}{n} \left(1 + \frac{1}{a}\right) \left(\frac{ss_b}{U_b^2}\right) + \left(1 - \frac{1}{n}\right) \frac{ss_e}{U_e^2}} \quad (I.26)$$

Le percentile peut être facilement estimé par simulation de Monte Carlo, et l'algorithme suivant peut être facilement spécifié pour effectuer ce calcul :

Algorithme 1.

- i. Une fois les données obtenues, calculer les valeurs observées $\bar{Y}$, ss_b et ss_e ;
- ii. Soit M désigne le nombre de simulations. Pour $i = 1, 2, \dots, M$, effectuez les étapes suivantes.

iii. Générer les variables aléatoires indépendantes

$$Z_i \sim N(0,1), U_{b,i}^2 \sim \chi_{a-1}^2 \text{ et } U_{e,i}^2 \sim \chi_{a(n-1)}^2$$

iv. calculer

$$D = Z_i \sqrt{\frac{1}{n} \left(1 + \frac{1}{a}\right) \left(\frac{SS_b}{U_{b,i}^2}\right) + \left(1 - \frac{1}{n}\right) \frac{SS_e}{U_{e,i}^2}}$$

Le $\left(\frac{1+\beta}{2}\right)$ quantile de la variable aléatoire D , fournit la marge d'erreur statistique D_I nécessaire pour le calcul du β -expectation tolérance intervalle.

2.3.3. Approche Bayésienne

Afin d'introduire l'idée clé concernant l'intervalle de tolérance bayésien, soit X désigne une variable aléatoire dont la distribution dépend d'un paramètre θ , et la réalisation de X indique les données observées. Ici θ peut être un vecteur. Soit x un vecteur représentant les réalisations de X , et soit $L(x|\theta)$ la fonction de vraisemblance. Si $\pi(\theta)$ désigne une loi a priori pour θ , alors la distribution a posteriori de θ , disons $P(\theta|x)$, est donnée par :

$$P(\theta|x) = \frac{L(x|\theta)\pi(\theta)}{\int L(x|\theta)\pi(\theta)d\theta} \quad (I.27)$$

La distribution a posteriori de toute fonction $f(\theta)$ de θ peut évidemment être dérivée de $P(\theta|x)$. Considérons maintenant la dérivation du Bayésienne β -expectation tolérance intervalle bilatérale dans le cas d'une ANOVA équilibré à un seul facteur. Soit $\bar{Y}, SS_b$ et SS_e indépendamment distribués avec :

$$\bar{Y} \sim N\left(\mu, \frac{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{an}\right), \frac{SS_b}{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2} \sim \chi_{a-1}^2 \text{ et } \frac{SS_e}{\sigma_e^2} \sim \chi_{a(n-1)}^2 \quad (I.28)$$

La vraisemblance est considérée comme la densité conjointe de ces trois variables aléatoires, peut être notée $L(\bar{y}, ss_b, ss_e | \mu, \sigma_b^2, \sigma_e^2)$ où $\bar{y}, ss_b$ et ss_e désignent les valeurs observées de $\bar{Y}, SS_b$ et SS_e respectivement.

La dérivation du Bayésien β -expectation tolérance intervalle assume le prior non-informatif pour $(\mu, \sigma_b^2, \sigma_e^2)$:

$$\pi(\mu, \sigma_b^2, \sigma_e^2) \propto \frac{1}{\sigma_e^2(n\sigma_b^2 + \sigma_e^2)} \quad (I.29)$$

Puis les distributions marginales postérieures de Ω_b et Ω_e sont proportionnels à une distribution gamma inverse. Ces distributions a posteriori et de la distribution a posteriori conditionnelle de μ sont donnés par :

$$\Omega_b | \bar{y}, SS_b, SS_e \sim IG\left(\frac{a-1}{2}, \frac{SS_b}{2}\right) \quad (I.30)$$

$$\Omega_e | \bar{y}, SS_b, SS_e \sim IG\left(\frac{a(n-1)}{2}, \frac{SS_e}{2}\right) \quad (I.31)$$

Et

$$\mu | \bar{y}, SS_b, SS_e, \Omega_b, \Omega_e \sim N\left(\bar{y}, \frac{\Omega_b}{an}\right) \quad (I.32)$$

Où $IG(d, s)$ est la densité gamma inverse de paramètres d et s .

Par ailleurs, si les restrictions ne s'appliquent pas, la distribution jointe a posteriori de $(\mu, \Omega_b, \Omega_e)$ serait le produit de ces trois distributions. La procédure consiste à générer (Ω_b, Ω_e) à partir des distributions indépendantes gamma inversées selon les formules (I.30, I.31), et de ne retenir que les paires (Ω_b, Ω_e) qui satisfont $\Omega_b \geq \Omega_e$.

L'algorithme suivant peut être utilisé pour estimer le β -expectation tolérance intervalle bayésien :

Algorithme 2.

- i. Choisir M , le nombre de simulation Bayésien ;
- ii. Générer M valeurs de la distribution de (Ω_b, Ω_e) spécifié dans (I.30) et (I.31) ;
- iii. Retenir ces ensembles de valeurs qui respectent la condition suivante : $\Omega_b \geq \Omega_e$;
Supposons qu'il y a T valeurs qui obéissent à cette condition.
- iv. Générer les T valeurs de la distribution normale de μ donnée en (I.32) ;
- v. Pour chacune de valeurs T du $(\mu, \Omega_b, \Omega_e)$, générer le variable pseudo normale ayant μ comme moyenne et la variance $\sigma_b^2 + \sigma_e^2$;
- vi. Le β_1 et le β_2 percentile des valeurs T de cette distribution pseudo-normale donnent le Bayésien β -expectation tolérance intervalle.

On note que :

$$\sigma_b^2 = \frac{\Omega_b - \Omega_e}{n} \text{ and } \Omega_e = \sigma_e^2 \quad (I.33)$$

Et

$$\beta = \beta_2 - \beta_1 \quad (I.34)$$

2.4. Procédure de construction du profil d'exactitude

Le profil d'exactitude est un outil de décision graphique efficace pour accepter ou rejeter une méthode selon son usage prévu. Cette approche offre la possibilité de contrôler le risque d'acceptation d'une méthode non conforme, aussi de fournir la garantie que les résultats des mesures qui seront obtenus lors de l'utilisation future de la méthode validée seront inclus dans les limites d'acceptabilité fixées à priori selon les exigences définies.

L'élaboration pratique du profil d'exactitude se fait à travers les étapes suivantes :

- i. Sélection des limites d'acceptabilité et de la proportion β en considérant l'usage attendu de la méthode ;
- ii. Ajustement des modèles de régression à partir des standards de calibration ;
- iii. Calcul des concentrations des standards de validation à partir du modèle sélectionné ;
- iv. Détermination du biais moyen à chaque niveau de concentration ;
- v. Calcul des limites de tolérance bilatérales pour les résultats attendus au niveau β à chaque niveau de concentration en considérant le biais et l'écart-type de fidélité intermédiaire ;
- vi. Etablissement du profil d'exactitude, représentant comme fonction de la concentration, le biais moyen, l'intervalle de tolérance des valeurs attendues au niveau β et les limites d'acceptabilité.

Une fois avoir reporté les limites d'acceptabilité sur le graphique du profil d'exactitude, l'interprétation visuelle directe des résultats peut être faite. Pour une méthode donnée, est dite valide si et seulement si ces intervalles de tolérance sont compris entre les limites d'acceptabilité. Dès que, l'intervalle de tolérance sort de la limite d'acceptabilité, on peut conclure que la méthode n'est plus capable de fournir suffisamment de résultats acceptables.

VI. CONCLUSION

La validation est l'ensemble des opérations nécessaires en vue de prouver qu'une procédure analytique est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis pour l'usage prévu. Dans ce chapitre, nous avons donné un aperçu sur les approches classiques applicables à la validation analytique. C'est ainsi que l'on a montré les fondements statistiques de ces approches basés sur l'étude des tests d'hypothèses.

Nous avons également élucidé l'approche globale et harmonisée de la validation des procédures analytiques quantitatives. En effet, cette stratégie a été élaborée par la commission SFSTP, avec pour objectif de recadrer certains critères de validation analytique et de proposer des protocoles harmonisés en distinguant entre les règles de diagnostic et les règles de décision. Cette démarche basée sur le profil d'exactitude et la notion de l'erreur totale (biais + écart type) permet non seulement de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique mais aussi de contrôler le risque associé à son utilisation.

Chapitre II

Incertitude de Mesure et Profil d'Incertitude

I. INTRODUCTION

L'estimation de l'incertitude de mesure devient une étape primordiale lors de la mise en œuvre d'une analyse quantitative afin d'interpréter correctement les résultats et de confirmer leur fiabilité. Certes, la validation est une première étape pour y parvenir, mais elle n'est pas suffisante si l'on veut interpréter et comparer correctement les résultats. En effet, l'incertitude de mesure et la validation analytique sont des passages obligatoires pour tout laboratoire essayant d'être accrédité selon les normes ISO 17025 [5] ou 15189 [40]. C'est pourquoi l'incertitude devrait être un paramètre clé dans toute stratégie de validation.

En fait, l'estimation de l'incertitude de mesure est considérée comme la problématique majeure des laboratoires, car elle exige une technicité élevée et une maîtrise des outils statistiques. Dans le but d'assister les analystes dans ce sens, des guides et des normes ont été publiés et consacrés à l'évaluation de l'incertitude. Les plus utilisées entre ces normes sont : l'approche ISO 98-3 [41] communément appelée “*bottom-up*” et l'approche AMC [42] (*Analytical Methods Committee*) connue sous le nom de “*top-down*”. L'intérêt majeur des chercheurs était principalement de trouver une méthode pratique pour regrouper dans la même étude, la validation analytique et l'incertitude de mesure.

Dans ce cadre, nous proposons dans ce chapitre, les fondements théoriques d'une approche innovante qui a acquis la validation de la méthode ainsi que l'estimation de l'incertitude en même temps sans faire référence à des efforts ou des essais supplémentaires. Une stratégie graphique, nommée le profil d'incertitude, a été développée à cet égard. Elle a l'avantage de faciliter la prise de décision basée sur l'interprétation graphique très simple et visuelle qui ne s'embarrasse pas de tests statistiques toujours délicats à décrypter. Son principe consiste à utiliser des critères de validation (justesse, répétabilité...) mesurés en condition de fidélité intermédiaire pour obtenir les limites des intervalles de tolérance de type (β, γ -content) dans le but d'estimer l'incertitude de mesure. En fait, cet outil utilise le concept de l'incertitude pour évaluer la performance des méthodes analytiques.

II. CONCEPT D'INCERTITUDE DE MESURE

Il est généralement accepté parmi les analystes qu'une interprétation correcte des résultats de mesure (également appelée mesurande) nécessite une estimation fiable de leur incertitude [42, 43]. En effet, comme l'illustre la Figure II.1, la comparaison d'un résultat avec des spécifications de produit ou des seuils réglementaires est différente lorsqu'on considère l'incertitude de mesure. Pour le cas (a) de la Figure II.1, l'incertitude de mesure n'est pas prise en compte, le résultat reste

acceptable (dans la limite de spécification ou légale), dans le cas où une petite incertitude est observée (b), le résultat est acceptable et le produit peut être considéré avec suffisamment de confiance comme conforme, tandis que dans le cas (c), l'incertitude est trop importante pour que les résultats et le produit ne soient pas conformes.

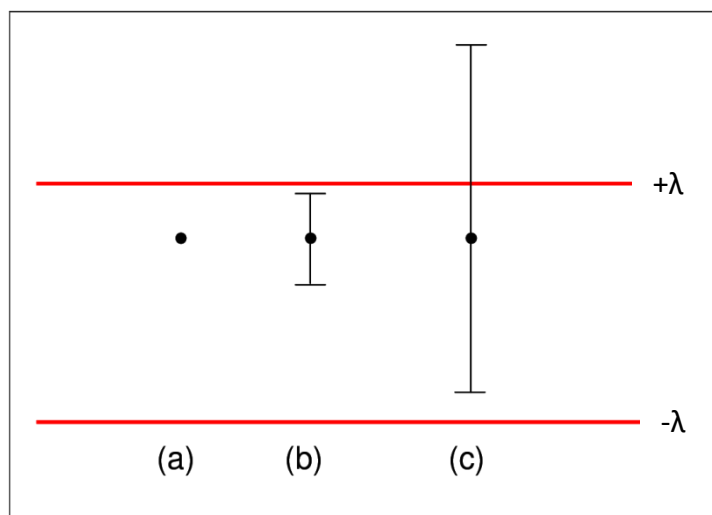


Figure II.1 : Comparaison d'un résultat (point noir) avec et sans son incertitude de mesure (barres verticales) à des limites d'acceptabilité ($\pm\lambda$).

Bien qu'importante, la détermination de l'incertitude n'est pas évidente. Deux approches principales pour estimer ce paramètre dans les mesures analytiques sont proposées :

- L'approche ISO 98-3 [41] également appelée «bottom-up» publiée dans le Guide d'incertitude de mesure (GUM) [44]; Ce guide a été adapté par EURACHEM [45] pour l'analyse chimique.
- Celui présenté par le Comité des Méthodes Analytiques communément appelé «top-down» et utilisant des études inter-laboratoires [42].

1. L'approche ISO 98-3 "bottom-up"

L'approche ISO 98-3 ou GUM a été initialement proposée pour quantifier l'incertitude dans les mesures physiques. Il est basé sur l'identification, la quantification et la combinaison de toutes les sources d'incertitude sur la mesure. Bien que l'approche ISO améliore la connaissance de la procédure de mesure, la difficulté de l'appliquer dans les mesures chimiques entrave son utilisation répandue. Ce document GUM propose l'approche de propagation des erreurs pour estimer l'incertitude du résultat final de mesure. Le processus analytique est divisé en ses composants (Matériel, Méthode, Milieu, Moyen et Main d'œuvre). Les incertitudes liées à ces composants sont

quantifiées séparément sous la forme d'un écart-type puis combinées dans une incertitude globale. Cependant, comme ces composantes d'incertitude sont influencées par divers paramètres, elles peuvent être divisées davantage. Pour les situations plus complexes, les diagrammes de cause à effet facilitent la décomposition des composantes d'incertitude. Cette approche n'est généralement pas acceptée comme le moyen le plus approprié et le plus pratique pour évaluer l'incertitude liée à un résultat de mesure en chimie analytique [46, 47].

La procédure généralisée pour l'évaluation de l'incertitude en chimie analytique basée sur l'approche ISO 98-3 consiste en 4 étapes [45, 48]:

a) Spécification du mesurande

La spécification du mesurande contient à la fois une déclaration claire et non ambiguë du sujet de mesure et une expression quantitative de la relation entre le mesurande et les paramètres (autres mesurandes ainsi que constantes et quantités, qui ne peuvent être mesurées directement) dont elle dépend.

b) Identification des sources d'incertitude

L'identification des sources d'incertitude commence généralement par l'expression de base utilisée pour calculer le mesurande à partir de valeurs intermédiaires. Toutes ces valeurs intermédiaires sont des sources potentielles d'incertitude, mais une identification complète devrait également tenir compte d'autres paramètres qui n'influencent qu'indirectement sur le calcul du mesurande, comme le temps ou la température utilisés pour une certaine étape du processus analytique. L'ensemble du processus analytique doit prendre en compte les sources d'incertitude, y compris le stockage, la préparation, la séparation, la sélection de la fonction de réponse, mais aussi les incertitudes dues à l'arrondissement lors du calcul du résultat de mesure.

c) Quantification des composants d'incertitude

Pour chaque source potentielle d'incertitude identifiée à l'étape (b), l'ampleur de l'incertitude doit être mesurée ou estimée. Selon le GUM [44], les contributions des différentes composantes de l'incertitude doivent être évaluées séparément, en utilisant des mesures répétées (évaluation de type A) ou d'autres méthodes (évaluation de type B). Le GUM ne privilégie pas explicitement l'un des types d'évaluation par rapport à l'autre. Si l'incertitude est dérivée dans une évaluation de type A, l'erreur-type expérimentale sur la moyenne est utilisée comme estimateur de l'incertitude de cette composante. Pour une évaluation de type B, le GUM suggère de prendre en compte les

données de mesure précédentes, l'expérience avec le matériel pertinent (MRC) et les instruments, les spécifications du fabricant, les données fournies lors d'étalonnage, les autres certificats ou incertitudes attribués aux données de référence tirées des manuels.

d) Calcul de l'incertitude combinée

Les contributions d'incertitude évaluées à l'étape (c) doivent toutes être exprimées sous la forme d'un écart-type. L'approche de propagation des erreurs est ensuite appliquée pour combiner les différentes composantes à l'incertitude-type combinée, $u(Z)$.

2. Les approches "top-down" ou descendantes

2.1. Approche inter-laboratoires

Comme méthode alternative pour mesurer l'incertitude liée à chaque composant d'un résultat de mesure chimique, le Comité des Méthodes Analytiques de la Royal Society of Chemistry (AMC) a proposé une approche descendante, basée sur des données de précision évaluées dans une étude inter-laboratoires [42]. Dans cette approche, le laboratoire est vu à partir d'un niveau supérieur et ainsi les erreurs systématiques et aléatoires dans un laboratoire deviennent des erreurs aléatoires lorsqu'elles sont considérées de ce point de vue.

2.2. Approche basée sur la validation analytique

L'incertitude peut également être dérivée des données de validation. Lors de la validation d'une méthode analytique, la justesse et la fidélité sont testées. Les résultats de ce processus de validation pourraient être utilisés pour faire une déclaration d'incertitude [48-52]. Hund et al. [53] ne considèrent que la fidélité intermédiaire pour estimer l'incertitude de mesure, qui contient la répétabilité et l'effet entre les séries. D'autres approches fondées sur des données de validation ont également été proposées en utilisant la méthodologie du profil d'exactitude [50, 51]. En effet, Feinberg et al. [50] ont montré la relation entre la validation et l'incertitude de mesure. Un autre élément de validation de la méthode qui a pris de l'importance dans l'estimation de l'incertitude est l'évaluation de la fidélité, la plupart du temps réalisée avec des expériences de récupération [54].

2.3. Approche basée sur la robustesse

Les études de robustesse peuvent être considérées comme imitant ou simulant des études inter-laboratoires. En effet, chaque expérience de l'étude de robustesse peut être considérée comme un «laboratoire» et la variance globale observée est une estimation de la variance inter-laboratoire

de reproductibilité [53, 55]. Cette approche est intéressante car il n'est pas nécessaire de mettre en œuvre une étude collaborative complète. Il a été montré que l'incertitude estimée par les études de robustesse est en bon accord avec l'incertitude estimée par des études inter-laboratoires [56]. Barwick et al., [48] ont également proposé une méthodologie détaillée pour inclure les données de robustesse dans l'estimation de l'incertitude globale.

3. Expression de l'incertitude

Enfin, l'incertitude de mesure peut être exprimée sous deux formes. L'écart-type obtenu dans l'évaluation de l'incertitude peut être considéré, ce que l'on appelle l'incertitude-type combinée $u(Z)$. L'incertitude élargie $U(Z)$ définit un intervalle autour du résultat d'une mesure $Z \pm U(Z)$ avec $U(Z) = ku(Z)$. Le facteur k est appelé le facteur de couverture. En général, $k = 2$, de sorte que l'incertitude élargie est grossièrement équivalant à la moitié de la longueur d'un intervalle de confiance à 95%, on peut donc s'attendre à ce que le vrai résultat se situe avec une confiance de 95% dans l'intervalle : $Z \pm U(Z)$.

III. NOTIONS DE INCERTITUDE Vs. ERREUR TOTALE

1. Relation entre Incertitude et Erreur

Depuis de nombreuses années, le concept d'erreur a été utilisé pour évaluer les performances quantitatives des procédures analytiques. L'erreur est généralement séparée en deux types : une composante systématique et une composante aléatoire. Dans ce contexte, la méthodologie commune consiste à étudier les caractéristiques de performance des méthodes analytiques telles que la justesse et la fidélité [57]. Les méthodes analytiques sont ensuite déclarées conformes à leurs objectifs si chacun de ces critères est jugé acceptable. Néanmoins, les analystes ont observé que ces méthodologies communes utilisées pour évaluer les critères de performance des méthodes n'étaient pas suffisantes pour garantir des résultats fiables [33, 58-60]. Le risque de telles approches est que l'erreur totale peut être inacceptable même si, à l'issue d'une évaluation séparée de ses composantes, elles semblent acceptables [58, 61].

Cependant, depuis 1993, le concept d'incertitude de mesure a été introduit principalement par le GUM [44]. Le principal écueil du concept d'erreur est que la valeur vraie n'est jamais parfaitement connue et donc l'erreur, définie comme la différence entre un résultat et sa vraie valeur n'est jamais atteignable. Le concept d'incertitude de mesure permet de prendre en compte toutes les sources d'incertitude, y compris celle qui résulte de la valeur vraie supposée, de la valeur

vraie conventionnelle ou de la valeur de référence. Une autre différence est qu'il est supposé dans le concept d'incertitude que toutes les sources d'influences systématiques ont été éliminées [44].

Habituellement, pour les méthodes analytiques, pour obtenir une estimation de toutes les sources d'incertitude de mesure et de toutes les sources d'influences systématiques, il faut une combinaison bien pensée d'approche ascendante (bottom-up) et d'approche descendante (top-down). De plus, l'élimination de toutes les sources d'influences systématiques est rarement réalisable pour les méthodes analytiques, et leurs effets doivent ensuite être inclus dans l'évaluation globale de l'incertitude de mesure [62-66]. Par conséquent, à une étape finale, et quelle que soit l'approche ou la combinaison d'approches utilisées, les effets aléatoires et les effets systématiques devront être combinés ensemble pour obtenir une estimation globale adéquate de l'incertitude de mesure. Cette incertitude finale obtenue permettra d'évaluer l'adéquation de l'objectif des méthodes analytiques requises par exemple par les normes ISO 17025 [5] ou ISO 15189 [40]. Il y a donc de plus en plus d'applications faisant référence au concept d'incertitude de mesure globale pour évaluer la fiabilité des résultats générés par des méthodes analytiques.

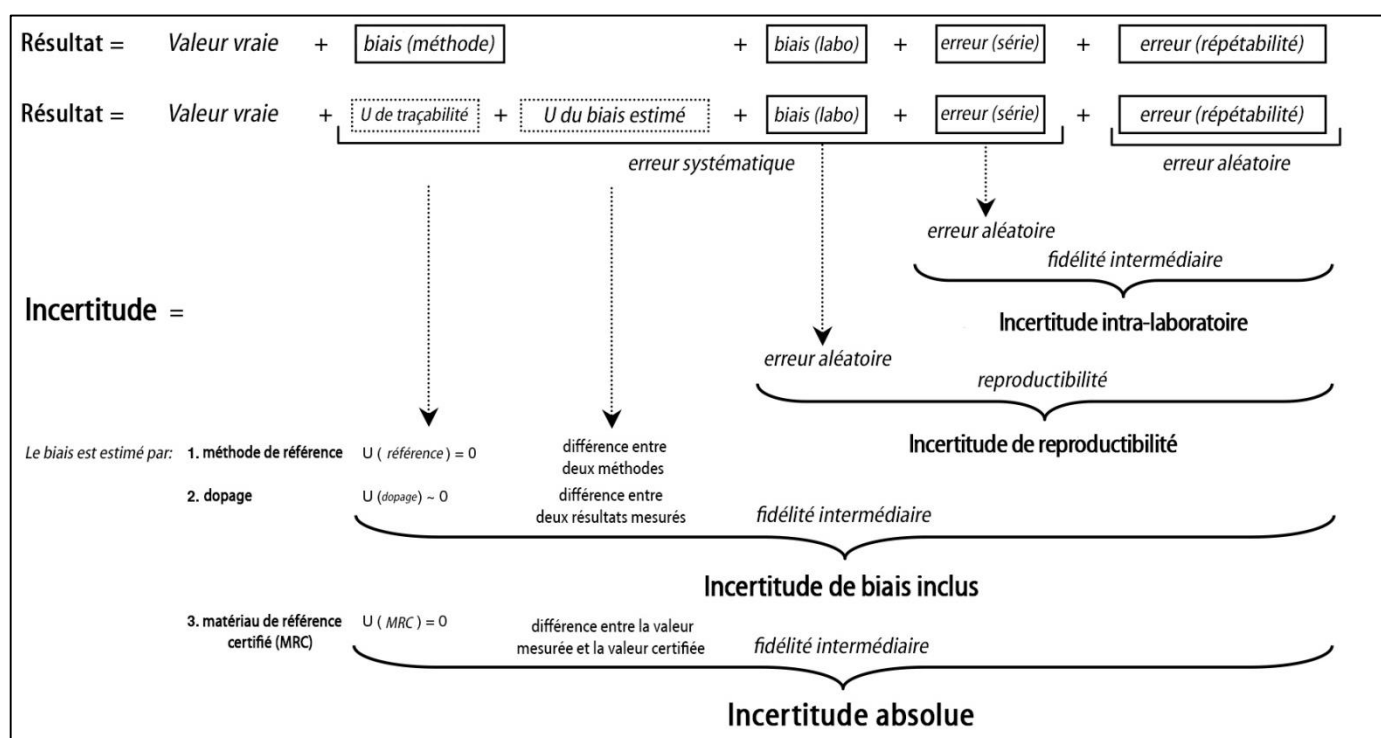


Figure II.2 : Composition de l'erreur d'un résultat analytique liée à l'incertitude de mesure [67].

2. Différentes sources de l'incertitude

Comme l'illustre la Figure II.2, l'erreur d'un résultat analytique pour une concentration d'analyte spécifiée comprend différentes composantes, formant ensemble «l'échelle des erreurs» :

- le biais de la méthode, une erreur systématique associée à la méthode en tant que telle ;
- le biais de laboratoire, qui est soit une erreur systématique - si le laboratoire est considéré seul, soit une erreur aléatoire - si le laboratoire est considéré comme faisant partie d'un groupe, comme c'est le cas dans les études inter-laboratoires ;
- l'erreur de la série, considérée comme une erreur systématique pour une série seule et comme une variation aléatoire pour plusieurs séries dans une étude intra-laboratoire ;
- l'erreur de répétabilité, qui est une erreur aléatoire provenant des mesures répétées effectuées au cours d'une même série [62].

Comme l'erreur considérée ne s'applique qu'à une concentration spécifiée d'analyte isolée à partir d'un échantillon ou d'une matrice spécifique, les erreurs d'échantillonnage et les effets de variation de matrice ne sont pas inclus ici [68].

La distinction plus traditionnelle entre les composantes d'erreur se situe entre les erreurs aléatoires et les erreurs systématiques. Dans cette approche classique, les erreurs aléatoires sont généralement appelées «fidélité» (répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité), tandis que les erreurs systématiques sont généralement attribuées à l'incertitude sur l'estimation du biais et l'incertitude d'étalonnage. À cette classification, s'ajoutent d'autres contributions d'incertitude, telles que les effets d'échantillonnage, les effets de matrice et les incertitudes associées à certaines hypothèses qui sous-tendent la méthode de mesure et/ou l'équation de calcul [69].

Comme mentionné ci-dessus, chacune de ces composantes d'erreur est une source potentielle d'incertitude. Selon les conditions dans lesquelles l'analyse est effectuée, différentes sources d'incertitude contribuent à l'incertitude globale. Hund et al. [62] ont introduit différentes définitions opérationnelles de l'incertitude, en fonction du nombre et du type de sources d'incertitude considérées (Figure II.2) :

- Incertitude intra-laboratoire, dérivée de la fidélité intermédiaire et incluant uniquement l'erreur de répétabilité et l'erreur de série ;
- Incertitude de reproductibilité, dérivée de la reproductibilité (essais inter-laboratoires) et prise en compte : l'erreur de répétabilité, de la série et les effets de laboratoire ;
- Incertitude incluse dans le biais et l'incertitude absolue tiennent également compte du biais de la méthode, qui est la source d'incertitude la plus importante car elle renvoie à une référence ou à une norme à laquelle la méthode est considérée comme traçable. Si la méthode de travail n'est pas une méthode primaire - qui est traçable aux unités SI.

IV. PROFIL D'INCERTITUDE

Ce paragraphe a l'ambition de présenter une nouvelle stratégie pour évaluer la performance des procédures analytiques quantitatives développée dans le cadre de ce travail de doctorat. Notre objectif principal est surtout de rejoindre deux concepts importants à savoir la validation et l'incertitude, pour élaborer une procédure servant à vérifier si une méthode est bien adaptée à ses objectifs. A cette fin, nous avons introduit, un outil décisionnel graphique à la fois simple et efficace appelé profil d'incertitude. Cet outil utilise la notion de l'incertitude basée sur l'erreur totale pour évaluer la performance des méthodes analytiques. Tout aussi important, la stratégie proposée permet une bonne estimation de l'incertitude de mesure en utilisant les données de la validation sans avoir recours à d'autres expériences supplémentaires. Et comme, le profil d'incertitude est basé sur les statistiques de l'intervalle de tolérance de type « β, γ -content », nous avons ainsi proposé trois différentes méthodes pour son calcul et pour le calcul de l'incertitude de mesure.

1. β, γ -Content tolérance intervalle

Cette section est consacrée à exposer et à discuter les modalités de calcul du β, γ -content tolérance intervalle bilatéral toujours dans le cas d'une ANOVA équilibrée à un seul effet aléatoire (One-Way ANOVA Random Model) en utilisant trois méthodes différentes :

1.1. Approximation de Satterthwaite

Les intervalles de tolérance bilatéraux de type « β, γ -content » que nous allons construire sont fonctions de $\bar{Y}$, $\hat{\sigma}_b^2$ et $\hat{\sigma}_e^2$. Ils ont la forme suivante :

$$\bar{Y} \pm k\hat{\sigma}_m \quad (II.1)$$

Où :

$$\hat{\sigma}_m^2 = \hat{\sigma}_b^2 + \hat{\sigma}_e^2 \quad (II.2)$$

Et, k est le facteur de tolérance à déterminer. Ainsi, k doit satisfaire la condition suivante :

$$P_{\bar{Y}, \hat{\sigma}_b^2, \hat{\sigma}_e^2} \left\{ P_Y \left[\bar{Y} - k\hat{\sigma}_m < Y < \bar{Y} + k\hat{\sigma}_m \mid \bar{Y}, \hat{\sigma}_m \right] \geq \beta \right\} = \gamma \quad (II.3)$$

Avec β et γ sont respectivement la proportion minimale et le niveau de confiance de la population contenue entre les limites bilatérales.

Pour calculer le facteur k , Mee [38] a adopté l'approximation de Satterthwaite:

$$\frac{\hat{\sigma}_m^2}{\sigma_m^2} \sim \frac{\chi_f^2}{f} \quad (II.4)$$

Avec :

$$f = \frac{(R+1)^2}{(R+n^{-1})^2 / (a-1) + (1-n^{-1}) / (an)} \quad (II.5)$$

Ainsi, l'équation (II.3) prend la forme suivante :

$$P_{Z, \chi_f^2} = \left[\Phi \left(\frac{Z}{\sqrt{anR_0}} + k \sqrt{\frac{\chi_f^2}{f}} \right) - \Phi \left(\frac{Z}{\sqrt{anR_0}} - k \sqrt{\frac{\chi_f^2}{f}} \right) \geq \beta \right] = \gamma \quad (II.6)$$

$\Phi(\cdot)$ désigne la fonction de distribution normale standard et Z est une variable normale standardisée.

Puisque R est inconnue, R^* est utilisé à sa place selon la formule suivante :

$$R^* = \max[0, (F \cdot F_\eta - 1)/n] \quad (II.7)$$

Où F est le rapport MS_b / MS_e et F_η est le percentile 100η d'une distribution F avec $\nu_1 = a(n-1)$ et $\nu_2 = (a-1)$. Toutefois, les valeurs recommandées de η proposées par Mee [38] sont 0.85, 0.905 et 0.975, correspondant à $\gamma = 0.90, 0.95$ et 0.99 , respectivement. Alors k est calculé à partir de :

$$P_{Z, \chi_f^2} = \left[\Phi \left(\frac{Z}{\sqrt{anR_0^*}} + k \sqrt{\frac{\chi_f^2}{f}} \right) - \Phi \left(\frac{Z}{\sqrt{anR_0^*}} - k \sqrt{\frac{\chi_f^2}{f}} \right) \geq \beta \right] = \gamma \quad (II.8)$$

L'estimation de k nécessite la résolution de cette intégrale :

$$\sqrt{\frac{2}{\pi h}} \int_0^\infty P_L(L \geq \frac{\chi_{1;\beta}^2(x^2)}{k^2}) e^{\frac{-x^2}{2h}} dx = \gamma \text{ avec } h = \frac{1}{anR_0^*} \text{ et } L = \frac{\chi_f^2}{f} \quad (II.9)$$

Où $\chi_{\nu;\alpha}^2(\tau)$ désigne le α quantile d'une distribution khi-carré non centrée avec ν degré de liberté et τ comme paramètre de non-centralité.

Une approximation de k , appelé k_s qui satisfait l'intégrale ci-dessus est donnée par :

$$k_s \simeq \sqrt{\frac{f^* \chi_{1;\beta}^2(h)}{\chi_{f^*,1-\gamma}^2}} \quad (II.10)$$

Il faut noter que f^* et R_0^* sont des estimations de f et R_0 obtenue par le remplacement de R par R^* .

Enfin, le β, γ -content tolérance intervalle bilatéral est fourni par :

$$\bar{Y} \pm k_s \hat{\sigma}_m \quad (II.11)$$

1.2. Simulation de Monte Carlo

Afin d'estimer le β, γ -content tolérance intervalle, Lin et al. [39] ont adopté le même concept utilisé pour le calcul de β -expectation tolérance intervalle. Leur procédure consiste, toujours que l'intervalle de tolérance prend la forme suivante :

$$\bar{Y} \pm D \quad (II.12)$$

Avec D est la marge d'erreur statistique à déterminer. La condition à remplir par D est la suivante :

$$P_{\bar{Y}, \hat{\sigma}_b^2, \hat{\sigma}_e^2} \left\{ P_Y \left[\bar{Y} - D < Y < \bar{Y} + D \mid \bar{Y}, \hat{\sigma}_m \right] \geq \beta \right\} = \gamma \quad (II.13)$$

Nous définissons :

$$\sigma_1^2 = \sigma_b^2 + \sigma_e^2 \quad \text{et} \quad \sigma_2^2 = \frac{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{an} \quad (II.14)$$

D'après l'équation (II.14) nous pouvons écrire :

$$\sigma_1^2 + \sigma_2^2 = \left(1 + \frac{1}{a}\right) \frac{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{n} + \left(1 - \frac{1}{n}\right) \sigma_e^2 \quad (II.15)$$

Pour calculer D , il faut déterminer la limite de confiance supérieure pour $\sigma_1^2 + \sigma_2^2$ en utilisant le concept de l'intervalle de confiance pivotale généralisé et la simulation de Monte Carlo.

L'algorithme suivant peut être utilisé pour calculer la marge d'erreur statistique D et, par conséquent, pour estimer l'intervalle de tolérance de type (β, γ -content) bilatéral.

Algorithme 3.

- i. A partir des données de validation, calculer les valeurs observées $\bar{Y}$, ss_b et ss_e ;
- ii. Soit M désigne le nombre de simulations. Pour $i = 1, 2, \dots, M$, effectuez les étapes suivantes :
- iii. Générer les variables aléatoires indépendantes

$$U_{b,i}^2 \sim \chi_{a-1}^2 \quad \text{et} \quad U_{e,i}^2 \sim \chi_{a(n-1)}^2$$

iv. calculer

$$D_{1,i} = \frac{\left(\frac{1}{n}\right)\left(1 + \frac{1}{a}\right)ss_b}{U_{b,i}^2} + \frac{\left(1 - \frac{1}{n}\right)ss_e}{U_{e,i}^2}$$

Le γ quantile des $D_{1,i}$ valeur donne une estimation de la limite supérieure γ de confiance pour $\sigma_1^2 + \sigma_2^2$. La racine carrée de cette limite de confiance multiplié par $Z_{(1+\beta)/2}$ fournit la marge d'erreur statistique D nécessaire pour le calcul du β, γ -content tolérance intervalle.

1.3. Procédure MLS

Hoffman et Kringle [70] ont investi une autre stratégie basée sur la procédure MLS (Modified Large Simple) pour calculer β, γ -content tolérance intervalle dans le cas d'une ANOVA équilibrée et non-équilibrée à un seul effet aléatoire (balanced and unbalanced one-way random models).

Pour illustrer cette méthodologie dans le cas d'une ANOVA 1 équilibrée, nous définissons :

$$\sigma_1^2 = \sigma_b^2 + \sigma_e^2 \text{ et } \sigma_2^2 = \frac{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{an} \quad (II. 16)$$

Ainsi, nous pouvons écrire :

$$\sigma_1^2 + \sigma_2^2 = \left(1 + \frac{1}{a}\right)\frac{n\sigma_b^2 + \sigma_e^2}{n} + \left(1 - \frac{1}{n}\right)\sigma_e^2 \quad (II. 17)$$

La limite de confiance supérieure de $\sigma_1^2 + \sigma_2^2$ en utilisant la procédure MLS est donnée par :

$$S = \left[\left(1 + \frac{1}{a}\right)\frac{n\hat{\sigma}_b^2 + \hat{\sigma}_e^2}{n} + \left(1 - \frac{1}{n}\right)\hat{\sigma}_e^2 \right] + \left[\left(1 + \frac{1}{a}\right)^2 \frac{(n\hat{\sigma}_b^2 + \hat{\sigma}_e^2)^2}{n^2} \left(\frac{a-1}{\chi_{a-1;1-\gamma}^2} - 1 \right)^2 + \left(1 - \frac{1}{n}\right)^2 \hat{\sigma}_e^4 \left(\frac{a(n-1)}{\chi_{a(n-1);1-\gamma}^2} - 1 \right)^2 \right]^{0.5} \quad (II. 18)$$

Le β, γ -content tolérance intervalle bilatéral pour un niveau de confiance γ est fourni par :

$$\bar{Y} \pm Z_{(1+\beta)/2} \sqrt{S} \quad (II. 19)$$

2. Nouvelle stratégie pour l'estimation de l'incertitude de mesure

Ce paragraphe propose d'exposer notre nouvelle démarche pour l'estimation de l'incertitude de mesure à partir des données issues de la validation analytique. En effet, en considérant le

protocole LGC/VAM et les recommandations du guide ISO/DTS 21748 [71], le modèle de base qui formule l'incertitude d'un mesurande Z est :

$$u^2(Z) = S_R^2 + u^2(\hat{\delta}) + \sum c_i^2 u^2(x_i) \quad (II.20)$$

Avec :

S_R : la reproductibilité de la méthode ;

$u(\hat{\delta})$: l'incertitude associée au biais de la méthode ;

$\sum c_i^2 u^2(x_i)$: la somme de tous les effets de déviations.

Feinberg a proposé d'estimer l'incertitude de mesure en se basant sur le concept de profil d'exactitude [72]. Pour cela, il a ignoré le troisième terme de l'équation (II.20), l'incertitude prend donc la forme suivante :

$$u^2(Z) = S_R^2 + u^2(\hat{\delta}) \quad (II.21)$$

D'une part, si on considère la construction du profil d'exactitude en utilisant le β -expectation tolérance intervalle, calculé par la méthode de Mee. On peut écrire que :

$$\bar{Y} \pm t(v)k\hat{\sigma}_m \quad (II.22)$$

Ainsi, on peut vérifier facilement que :

$$u^2(Z) = k^2 \hat{\sigma}_m^2 \quad (II.23)$$

Par conséquent, le modèle mathématique qui rassemble l'incertitude de mesure et l'intervalle de tolérance est exprimé par :

$$\bar{Y} \pm t(v)u(Z) \quad (II.24)$$

Si on développe l'équation (II.24), on écrit que :

$$U = \bar{Y} + t(v)u(Z) \quad (II.25)$$

Et

$$L = \bar{Y} - t(v)u(Z) \quad (II.26)$$

Avec :

U : la limite de tolérance supérieure ;

L : la limite de tolérance inférieure.

Finalement, l'incertitude du mesurande Z sera exprimée de la manière suivante :

$$u(Z) = \frac{U - L}{2t(v)} \quad (II.27)$$

Il y' a lieu de noter que deux scénarios se présente pour estimer l'incertitude en utilisant l'équation (II.27) :

1. Si on considère que l'incertitude de mesure s'exprime selon l'équation (II.20), alors les limites [L, U] sont calculées en utilisant le β -expectation tolérance intervalle ; avec $t(\nu)$ est $(1+\beta)/2$ quantile de la distribution t de Student avec ν degré de liberté.
2. Si on considère que l'incertitude de mesure s'exprime selon l'équation (II.21), cela veut dire de prendre en compte d'autres sources d'erreurs qui affecte le mesurande, alors les limites [L, U] sont calculées en utilisant le β, γ -content tolérance intervalle ; avec $t(\nu)$ est $(1 + \gamma)/2$ quantile de la distribution t de Student avec ν degré de liberté.

Le nombre de degré de liberté est calculé en utilisant l'approximation de Satterthwaite :

$$\nu = \frac{(\hat{R} + 1)^2}{(\hat{R} + n^{-1})^2 / (a - 1) + (1 - n^{-1}) / (an)} \quad (II.28)$$

Avec :

$$\hat{R} = \max \left[0, \left(\frac{MS_b}{MS_e} - 1 \right) \frac{1}{n} \right] \quad (II.29)$$

Par conséquent, nous proposons l'équation suivante pour construire le profil de l'incertitude afin de l'utiliser comme outil de décision pour la validation des méthodes analytiques.

$$|\bar{Y} \pm ku(Z)| < \lambda \quad (II.30)$$

Avec k est le facteur de couverture. Le choix du facteur k est basé sur le niveau de confiance désiré.

Pour un niveau de confiance approximatif de 95%, $k = 2$.

Également, nous pouvons exprimer le profil de l'incertitude en termes d'erreur par l'équation suivante :

$$|biais \pm ku(Z)| < \lambda \quad (II.31)$$

V. PROCEDURE DE CONSTRUCTION DU PROFIL D'INCERTITUDE

Le profil d'incertitude est un outil décisionnel graphique à la fois simple et efficace dont l'objectif principal est surtout de rassembler deux concepts importants à savoir la validation analytique et l'incertitude de mesure, pour élaborer une stratégie globale servant à vérifier si une méthode analytique est bien adaptée à ses objectifs. A cette fin, cette approche décisionnelle graphique a été introduite pour aider les analystes à tester d'une manière efficace la validité de leurs résultats et de mieux estimer l'incertitude de mesure. En effet, l'examen visuel du graphique

permet de sélectionner le modèle de régression le plus approprié pour l'étalonnage, de déterminer les limites de quantification et ensuite de choisir l'intervalle de dosage. Cet outil utilise la notion de l'incertitude pour évaluer la performance des méthodes analytiques. Tout aussi important, l'approche proposée permet une bonne estimation de l'incertitude de mesure en utilisant les données de la validation sans avoir recours à d'autres expériences supplémentaires.

La mise en pratique de cette stratégie de validation peut être atteinte selon les étapes suivantes :

- Choisir des limites d'acceptabilité appropriées en tenant compte de l'utilisation prévue de la méthode ;
- Générer tous les modèles d'étalonnage possible, en utilisant les données de calibration ;
- Calculer les concentrations prédites de tous les standards de validation en fonction du modèle de calibration sélectionné ;
- Calculer les β, γ -content tolérance intervalles bilatéraux pour chaque niveau, selon l'une des trois méthodes statistiques proposées ;
- Déterminer l'incertitude pour chaque niveau en utilisant l'équation (II.27) ;
- Construire le profil de l'incertitude conformément à l'équation (II.31) et établir le graphique 2D comme fonction de la concentration, les limites d'acceptabilité et de l'incertitude ;
- Comparer l'intervalle d'incertitude avec les limites d'acceptabilité $(-\lambda, \lambda)$;
- Si l'intervalle d'incertitude tombe totalement dans $(-\lambda, \lambda)$, la méthode est acceptée, sinon, la méthode n'est pas valide.

1. Démarches pratiques

1.1. Plans expérimentales d'étalonnage et de validation

Le plan expérimental doit être choisi de manière à respecter les conditions de fidélité intermédiaire, en effectuant les mesures par séries en tenant compte de diverses sources d'incertitude. Le plus souvent, une série est équivalente à un jour, ce qui permet de prendre en compte un certain nombre de sources d'incertitude : évolution des échantillons, changements d'opérateurs, changement des étalonnages, évolution des réactifs, modification des réglages instrumentaux, etc... Il faut ensuite fixer le nombre de séries (jours) de mesures, le nombre de répétitions par niveau et par jour, et le nombre de niveaux de concentration. Ces choix dépendent non seulement de contraintes statistiques, mais également pratiques et économiques. Par exemple, le nombre de jours de travail va dépendre de la stabilité de l'échantillon ; la durée de préparation

de l'échantillon et le temps d'analyse vont influencer le nombre de répétitions. Une fois le plan expérimental de validation est défini, en connaissance du coût d'une analyse, le coût de la validation et sa durée peuvent être évalués. Les quantités nécessaires d'échantillons et un calendrier des analyses à réaliser peuvent ainsi être planifiés.

Pour les méthodes indirectes, la phase de validation est précédée par celle d'étalonnage. Ce dernier a pour objectif de permettre l'estimation des coefficients du modèle de la courbe d'étalonnage. Il n'est obligatoire que pour les méthodes indirectes qui requièrent un étalonnage pour réaliser la quantification. Dans le cas des méthodes directes la quantification se fait sans étalonnage, souvent par une pesée, l'analyte étant défini par la méthode. Les standards d'étalonnage (SE) et le dispositif expérimental utilisé (nombre de niveaux d'étalonnage, de répétitions par niveau et l'étendue du domaine d'étalonnage) doivent refléter le plus exactement possible ce qui sera fait en routine.

Le nombre de niveaux et de répétitions pour le plan d'étalonnage peut différer de celui du plan de validation. En revanche, le nombre de séries doit être identique à celui du plan de validation puisque l'on va vérifier sur plusieurs jours si la méthode est capable de quantifier de la même façon dans le temps les échantillons de validation. Le nombre de niveaux est fixé suivant le modèle d'étalonnage étudié durant le développement de la méthode.

1.2. Fonction de réponse

Une fois les expériences réalisées et les données collectées, il convient tout d'abord de déterminer, sur la base des standards d'étalonnage (SE), la relation entre la réponse (signal ou réponse de l'instrument) Y et la quantité (concentration) X . Cette relation se caractérise à l'aide d'une fonction qui doit être strictement monotone (strictement croissante ou décroissante) sur l'intervalle de dosage envisagé.

Deux familles de fonctions se dégagent de cet ensemble : les fonctions dites linéaires en leurs paramètres et les fonctions non linéaires. Une fonction est dite linéaire si elle est une combinaison linéaire de ses paramètres. On peut noter que la fonction quadratique, bien que sa représentation graphique ne soit pas droite, est effectivement linéaire en ses paramètres. Si ce n'est pas le cas, comme dans le cas des fonctions logistiques, la fonction est dite non linéaire en ses paramètres. La façon d'ajuster ces fonctions de réponse dépend de cette distinction.

Différentes fonctions de réponse peuvent être envisagées lors de la validation de la méthode, comme illustré dans le Tableau II.1. Le choix dépend du type de méthode (méthode physicochimique, bioanalytique, immuno-dosage, etc.).

Des transformations mathématiques pourraient être introduites. Par exemple, le logarithme népérien ou la racine carrée pourrait être appliquée à la concentration X ainsi qu'à la réponse Y . Il est cependant recommandé de n'appliquer ce type de transformation qu'avec les modèles linéaires du Tableau II.1.

Fonction de réponse	Equation	Paramètre	Linéarité
Fonction d'une droite passant par l'origine	$Y = bX$	b	Oui
Fonction linéaire	$Y = bX + a$	b et a	Oui
Fonction quadratique	$Y = cX^2 + bX + a$	c, b et a	Oui
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = a + \frac{d - a}{1 + \left(\frac{X}{c}\right)^b}$	a, b, c et d	Non
Fonction logistique à 5 paramètres	$Y = a + \frac{d - a}{\left[1 + \left(\frac{X}{c}\right)^b\right]^h}$	a, b, c, d et h	Non

Tableau II.1 : Exemples de fonctions de réponse.

1.2.1. Ajustement des fonctions de réponse

Deux hypothèses de travail sont en théorie requises : la normalité de la réponse à chaque niveau de concentration et l'homogénéité des variances (homoscédasticité) des réponses dans l'intervalle des concentrations choisies. En théorie seulement, parce que ce qui nous intéresse est la qualité des prédictions inverses (ou valeurs calculées en retour) plutôt que la qualité de l'ajustement, on préférera un modèle donnant de bons résultats plutôt qu'un modèle présentant de bonnes qualités d'ajustement.

Il est possible que les transformations mathématiques règlent le problème de normalité. Dans ce cas, seules les différences en exactitude obtenues entre les différentes transformations permettront de décider de l'adéquation de la transformation. Il en va de même à propos de l'homoscédasticité. Sinon, on peut appliquer une approche qui consiste à pondérer chaque terme de la fonction par un poids w qui habituellement est une fonction croissante du niveau de concentration correspondant. Les choix de pondération habituels sont $w = 1/X$ et $1/X^2$. Notons que si $w = 1$, cela est équivalent au cas sans pondération.

1.2.2. Prédiction inverse

Après collecte des données, et détermination du modèle d'étalonnage le mieux adapté à la méthode, on utilise la fonction inverse du modèle d'étalonnage pour transformer les réponses mesurées en concentrations calculées pour chaque mesurage. Ce calcul s'effectue indépendamment pour chaque série de validation, en utilisant les paramètres du modèle correspondant à la série. Il est préférable de s'assurer qu'au sein d'un niveau de concentration, les concentrations sont toutes identiques. Si ce n'est pas le cas, il vaut mieux alors les aligner. Les différentes prédictions inverses, selon les modèles de régression cités, dans le Tableau II.2, s'obtiennent comme suit :

Fonction de réponse	Concentration calculée
$Y = bX$	$X = \frac{Y}{\hat{b}}$
$Y = bX + a$	$X = \frac{Y - \hat{a}}{\hat{b}}$
$Y = cX^2 + bX + a$	$X = \frac{-b + \sqrt{\hat{b}^2 - 4\hat{c}(\hat{a} - Y)}}{2\hat{c}}$

Tableau II.2 : Exemples de prédictions inverses des concentrations introduites selon les fonctions de réponses adoptées.

$\hat{b}$ et $\hat{c}$ représentent respectivement les coefficients des termes de premier et seconde ordre. Si une transformation a été utilisée il ne faut pas oublier d'effectuer la transformation inverse après ce calcul en retour.

1.2.3. Choix de la fonction de réponse

La fonction de réponse joue un rôle crucial dans la validation analytique, telle que l'utilisation de certaines fonctions qui ne permet pas à la procédure analytique d'atteindre ses objectifs en raison de certaines concentrations, les limites d'incertitude sortent des limites d'acceptabilité. Par ailleurs, parmi les fonctions de réponses qui fournissent des résultats ou des limites d'incertitude à l'intérieur des limites d'acceptabilité, on pourra remarquer que certaines fournissent des résultats ou des profils meilleurs que d'autres. Ce seront ces dernières qui devront être retenues.

Nous attirons également l'attention sur le fait, que pour l'ensemble des modèles choisis, le coefficient de détermination (R^2) est très souvent utilisé erronément pour évaluer la qualité du modèle. Une fois de plus nous tenons à souligner ici que ce coefficient n'est pas une indication

fiable de la qualité des résultats que le modèle rendra. En effet, il est largement utilisé dans la pratique et exprime, en réalité, la part de la variabilité des réponses pouvant être expliquées par un modèle de régression. Il est souvent abusivement interprété comme une évaluation de la qualité d'ajustement d'un modèle. A cet effet, il ne sert à rien de s'imposer des contraintes du type $R^2 > 0.99$ qui n'est pas un gage de qualité des résultats obtenus.

1.3. Linéarité

La linéarité s'applique aux résultats (concentration calculée = f (concentrations introduites)), pas aux réponses (signal = f (concentrations introduites)). C'est un prérequis à l'estimation de la justesse. A l'inverse, l'existence d'une relation linéaire entre la concentration estimée et la concentration introduite n'implique pas que la méthode soit juste.

1.4. Justesse

La justesse (ou le biais) de la méthode au niveau de concentration est obtenue en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites (valeur de référence $\hat{\mu}$) et la moyenne des concentrations calculées ($\bar{Y}$). Le biais peut s'exprimer en termes absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites, comme suit :

$$biais = \hat{\mu} - \bar{Y} \quad (II.32)$$

Et

$$biais(\%) = \frac{\hat{\mu} - \bar{Y}}{\bar{Y}} \times 100 \quad (II.33)$$

$$Recouvrement(\%) = \frac{\hat{\mu}}{\bar{Y}} \times 100 \quad (II.34)$$

1.5. Fidélité

La fidélité représente les erreurs dues au hasard ou les erreurs aléatoires. Elle a été estimée en calculant la répétabilité et la fidélité intermédiaire à chaque niveau de concentration utilisée en validation.

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité tandis que la somme des estimations des variances intra- et inter-série donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire :

 Répétabilité

$$\hat{\sigma}_r^2 = \hat{\sigma}_b^2 \quad (II.35)$$

 Fidélité intermédiaire

$$\hat{\sigma}_{FI}^2 = \hat{\sigma}_b^2 + \hat{\sigma}_e^2 \quad (II.36)$$

1.6. Limite de quantification (LQ)

La limite de quantification (LQ) est un critère important très souvent évoqué et utilisé dans l'analyse chimique. Il peut être défini comme la plus petite quantité de mesurande pouvant être quantifiée, avec une exactitude acceptable, dans des conditions expérimentales prédéfinies. En effet, il existe une concentration à partir de laquelle au moins une des bornes de l'intervalle d'incertitude coupe une des limites d'acceptabilité. Selon les règles de décision proposées, la méthode est donc valide puisqu'elle permet de garantir les objectifs fixés. En revanche, en dessous de ce seuil, il n'est plus possible de conclure à la validité. Tout naturellement, on peut proposer de définir ce seuil comme la limite de quantification (LQ) de la méthode.

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

Où :

- *Z* : Les valeurs absolues lues sur l'axe des ordonnées ;
- *X* : Les valeurs de référence fournies par l'axe des abscisses ;
- *X_A* et *X_B* : Les abscisses des deux niveaux *A* et *B* ;
- *X_{At}* et *X_{Bt}* : Ordonnées à l'origine de la limite supérieure (ou inférieure) de l'intervalle d'incertitude.
- *X_{Aa}* et *X_{Ba}* : Ordonnées à l'origine de la limite supérieure (ou inférieure) d'acceptabilité.
- *X_{LQ}* : L'abscisse du point d'intersection, avec $LQ = X_{LQ}$.

Les deux droites peuvent être représentées par un système de deux équations, la première concerne la limite de l'intervalle d'incertitude où t_0 et t_1 représentent l'ordonnée à l'origine et la pente respectivement et la deuxième, dont les paramètres a_0 et a_1 , représente la limite d'acceptabilité.

$$Z = t_0 + t_1 X \quad (II.37)$$

$$Z = a_0 + a_1 X \quad (II.38)$$

Avec a_0 égale 0, car la limite d'acceptabilité passe toujours par zéro.

On obtient la pente t_1 :

$$t_1 = \frac{(Z_{Bt} - Z_{At})}{(X_B - X_A)} \quad (II.39)$$

Pour l'ordonnée à l'origine t_0 :

$$t_0 = Z_{At} - X_A t_1 \quad (II.40)$$

Par analogie :

$$a_1 = \frac{(Z_{Ba} - Z_{Aa})}{(X_B - X_A)} \quad (II.41)$$

Et

$$a_0 = Z_{Aa} - X_A a_1 \quad (II.42)$$

La résolution du système d'équations donne :

$$X_{LQ} = \frac{(a_0 - t_0)}{(t_1 - a_1)} \quad (II.43)$$

2. Interprétation du profil d'incertitude

Le profil d'incertitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes inférieures entre elles et d'autre part les bornes supérieures entre elles comme l'illustre l'exemple de la Figure II.3.

En vue d'utiliser le profil d'incertitude pour valider une méthode, il faut fixer au préalable les critères de décision suivants :

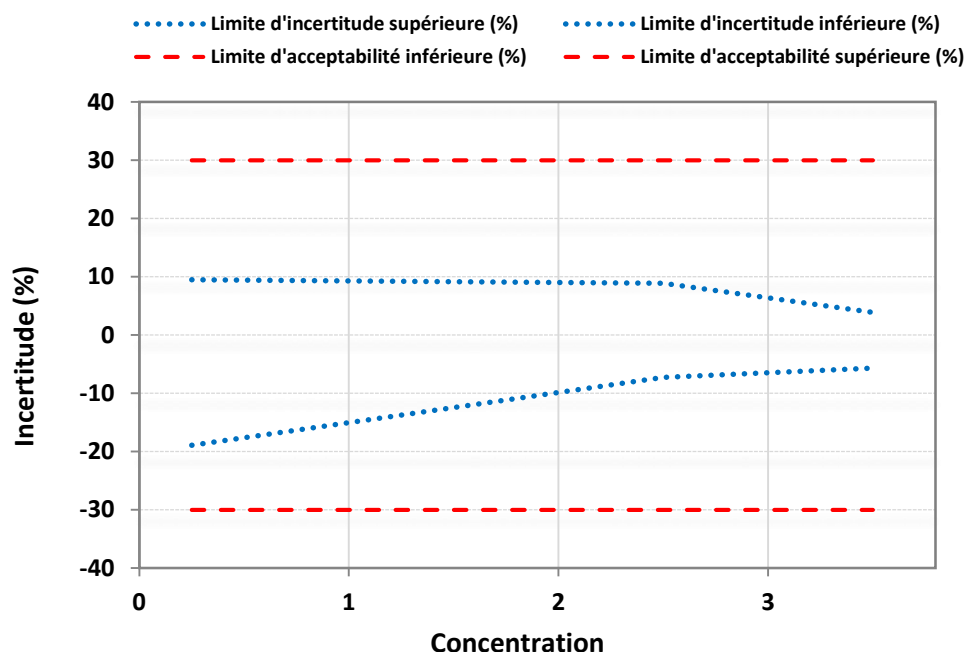


Figure II.3 : Exemple de profil d'incertitude

- **Les limites d'acceptabilité $\pm\lambda$.** Elles servent à traduire les objectifs pratiques des utilisateurs. Elles délimitent un intervalle autour de la valeur de référence. Le plus souvent, ces limites sont réglementaires ou issues de la réglementation. Mais dans le cas où il n'existe pas de référence établie, il convient de prendre en compte les attentes des utilisateurs finaux ou déterminées par consensus des spécialistes ;
- **La proportion β .** Elle représente la proportion de futurs résultats qui seront en moyenne compris dans les intervalles d'incertitude. La valeur choisie pour β dépend largement du champ d'application (contrôle sanitaire, contrôle de fabrication, etc.).
- **Le terme de confiance γ .** Il représente la probabilité d'avoir une proportion β des futurs résultats inclus dans les limites d'acceptabilité. Une valeur de γ égale à 95 % signifie qu'on a une probabilité de 95 % d'avoir la proportion β dans les limites $\pm\lambda$.

La Figure II.3 illustre une situation où toute la partie de l'intervalle d'incertitude est comprise dans les limites d'acceptabilité. En général, si l'intervalle d'incertitude s'insère totalement dans les limites d'acceptabilité, la méthode est acceptée, sinon, la méthode n'est pas valide.

3. Application du profil d'incertitude

Afin de vérifier l'applicabilité de notre approche, nous étions dans l'obligation d'utiliser des données brutes à partir de la bibliographie. Ce choix est justifié par les raisons suivantes :

- Les données utilisées sont fiables et de bonne qualité puisqu'elles sont acceptées par la communauté scientifique et publiées dans des revues indexées.
- Notre objectif principal était de développer et confirmer nos algorithmes statistiques par des données conformes et non pas de développer des méthodes d'analyse.
- En utilisant ces données il est possible de faire des comparaisons entre notre approche et les autres déjà publiées.
- Démontrer l'applicabilité de notre stratégie en changeant la matrice et le domaine d'activité.

VI. CONCLUSION

Le profil d'incertitude est un outil de décision très utile pour décider si une méthode est adaptée à son usage prévu. C'est une combinaison, sous la forme d'un graphique, de plusieurs intervalles d'incertitude calculés à partir de mesures réalisées sur des échantillons à différents niveaux de concentration et des limites d'acceptabilité. Il permet également : de sélectionner le modèle de régression le plus approprié pour la calibration ; de déterminer les limites de quantification ; d'estimer facilement l'incertitude de mesure et subséquemment de décider sur la validité de la méthode.

D'un point de vue statistique, cette stratégie de validation répond aux besoins des analystes quant à la prise de décision en rapport avec les résultats fournis en considérant des limites d'acceptabilité prédéfinies ainsi que le risque relatif à l'usage futur de la méthode. De ce fait, l'utilisation du profil d'incertitude se trouve en accord avec l'objectif d'une méthode qui peut être résumé en sa capacité à quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues et devant être déterminées par le laboratoire.

Au moyen du critère de l'incertitude sur lequel se base cette stratégie de validation, l'analyste peut envisager de contrôler le risque du fournisseur et le risque du client indispensables d'un point de vue garantie et confiance.

Finalement, comme on pourra la voir dans les chapitres III et IV de ce travail, cette approche s'applique à différents types de procédures analytiques, ce qui démontre son universalité et flexibilité pour évaluer la performance d'une méthode analytique, indépendamment de la nature de l'analyte, de la matrice et du champ d'application.

Chapitre III

Validation des Méthodes Bioanalytiques par Approche du Profil d'Incertitude

I. INTRODUCTION

La validation des méthodes bioanalytiques comprend toutes les procédures qui démontrent qu'une méthode particulière, utilisée pour une mesure quantitative d'analytes dans une matrice biologique donnée, est adaptée pour son usage prévu. Comme tous les autres dosages, la bioanalyse est également affectée par de nombreux facteurs, y compris mais sans s'y limiter : des interférents endogènes issus des différents fluides biologiques, la variation de la matrice, etc. Ces facteurs peuvent être sources d'erreur, ce qui fausse l'analyse quantitative des composés à doser. De plus, les résultats obtenus sont sujets à des incertitudes. Certes, la connaissance de l'incertitude de mesure liée à chaque résultat d'analyse peut réduire le risque d'interprétations inadéquates des résultats lorsqu'ils sont comparés aux limites de conformité réglementaire ou aux limites de spécification de produit. En validant une méthode bioanalytique, il faut s'assurer qu'elle produira des résultats fiables et reproductibles dans le temps en dépit de ces difficultés.

Dans ce contexte, ce chapitre est consacré à prouver l'applicabilité et l'adéquation du profil d'incertitude à évaluer la validité des méthodes bioanalytiques. Pour ce faire, nous allons illustrer toutes les étapes essentielles pour appliquer les algorithmes accompagnant cet outil décisionnel en exploitant les données de validation d'une méthode HPLC dédiée pour la détermination de la vitamine B3 dans le lait. Toutefois, afin de statuer sur la pertinence de cette stratégie nous allons mener une étude comparative de notre démarche avec celle de l'erreur totale adoptée par SFSTP via l'analyse des résultats de validation de trois méthodes bioanalytiques, utilisant différentes techniques de séparation à savoir : HS-GC-MS, électrophorèse capillaire en milieu non aqueux et CE-ESI/MS.

II. VALIDATION PAR PROFIL D'INCERTITUDE D'UNE METHODE HPLC DE DOSAGE DE LA VITAMINE B3 DANS LE LAIT

1. Domaine d'application [73]

Dans cette étude, nous avons utilisé des données à partir d'un exemple d'application traité par Max Feinberg [73]. La détermination de la vitamine B3 (aussi appelée vitamine PP ou niacine) dans les aliments requiert la mesure de deux formes chimiques : l'acide nicotinique et le nicotinamide. L'étude présentée ici porte sur le lait dont les teneurs varient entre 0.6 et 1.0 mg/L selon l'origine du produit. Du fait des traitements thermiques ou des autorisations de supplémentation accordées, les produits du marché se situent plutôt entre 0.4 et 2.0 mg/L. Afin de couvrir un domaine d'application raisonnable, la validation a été étendue entre 0.2 et 4.0 mg/L.

La méthode officielle de dosage (AOAC 94-413) repose sur une technique microbiologique délicate et d'incertitude élevée. Le but de cette validation est de vérifier si la méthode chromatographique [74] est acceptable comme méthode alternative. Les limites d'acceptabilité ont été fixées à $\pm 20\%$ et se situent bien en deçà des performances de la méthode de référence qui sont aux alentours de $\pm 40\%$.

Dans la phase de validation, la procédure analytique doit être complètement décrite sous la forme d'une procédure opérationnelle normalisée (PON). Il est obligatoire de préparer des solutions d'étalonnage selon la même procédure qui sera appliquée en routine, c'est-à-dire le même mode de fonctionnement, le même nombre de niveaux de concentration (points d'étalonnage) et le même nombre de répétitions par niveau.

Au cours du développement de la méthode, aucune interférence n'a été observée pour le nicotinamide et des rendements de récupération satisfaisants ont été obtenus. Au contraire, un effet matriciel non négligeable a été observé pour l'acide nicotinique sans qu'il soit possible de le réduire. Il a été décidé de vérifier si une validation pouvait encore être effectuée pendant que cet effet matriciel était corrigé en utilisant un facteur de correction. Par conséquent, deux différents échantillons de lait homogénéisés et non enrichis ont été utilisés ; ils sont appelés lait A et B. Lait A étant utilisé pour déterminer un facteur de correction et lait B utilisé pour valider ce facteur. Enfin, trois séries de 27 mesures ont été collectées selon le plan expérimental défini :

- (1) étalons préparés en dissolvant du nicotinamide pur et de l'acide nicotinique dans de l'eau distillée ;
- (2) le nicotinamide et l'acide nicotinique ont ajouté des étalons dans le lait A ;
- (3) le nicotinamide et l'acide nicotinique ont ajouté des étalons dans le lait B.

2. Les plans d'étalonnage et de validation

Deux plans expérimentaux sont nécessaires : le plan d'étalonnage, utilisé pour sélectionner la fonction de réponse de calibration, et l'autre appelé plan de validation, utilisée pour calculer les caractéristiques de la validation (justesse, fidélité, linéarité...). Le même plan expérimental a été choisi pour l'étalonnage et la validation : 27 dosages réalisés à 3 niveaux de concentration, sur 3 jours avec 3 répétitions ($3 \times 3 \times 3 = 27$). Ce choix est motivé, d'une part, par un nombre total d'essais économiquement acceptables, d'autre part, par le mode opératoire qui préconise un minimum de trois niveaux de concentration pour l'étalonnage. Comme il n'y a pas de matériel de référence adapté à ce type de détermination, il a été décidé d'effectuer des ajouts dosés sur un

échantillon de lait commercial. Cependant, les essais de validation doivent être effectués aux mêmes jours que ceux d'étalonnage pour utiliser les fonctions d'étalonnage correspondantes.

Les résultats de dosage des deux plans d'étalonnage et de validation des deux formes chimiques sont rassemblés dans les Tableaux III.1 et III.2 suivants :

Niveaux de concentrations	Plan d'étalonnage				Plan de validation			
	Concentration (mg/L)	Réponse (AU)			Concentration (mg/L)	Réponse (AU)		
		Série 1	Série 2	Série 3		Série 1	Série 2	Série 3
1	0.4	22.68	22.51	22.6	0.4	14.37	14.57	14.47
	0.4	23.15	23.19	23.17	0.4	13.84	12.07	12.96
	0.4	22.58	21.79	22.18	0.4	11.15	13.56	12.35
2	2.0	137.95	135.94	136.94	2.0	117.61	120.27	118.94
	2.0	136.56	131.35	133.95	2.0	117.7	117.96	117.83
	2.0	100.73	118.58	109.65	2.0	112.8	121.44	117.12
3	4.0	280.44	275.32	277.88	4.0	251.13	244.56	247.84
	4.0	270.46	273.52	271.99	4.0	252.75	246.1	249.42
	4.0	263.13	220.9	242.02	4.0	237.95	252.9	245.43

Tableau III.1 : Les données d'étalonnage et de validation d'une méthode de détermination du nicotinamide dans le lait par HPLC avec détection fluorométrique.

Niveaux de concentrations	Plan d'étalonnage				Plan de validation			
	Concentration (mg/L)	Réponse (AU)			Concentration (mg/L)	Réponse (AU)		
		Série 1	Série 2	Série 3		Série 1	Série 2	Série 3
1	0.2	11.56	10.92	12.89	0.2	5.78	5.46	6.45
	0.2	13.8	12.38	13.63	0.2	6.9	6.19	6.81
	0.2	13.25	13.62	13.59	0.2	6.63	6.81	6.79
2	2.0	131.37	112.73	133.61	2.0	77.08	61.42	77.24
	2.0	137.49	119.05	135.84	2.0	71.96	65.42	67.91
	2.0	134.81	120.7	136.48	2.0	68.85	60.81	79.97
3	4.0	272.19	234.72	268.89	4.0	145.61	124.2	147.28
	4.0	259.97	243.12	272.53	4.0	128.07	115.94	147.76
	4.0	271.56	248.44	270.72	4.0	138.36	123.03	142.58

Tableau III.2 : Les données d'étalonnage et de validation d'une méthode de détermination de l'acide nicotinique dans le lait par HPLC avec détection fluorométrique.

Les concentrations sont exprimées en mg/L et le signal est un rapport entre les aires des pics. Dans le but de tester notre approche, profil d'incertitude, et pour choisir la meilleure fonction de réponse, nous avons généré 13 fonctions de réponse possibles.

3. Analyse de la fonction de réponse

Cette étape constitue l'une des plus importantes du fait que la fiabilité des résultats de validation qui seront obtenus dépend du modèle de calibration. Il s'agit de transformer les réponses mesurées sur les échantillons de validation en concentrations.

A ce stade, il est intéressant d'ajuster les droites de régression aux données d'étalonnage pour illustrer la variabilité de la sensibilité de la méthode d'un jour à l'autre, d'où l'importance de conduire la validation sur plusieurs jours et de collecter les données d'étalonnage et de validation les mêmes jours. Les Figures III.1 et III.2 illustrent pour le nicotinamide et l'acide nicotinique respectivement, le plan expérimental complet, la variabilité inter-jours et l'effet de matrice. Par ailleurs, on peut déjà voir un effet de matrice pour l'acide nicotinique puisque la droite d'étalonnage montre une variabilité remarquable en fonction des jours ; les mêmes mesures pour le nicotinamide ne montraient aucun effet de matrice.

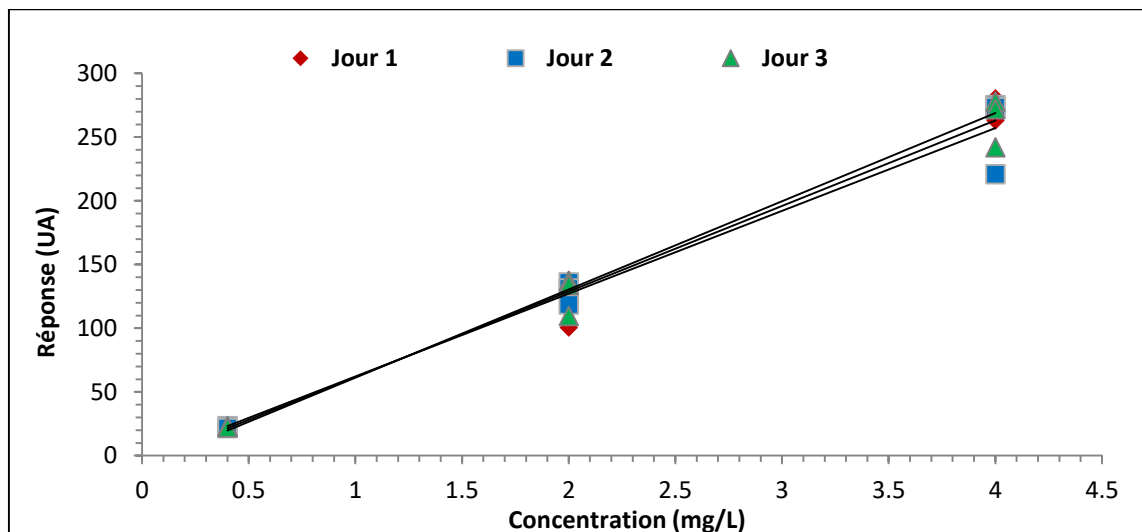


Figure III.1 : Droites d'étalonnage observées sur trois jours pour le nicotinamide

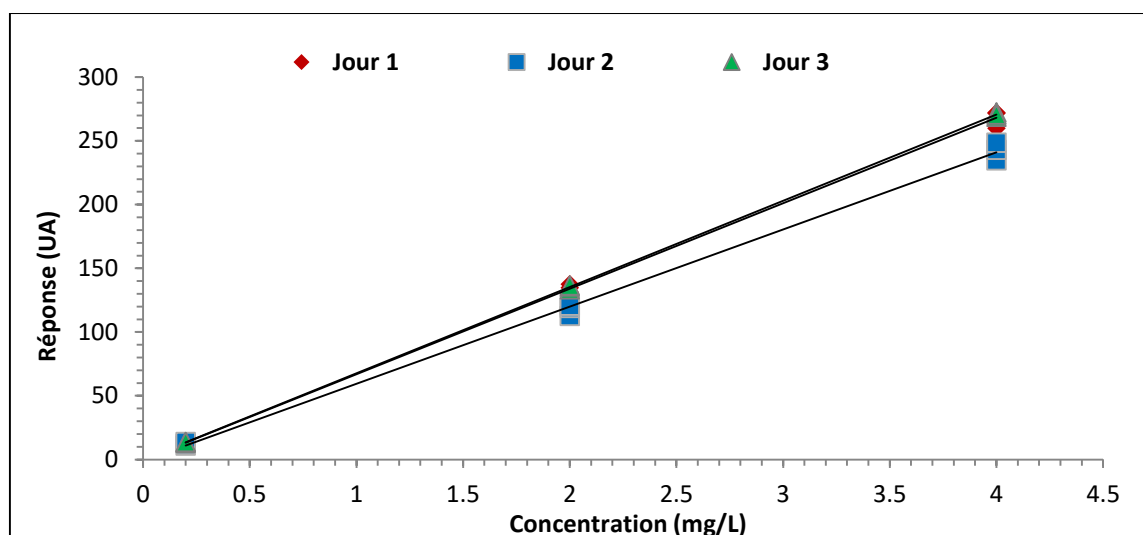


Figure III.2 : Droites d'étalonnage observées sur trois jours pour l'acide nicotinique

La fonction de réponse a été évaluée au moyen de 13 modèles générés à partir des standards d'étalonnage en utilisant trois niveaux de concentration. Ensuite, ces modèles de régression ont été ajustés en vue d'analyser la relation entre la concentration (mg/L) et la réponse analytique et de décider lequel est le plus approprié. Les Tableaux III.3 et III.4 présentent pour le nicotinamide et l'acide nicotinique respectivement : la pente et l'ordonnée à l'origine par jour de chaque fonction de réponse ainsi que le coefficient de détermination qui exprime la partie de la variance totale des réponses expliquées par le modèle.

Modèle	Séries	Ordonnée à l'origine	Pente	Terme quadratique
Linéaire simple	Série n°1	-7.899	69.207	NA
	Série n°2	-2.725	64.980	NA
	Série n°3	-5.314	67.094	NA
Linéaire simple pondéré 1/X	Série n°1	-4.951	67.825	NA
	Série n°2	-3.477	65.333	NA
	Série n°3	-4.214	66.579	NA
Linéaire simple pondéré 1/X ²	Série n°1	-4.027	66.824	NA
	Série n°2	-3.713	65.588	NA
	Série n°3	-3.870	66.205	NA
Quadratique	Série n°1	-0.719	57.784	2.558
	Série n°2	-4.557	67.896	-0.653
	Série n°3	-2.636	62.833	0.954
Quadratique 1/X	Série n°1	-0.719	57.784	2.558
	Série n°2	-4.557	67.896	-0.653
	Série n°3	-2.636	62.833	0.954
Quadratique 1/X ²	Série n°1	-0.719	57.784	2.558
	Série n°2	-4.557	67.896	-0.653
	Série n°3	-2.636	62.833	0.954
Racine carré	Série n°1	-0.707	8.531	NA
	Série n°2	-0.424	8.241	NA
	Série n°3	-0.568	8.390	NA
Racine carré 1/X	Série n°1	-0.561	8.413	NA
	Série n°2	-0.501	8.303	NA
	Série n°3	-0.533	8.362	NA
Racine carré 1/X ²	Série n°1	-0.498	8.334	NA
	Série n°2	-0.534	8.345	NA
	Série n°3	-0.518	8.343	NA
Logarithmique	Série n°1	1.781	1.071	NA
	Série n°2	1.777	1.060	NA
	Série n°3	1.779	1.066	NA
Logarithmique 1/X	Série n°1	1.781	1.064	NA
	Série n°2	1.778	1.068	NA
	Série n°3	1.779	1.067	NA
Logarithmique 1/X ²	Série n°1	1.780	1.059	NA
	Série n°2	1.779	1.073	NA
	Série n°3	1.780	1.067	NA
0-max	Série n°1	0.000	67.836	NA
	Série n°2	0.000	64.145	NA
	Série n°3	0.000	65.991	NA

Tableau III.3 : Paramètres de régression relatifs aux différents modèles pour le nicotinamide.

Modèle	Séries	Ordonnée à l'origine	Pente	Terme quadratique
Linéaire simple	Série n°1	-0.243	67.107	NA
	Série n°2	-1.077	60.504	NA
	Série n°3	-0.160	67.722	NA
Linéaire simple pondéré 1/X	Série n°1	-0.550	67.255	NA
	Série n°2	0.199	59.887	NA
	Série n°3	-0.174	67.728	NA
Linéaire simple pondéré 1/X ²	Série n°1	-0.597	67.345	NA
	Série n°2	0.394	59.513	NA
	Série n°3	-0.176	67.733	NA
Quadratique	Série n°1	-0.748	68.141	-0.244
	Série n°2	1.026	56.201	1.017
	Série n°3	-0.183	67.769	-0.011
Quadratique 1/X	Série n°1	-0.748	68.141	-0.244
	Série n°2	1.026	56.201	1.017
	Série n°3	-0.183	67.769	-0.011
Quadratique 1/X ²	Série n°1	-0.748	68.141	-0.244
	Série n°2	1.026	56.201	1.017
	Série n°3	-0.183	67.769	-0.011
Racine carré	Série n°1	-0.085	8.237	NA
	Série n°2	-0.002	7.745	NA
	Série n°3	-0.028	8.242	NA
Racine carré 1/X	Série n°1	-0.106	8.255	NA
	Série n°2	0.063	7.688	NA
	Série n°3	-0.031	8.244	NA
Racine carré 1/X ²	Série n°1	-0.112	8.266	NA
	Série n°2	0.081	7.654	NA
	Série n°3	-0.031	8.245	NA
Logarithmique	Série n°1	1.819	1.016	NA
	Série n°2	1.780	0.992	NA
	Série n°3	1.828	1.004	NA
Logarithmique 1/X	Série n°1	1.820	1.018	NA
	Série n°2	1.779	0.988	NA
	Série n°3	1.828	1.005	NA
Logarithmique 1/X ²	Série n°1	1.820	1.019	NA
	Série n°2	1.777	0.986	NA
	Série n°3	1.828	1.005	NA
0-max	Série n°1	0.000	34.337	NA
	Série n°2	0.000	30.264	NA
	Série n°3	0.000	36.468	NA

Tableau III.4 : Paramètres de régression relatifs aux différents modèles pour l'acide nicotinique.

Les 13 modèles sélectionnés pour évaluer les différents critères de validation sont : linéaire simple, linéaire simple pondéré $1/X$, linéaire simple pondéré $1/X^2$, quadratique, quadratique pondéré $1/X$, quadratique pondéré $1/X^2$, linéaire après transformation racine carrée, linéaire après transformation racine carrée pondéré $1/X$, linéaire après transformation racine carrée pondéré $1/X^2$, linéaire après transformation logarithmique, linéaire après transformation logarithmique pondéré $1/X$, linéaire après transformation logarithmique pondéré $1/X^2$, linéaire 0-max.

Nous voulons par ce choix multiple des modèles, tester celui qui convient avec une méthode bioanalytique, de même qu'évaluer l'adaptation du profil d'incertitude avec les différentes fonctions de réponse. Donc, la sélection est basée sur les modèles de régression qui peuvent d'une part, rencontrer les objectifs de la méthode et correspondre à l'utilisation en analyse de routine et d'autre part, permettre la comparaison des profils obtenus en fonction du modèle choisi.

4. Justesse

La justesse se réfère à l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de mesures et de la valeur de référence acceptée. Elle peut être estimée à partir des concentrations calculées par prédiction inverse, sous diverse formes, comme un biais moyen absolu ou relatif. Nous préférons l'évaluer à l'aide du taux de recouvrement moyen $R\%$, dans la mesure où les valeurs de référence sont le résultat d'ajouts dosés. $R\%$ s'obtient en faisant le rapport entre la moyenne des concentrations calculées par prédiction inverse et la valeur de référence ou la valeur conventionnellement vraie. Le taux de recouvrement pour chaque niveau de concentration est indiqué dans les Tableaux III.5 et III.6 pour le nicotinamide et l'acide nicotinique respectivement en utilisant le modèle linéaire simple comme fonction de réponse.

D'après les résultats de la justesse des deux formes chimiques de la vitamine B3, on constate que pour le nicotinamide, le taux de recouvrement est supérieur à 100% pour les trois niveaux, ce qui caractérise un biais positif. Mais le fait marquant est que le taux de recouvrement varie avec le niveau de concentration. Pour essayer de traduire de façon plus globale le biais de justesse, il est possible de calculer la droite de justesse qui relie la valeur de référence et la concentration calculée (linéarité). Pour l'acide nicotinique, on observe un taux de recouvrement qui se situe aux alentours de 50% et traduit un effet de matrice significatif qui a pour conséquence de réduire de près de la moitié le signal observé lors des mesures sur les solutions de validation.

Série	Concentration (mg/L)	Conc. Calculée (mg/L)	Moyenne Conc. Calculée (mg/L)	Moyenne générale (mg/L)	Biais absolu (mg/L)	Biais (%)	R (%)
Série1	0.4	0.44	0.437	0.424	0.024	6.111	106.111
	0.4	0.43					
	0.4	0.44					
Série2	0.4	0.4	0.407				
	0.4	0.41					
	0.4	0.41					
Série3	0.4	0.43	0.430				
	0.4	0.43					
	0.4	0.43					
Série1	2.0	2.06	2.040	2.095	0.095	4.778	104.778
	2.0	2.07					
	2.0	1.99					
Série2	2.0	2.16	2.153				
	2.0	2.12					
	2.0	2.18					
Série3	2.0	2.11	2.085				
	2.0	2.09					
	2.0	2.08					
Série1	4.0	4.09	4.033	4.135	0.135	3.389	103.389
	4.0	4.12					
	4.0	3.89					
Série2	4.0	4.17	4.220				
	4.0	4.19					
	4.0	4.3					
Série3	4.0	4.13	4.153				
	4.0	4.15					
	4.0	4.18					

Tableau III.5 : Paramètres de la justesse pour le nicotinamide.

Ces résultats sont confirmés par la comparaison des biais relatifs avec les limites d'acceptabilité. Pour le nicotinamide, les biais relatifs des différents niveaux de concentration ne dépassent pas les limites d'acceptabilité fixées à $\pm 20\%$, nous pouvons donc dire que la justesse est satisfaisante. En revanche, les biais relatifs de l'acide nicotinique dépassent totalement les $\pm 20\%$ indiquant la présence de l'effet de matrice.

Série	Concentration (mg/L)	Conc. Calculée (mg/L)	Moyenne Conc. Calculée (mg/L)	Moyenne générale (mg/L)	Biais absolu (mg/L)	Biais (%)	R (%)
Série1	0.2	0.09	0.100	0.107	-0.093	-46.651	53.349
	0.2	0.11					
	0.2	0.10					
Série2	0.2	0.11	0.120				
	0.2	0.12					
	0.2	0.13					
Série3	0.2	0.10	0.101				
	0.2	0.10					
	0.2	0.10					
Série1	2.0	1.15	1.086	1.083	-0.91734	-45.867	54.133
	2.0	1.08					
	2.0	1.03					
Série2	2.0	1.03	1.052				
	2.0	1.10					
	2.0	1.02					
Série3	2.0	1.14	1.094				
	2.0	1.01					
	2.0	1.18					
Série1	4.0	2.17	2.050	2.075	-1.92490	-48.123	51.877
	4.0	1.91					
	4.0	2.07					
Série2	4.0	2.07	2.019				
	4.0	1.93					
	4.0	2.05					
Série3	4.0	2.18	2.156				
	4.0	2.18					
	4.0	2.11					

Tableau III.6 : Paramètres de la justesse pour l'acide nicotinique.

5. Fidélité intermédiaire et intervalles de tolérance

La fidélité d'une méthode analytique exprime le degré de concordance (degré de dispersion) entre une série de mesures obtenues à partir des essais du même échantillon homogène dans les conditions prescrites. La fidélité d'une méthode d'analyse est habituellement exprimée par la variance, l'écart type ou le coefficient de variation (CV%) d'une série de mesures. Elle peut être évaluée à deux niveaux : la répétabilité et la fidélité intermédiaire.

Les écarts-types de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont obtenus en effectuant une analyse de la variance (ANOVA), en utilisant les concentrations prédites.

A partir des résultats de la justesse et de la fidélité intermédiaire, on calcule le β -content, γ -confidence tolérance intervalle (β, γ -CTI) en utilisant trois méthodes chimiométriques à savoir : (i) l'approximation de Satterthwaite, (ii) la simulation de Monte Carlo et (iii) la procédure MLS (Modified Large Simple). En vue de vérifier la flexibilité du β, γ -CTI nous avons décidé d'étudier plusieurs valeurs de β (66.7%, 80% et 90%). Le Tableau III.7 présente les différents résultats obtenus dans le cas d'un modèle linéaire simple pour les deux formes de la vitamine B3.

	β -content (%)	γ -confidence (%)	Concentration (mg/L)	CV _{Fi} (%)	Limite basse de tolérance (%)	Limite haute de tolérance (%)
Nicotinamide	66.7	90	0.4	3.797	-7.435	20.175
			2.0	2.945	-5.282	14.926
			4.0	2.849	-5.474	12.234
	80	90	0.4	3.797	-11.795	24.536
			2.0	2.945	-8.477	18.122
			4.0	2.849	-8.280	15.040
	90	90	0.4	3.797	-16.767	29.508
			2.0	2.945	-12.122	21.766
			4.0	2.849	-11.485	18.245
Acide Nicotinique	66.7	90	0.2	12.150	-66.963	-26.340
			2.0	6.371	-52.592	-39.143
			4.0	4.973	-55.003	-41.242
	80	90	0.2	12.150	-73.394	-19.909
			2.0	6.371	-54.747	-36.987
			4.0	4.973	-57.190	-39.055
	90	90	0.2	12.150	-80.735	-12.567
			2.0	6.371	-57.227	-34.508
			4.0	4.973	-59.692	-36.553

Tableau III.7 : CV de fidélité intermédiaire et intervalles de tolérance pour les deux formes de la vitamine B3

En effet, ce tableau fournit quelques renseignements sur les performances de la méthode. On constate que les coefficients de variation de la fidélité intermédiaire ne dépassent pas 3.79% pour le nicotinamide alors qu'ils peuvent atteindre 12.15% pour l'acide nicotinique mais sans excéder les limites d'acceptabilité (20%) ce qui démontre l'excellente fidélité de la méthode étudiée. Cette remarque souligne l'intérêt de procéder aux calculs niveau par niveau. On observe également que les limites de tolérance tendent à s'élargir de plus en plus en augmentant la proportion de β .

6. Estimation de l'incertitude de mesure

L'incertitude de mesure est l'une des composantes les plus importantes qui doit être obligatoirement déterminée pour assurer la fiabilité des résultats. L'évaluation de l'incertitude associée à un résultat est une partie essentielle de toute analyse quantitative. Sans connaissance de l'incertitude de mesure, la déclaration d'un résultat d'analyse ne peut pas être considérée comme complète.

Par le présent travail, nous proposons une approche novatrice pour l'estimation de l'incertitude de mesure. En effet, cette dernière peut facilement être calculée sans effort supplémentaire en exploitant les données de validation appropriées. Dans l'ensemble, nous utiliserons simplement les limites supérieure et inférieure de l'intervalle de tolérance (β, γ -CTI) pour estimer l'incertitude de mesure à chaque niveau de concentration moyennant l'équation (II.27) présentée dans le chapitre II. Par la suite, on peut aussi calculer les limites d'incertitude supérieure et inférieure ce qui permet d'établir le profil d'incertitude.

6.1. Exemple de calcul de l'incertitude de mesure

Dans ce qui suit, nous allons présenter un exemple de calcul de l'incertitude de mesure ainsi que les limites d'incertitude en se basant sur les trois méthodes chimométriques développées dans l'axe IV du chapitre 2.

On veut construire la limite d'incertitude pour le premier niveau du nicotinamide (0.4 mg/L) en utilisant le modèle linéaire simple comme fonction de réponse et la règle 4-6- λ traduite par $\beta = 66.7\%$ et $\gamma = 90\%$ [2, 58, 75]. Pour cet exemple, $a = 3$, $n = 3$, $SS_b = 0.001$ et $SS_e = 1.189 \times 10^{-4}$.

6.1.1. Approximation de Satterthwaite

Puisque $\gamma = 0.9$, nous choisissons $\eta = 0.905$. La valeur critique F pour calculer R_0 est $F_{2,6,1-\eta} = 0,167$, $R = 74.055$, $R_0 = 0.336$. De plus, $f = 2.0360$. Les quantiles de khi-carré appropriés peuvent être facilement obtenus et sont les suivants :

$$\chi_{1;\beta}^2(h) = \chi_{1;0.667}^2\left(\frac{1}{3.024}\right) = 1.279$$

$$\chi_{f^*;1-\gamma}^2 = \chi_{2.036;0.1}^2 = 0.2216$$

Ainsi, le facteur de tolérance est :

$$k_s \simeq \sqrt{\frac{f^* \chi_{1;\beta}^2(h)}{\chi_{f^*,1-\gamma}^2}} = \sqrt{\frac{2.036 \times 1.279}{0.221}} = 3.4284$$

Et le β, γ -content tolérance intervalle bilatéral est fourni par $\bar{Y} \pm k_s \hat{\sigma}_m$ ce qui égale à [0.3703, 0.4807]. Donc, nous pouvons estimer l'incertitude de mesure en utilisant l'équation (II.27) :

$$u(Z) = \frac{U - L}{2t(v)} = \frac{0.4807 - 0.3703}{2 \times 2.7332} = 0.020 \text{ mg/L}$$

L'intervalle d'incertitude bilatéral résultant est donné par $[\bar{Y} \pm 2 \times u(Z)] = [0.3851, 0.4659]$.

De manière équivalente, l'intervalle est [-3.7315%, 16.4722%] à partir de la concentration nominale (0.4 mg/L). Ainsi, la performance de l'analyse est jugée valide à cette concentration nominale.

6.1.2. Simulation de Monte Carlo

Pour appliquer cette approche, nous avons d'abord estimé une limite de confiance supérieure généralisée de 90% qui égale à 0.0031. La simulation de Monte Carlo consiste à un nombre de simulation de 100 000 itérations appliquée à l'algorithme 3 pour obtenir cette limite.

Notant que le quantile normal standard $Z_{(1+\beta)/2} = Z_{0.8335} = 0.968$, donc on trouve la marge d'erreur statistique $D = Z_{0.8335} \times \sqrt{0.0031} = 0.0542$. Ainsi, le β, γ -content tolérance intervalle bilatéral est donné par $[\bar{Y} \pm D] = [0.4255 \pm 0.0542] = [0.3712, 0.4798]$

Donc, l'incertitude de mesure peut alors être calculée en utilisant l'équation (II.27) :

$$u(Z) = \frac{U - L}{2t(v)} = \frac{0.4798 - 0.3712}{2 \times 2.7332} = 0.0199 \text{ mg/L}$$

L'intervalle d'incertitude bilatéral résultant est donné par $[\bar{Y} \pm 2 \times u(Z)] = [0.3857, 0.4652]$

De manière équivalente, l'intervalle est [-3.5765%, 16.3172%] à partir de la concentration nominale (0.4 mg/L). Ainsi, la performance de l'analyse est jugée valide à cette concentration nominale.

6.1.3. Procédure MLS

Pour $\gamma = 0.90$, $a = 3$ et $n = 3$, nous avons $\chi^2_{a-1;1-\gamma} = \chi^2_{2;0.1} = 0.2107$ et $\chi^2_{a(n-1);1-\gamma} = \chi^2_{6;0.1} = 2.2041$. L'expression S , mentionnée dans le chapitre 2, pour la limite de confiance supérieure à 90% en utilisant la procédure MLS est simplifiée à $S = 0.0031$.

Ainsi, le β, γ -content tolérance intervalle bilatéral est donné par $[\bar{Y} \pm Z_{(1+\beta)/2} \sqrt{S}] = [0.4255 \pm 0.0542] = [0.3713, 0.4796]$

Donc, l'incertitude de mesure peut alors être calculée en utilisant l'équation (II.27) :

$$u(Z) = \frac{U - L}{2t(v)} = \frac{0.4796 - 0.3713}{2 \times 2.7332} = 0.0198 \text{ mg/L}$$

L'intervalle d'incertitude bilatéral résultant est donné par $[\bar{Y} \pm 2 \times u(Z)] = [0.3859, 0.4651]$

De manière équivalente, l'intervalle est [-3.5364%, 16.2770%] à partir de la concentration nominale (0.4 mg/L). Ainsi, la performance de l'analyse est jugée valide à cette concentration nominale.

7. Construction des profils d'incertitude

Les intervalles d'incertitude relatifs pour les trois niveaux de concentration du nicotinamide et de l'acide nicotinique, ont été calculés pour chaque fonction de réponse et avec différents valeurs de β en utilisant les mêmes procédures. Par la suite, les profils d'incertitude correspondants sont construits.

Il faut noter que les trois méthodes chimométriques de calcul du β, γ -content tolérance intervalle, aboutissent à des estimés d'incertitude semblables, donc en vue de simplifier on ne va présenter par la suite que les résultats obtenus par l'approximation de Satterthwaite.

7.1. Le nicotinamide

7.1.1. Pour $\beta = 66.7\%$ et $\gamma = 90\%$

Les principaux résultats sont présentés dans le Tableau III.8, alors que les différents profils d'incertitude sont présentés dans la Figure III.3.

D'après les résultats du Tableau III.8, on constate que certaines fonctions de réponse donnent presque les mêmes valeurs des limites d'incertitude, nous n'allons donc montrer par la suite que les profils présentant des résultats différents alors que les autres seront présentés dans l'annexe.

Modèle	Concentration (mg/L)	CV _{FI} (%)	Biais absolue (mg/L)	R (%)	Incertitude (mg/L)	Incertitude élargie relative (%)	Limites d'incertitude (%)	
							Inférieure	Supérieure
Linéaire simple	0.4	3.797	0.024	106.111	0.020	10.000	-3.732	16.472
	2.0	2.945	0.095	104.778	0.084	8.400	-3.568	13.213
	4.0	2.849	0.135	103.389	0.168	8.400	-5.042	11.802
Linéaire simple pondéré 1/X	0.4	2.181	0.013	103.170	0.013	6.500	-3.136	9.475
	2.0	3.006	0.096	104.784	0.085	8.500	-3.729	13.298
	4.0	2.410	0.150	103.739	0.139	6.950	-3.208	10.686
Linéaire simple pondéré 1/X ²	0.4	3.416	0.010	102.448	0.017	8.602	-6.154	11.049
	2.0	2.522	0.102	105.094	0.074	7.440	-2.346	12.533
	4.0	2.064	0.167	104.178	0.098	4.881	-0.703	9.059
Quadratique	0.4	3.667	0.009	102.251	0.019	9.500	-7.066	11.568
	2.0	1.458	0.126	106.307	0.026	2.600	3.715	8.899
	4.0	3.323	0.123	103.076	0.191	9.550	-6.476	12.628
Quadratique 1/X	0.4	3.667	0.009	102.251	0.019	9.500	-7.066	11.568
	2.0	1.458	0.126	106.307	0.026	2.600	3.715	8.899
	4.0	3.323	0.123	103.076	0.191	9.550	-6.476	12.628
Quadratique 1/X ²	0.4	3.667	0.009	102.251	0.019	9.500	-7.066	11.568
	2.0	1.458	0.126	106.307	0.026	2.600	3.715	8.899
	4.0	3.323	0.123	103.076	0.191	9.550	-6.476	12.628
Racine carré	0.4	1.696	0.013	103.193	0.011	5.500	-2.072	8.457
	2.0	2.789	0.115	105.767	0.081	8.100	-2.290	13.824
	4.0	2.514	0.138	103.440	0.147	7.350	-3.931	10.811
Racine carré 1/X	0.4	3.412	0.010	102.570	0.017	8.683	-6.113	11.252
	2.0	2.503	0.117	105.853	0.074	7.407	-1.554	13.261
	4.0	2.025	0.148	103.693	0.099	4.971	-1.278	8.664
Racine carré 1/X ²	0.4	3.661	0.010	102.442	0.019	9.428	-6.986	11.869
	2.0	1.933	0.121	106.050	0.059	5.917	0.134	11.967
	4.0	2.044	0.159	103.968	0.071	3.548	0.420	7.516
Logarithmique	0.4	3.171	0.010	102.482	0.017	8.500	-6.000	10.963
	2.0	2.431	0.139	106.968	0.073	7.300	-0.345	14.280
	4.0	2.039	0.120	103.007	0.107	5.350	-2.338	8.352
Logarithmique 1/X	0.4	3.575	0.010	102.525	0.020	9.740	-7.215	12.265
	2.0	1.918	0.138	106.890	0.059	5.894	0.996	12.783
	4.0	1.968	0.116	102.899	0.068	3.400	-0.501	6.299
Logarithmique 1/X ²	0.4	3.905	0.010	102.443	0.020	10.062	-7.619	12.506
	2.0	1.545	0.136	106.805	0.042	4.219	2.587	11.024
	4.0	1.994	0.113	102.830	0.082	4.090	-1.260	6.920
0-max	0.4	5.953	-0.047	88.197	0.026	13.000	-24.876	1.270
	2.0	4.387	0.051	102.570	0.116	11.600	-9.049	14.189
	4.0	3.346	0.124	103.100	0.195	9.750	-6.649	12.849

Tableau III.8 : Résultats de validation de la méthode HPLC pour le dosage du nicotinamide ($\beta = 66.7\%$ et $\gamma = 90\%$).

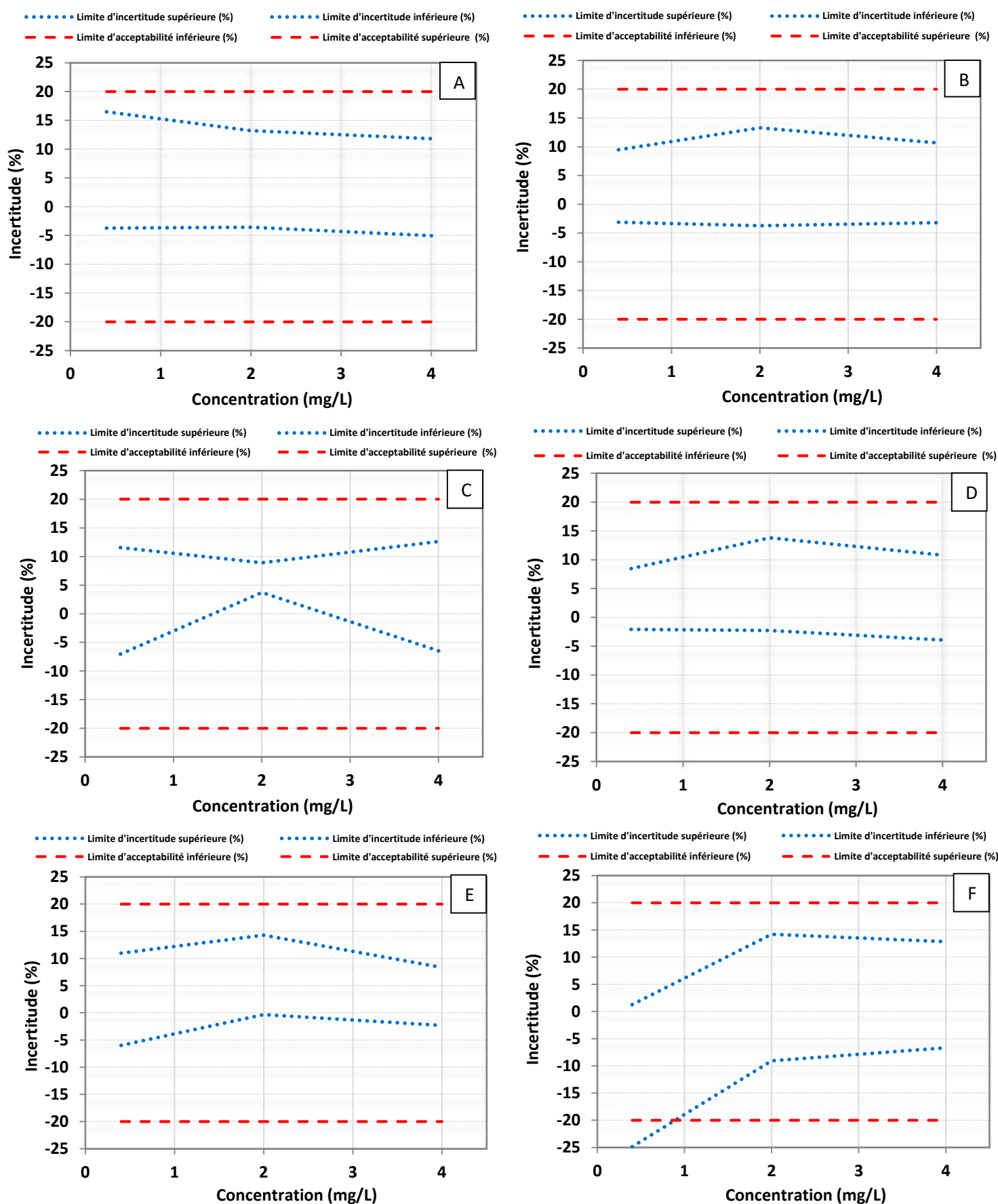


Figure III.3 : Profils d'incertitude du nicotinamide ($\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : linéaire simple, B : linéaire pondéré $1/X$, C : Quadratique, D : Racine carré, E : Logarithme, F : 0-max).

Comme l'illustre la Figure III.3, les limites d'incertitude supérieure et inférieure n'ont pas dépassé les limites d'acceptabilité fixées à $\pm 20\%$ pour tous les modèles sélectionnés sauf le 0-max qui présente un profil n'incluant pas le niveau bas de concentration (0.4 mg/L). Par conséquent, la méthode peut être considérée comme valide sur la gamme de concentration étudiée. De plus, le Tableau III.8 montre que l'incertitude élargie est correctement estimée, puisqu'elle est inférieure à la limite d'acceptabilité (20%).

On constate également que certaines fonctions de réponse sont meilleures que d'autres ; le choix de la plus adéquate dépend de la qualité des résultats obtenus. Dans ce cas, un examen visuel des différents profils permet de déterminer les modèles les plus appropriés pour quantifier, avec des incertitudes ne dépassant pas les limites d'acceptabilité, et qui donnent des intervalles d'incertitude les plus étroits à savoir : le modèle linéaire simple pondéré $1/X$ et la régression linéaire après transformation racine carrée).

Le choix de $\beta = 66.7\%$ et $\gamma = 90\%$ correspond à la règle de décision $4-6-\lambda$ adoptée par la FDA pour la validation des procédures analytiques et traduite par Hoffman et Kringler [2, 58, 75]. Les résultats de qualité obtenus en utilisant cette règle confirment clairement l'utilité de ce choix en bioanalyse.

7.1.2. Pour $\beta = 80\%$ et $\gamma = 90\%$

Le Tableau III.9 rassemble les différents résultats de validation de la méthode HPLC pour le dosage du nicotinamide dans le lait pour les paramètres $\beta = 80\%$ et $\gamma = 90\%$. La Figure III.4 présente les profils d'incertitude correspondants.

Modèle	Concentration (mg/L)	CV _{FI} (%)	Biais absolue (mg/L)	R (%)	Incertitude (mg/L)	Incertitude élargie relative (%)	Limites d'incertitude (%)	
							Inférieure	Supérieure
Linéaire simple	0.4	3.797	0.024	106.111	0.027	13.500	-6.922	19.663
	2.0	2.945	0.095	104.778	0.110	11.000	-6.221	15.866
	4.0	2.849	0.135	103.389	0.222	11.100	-7.710	14.470
Linéaire simple pondéré 1/X	0.4	2.181	0.013	103.170	0.017	8.500	-5.129	11.468
	2.0	3.006	0.096	104.784	0.112	11.200	-6.421	15.989
	4.0	2.410	0.150	103.739	0.183	9.150	-5.415	12.892
Linéaire simple pondéré 1/X ²	0.4	3.416	0.010	102.448	0.023	11.319	-8.871	13.767
	2.0	2.522	0.102	105.094	0.098	9.794	-4.701	14.888
	4.0	2.064	0.167	104.178	0.129	6.442	-2.264	10.619
Quadratique	0.4	3.667	0.009	102.251	0.024	12.260	-10.010	14.511
	2.0	1.458	0.126	106.307	0.034	3.429	2.877	9.735
	4.0	3.323	0.123	103.076	0.251	12.574	-9.498	15.649
Quadratique 1/X	0.4	3.667	0.009	102.251	0.024	12.260	-10.010	14.511
	2.0	1.458	0.126	106.307	0.034	3.429	2.877	9.735
	4.0	3.323	0.123	103.076	0.251	12.574	-9.498	15.649
Quadratique 1/X ²	0.4	3.667	0.009	102.251	0.024	12.260	-10.010	14.511
	2.0	1.458	0.126	106.307	0.034	3.429	2.877	9.735
	4.0	3.323	0.123	103.076	0.251	12.574	-9.498	15.649
Racine carré	0.4	1.696	0.013	103.193	0.014	7.000	-3.738	10.123
	2.0	2.789	0.115	105.767	0.106	10.600	-4.838	16.372
	4.0	2.514	0.138	103.440	0.194	9.700	-6.270	13.149
Racine carré 1/X	0.4	3.412	0.010	102.570	0.023	11.426	-8.857	13.996
	2.0	2.503	0.117	105.853	0.098	9.751	-3.898	15.605
	4.0	2.025	0.148	103.693	0.131	6.559	-2.866	10.252
Racine carré 1/X ²	0.4	3.661	0.010	102.442	0.025	12.406	-9.964	14.848
	2.0	1.933	0.121	106.050	0.078	7.793	-1.743	13.843
	4.0	2.044	0.159	103.968	0.094	4.694	-0.726	8.661
Logarithmique	0.4	3.171	0.010	102.482	0.022	11.000	-8.679	13.642
	2.0	2.431	0.139	106.968	0.096	9.600	-2.658	16.593
	4.0	2.039	0.120	103.007	0.141	7.050	-4.0416	10.055
Logarithmique 1/X	0.4	3.575	0.010	102.525	0.026	12.817	-10.292	15.343
	2.0	1.918	0.138	106.890	0.078	7.763	-0.873	14.652
	4.0	1.968	0.116	102.899	0.090	4.498	-1.599	7.396
Logarithmique 1/X ²	0.4	3.905	0.010	102.443	0.027	13.241	-10.798	15.684
	2.0	1.545	0.136	106.805	0.056	5.563	1.242	12.368
	4.0	1.994	0.113	102.830	0.108	5.402	-2.572	8.232
0-max	0.4	5.953	-0.047	88.197	0.034	17.000	-29.005	5.399
	2.0	4.387	0.051	102.570	0.153	15.300	-12.720	17.860
	4.0	3.346	0.124	103.100	0.257	12.850	-9.735	15.935

Tableau III.9 : Résultats de validation de la méthode HPLC pour le dosage du nicotinamide ($\beta = 80\%$ et $\gamma = 90\%$).

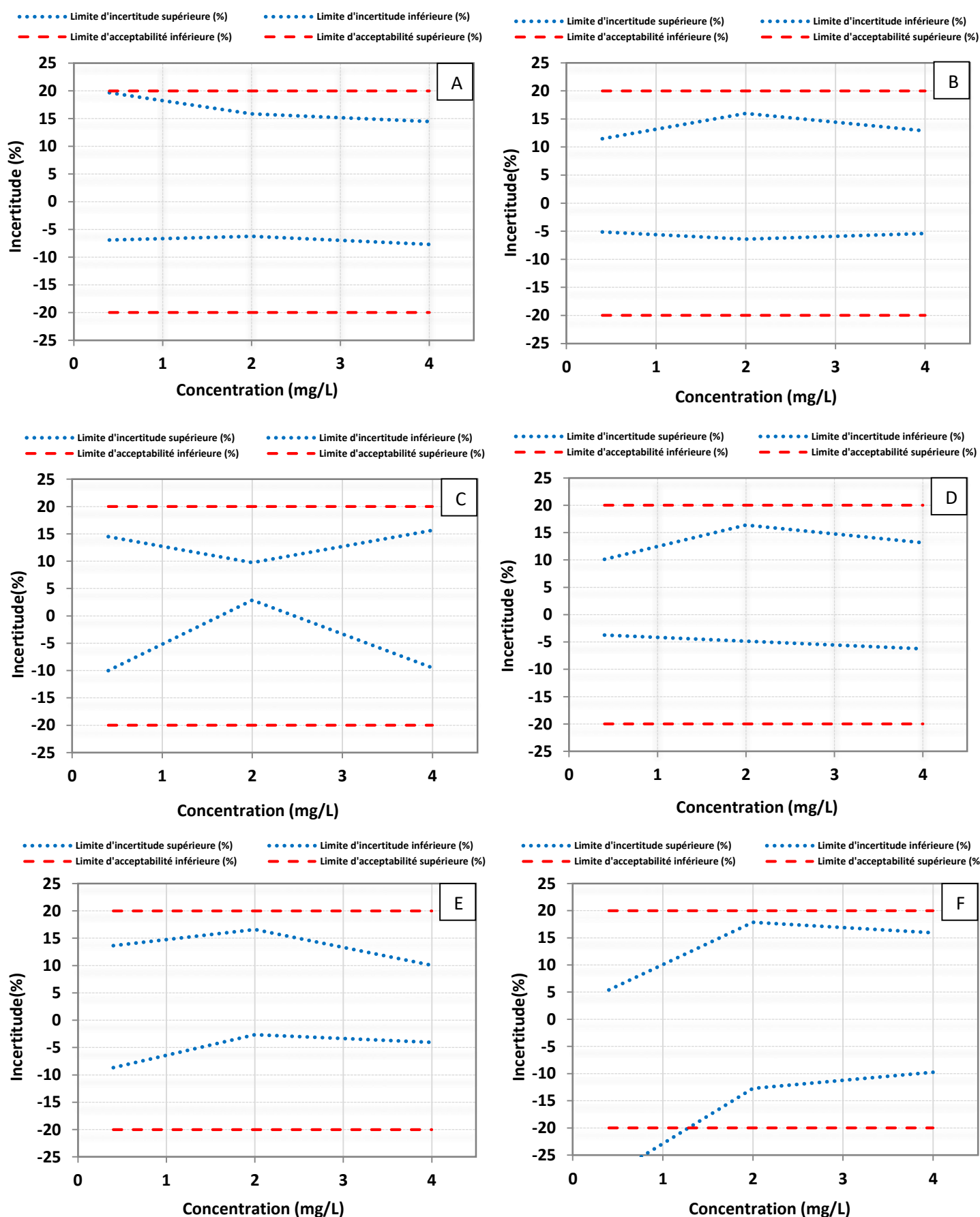


Figure III.4 : Profils d'incertitude du nicotinamide ($\beta = 80\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : linéaire simple, B : linéaire pondéré $1/X$, C : Quadratique, D : Racine carré, E : Logarithme, F : 0-max).

Après augmentation du paramètre β à 80%, on remarque que les limites d'incertitudes tendent à s'élargir et ce pour toutes les fonctions de réponse étudiées. Le modèle de régression 0-max donne toujours un domaine de validité excluant le niveau bas de concentration (0.4 mg/L). Cependant, la limite d'incertitude supérieure du modèle de régression linéaire simple tend à couper la limite supérieure d'acceptabilité de 20% avec une valeur qui vaut 19.663%. On peut alors conclure que le choix de la valeur de β est très important selon le besoin de l'analyste, et selon les résultats souhaités dans le futur.

Les critères de validation principaux (justesse, fidélité intermédiaire) demeurent dans les limites d'acceptabilité ($\pm 20\%$) au sein de l'intervalle de tolérance ($\beta = 80\%$ et $\gamma = 90\%$), comme indiqué dans les profils d'incertitude présentés dans la Figure III.4. Également, les incertitudes relatives élargies obtenues en divisant les incertitudes correspondantes avec les concentrations introduites (Tableau III.9) n'excédant pas les 20% ce qui confirme la validité de la méthode sur l'ensemble de l'intervalle de dosage considéré.

7.1.3. Pour $\beta = 90\%$ et $\gamma = 90\%$

Dans ce cas, les limites d'incertitude tendent à s'élargir de plus en plus jusqu'à ce qu'elles sortent des limites d'acceptabilité pour le modèle de régression linéaire simple (Figure III.5) et surtout la limite d'incertitude supérieure de la valeur 23.301 et qui correspond au niveau de concentration le plus bas 0.4 mg/L (Tableau III.10). Donc, une valeur de $\beta = 90\%$, nous permet d'avoir une grande probabilité d'obtenir les résultats souhaités, toutefois, le profil d'incertitude excède la limite d'acceptabilité supérieure dans le niveau le plus bas. Dans ce cas, si l'analyste souhaite travailler avec une proportion $\beta = 90\%$, il faut impérativement réduire l'intervalle de dosage.

Modèle	Concentration (mg/L)	CV _{FI} (%)	Biais absolue (mg/L)	R (%)	Incertitude (mg/L)	Incertitude élargie relative (%)	Limites d'incertitude (%)	
							Inférieure	Supérieure
Linéaire simple	0.4	3.797	0.024	106.111	0.034	17.000	-10.560	23.301
	2.0	2.945	0.095	104.778	0.141	14.100	-9.248	18.893
	4.0	2.849	0.135	103.389	0.283	14.150	-10.759	17.519
Linéaire simple pondéré 1/X	0.4	2.181	0.013	103.170	0.021	10.500	-7.403	13.742
	2.0	3.006	0.096	104.784	0.143	14.300	-9.492	19.060
	4.0	2.410	0.150	103.739	0.234	11.700	-7.939	15.416
Linéaire simple pondéré 1/X ²	0.4	3.416	0.010	102.448	0.029	14.418	-11.970	16.865
	2.0	2.522	0.102	105.094	0.125	12.481	-7.388	17.575
	4.0	2.064	0.167	104.178	0.165	8.234	-4.056	12.412
Quadratique	0.4	3.667	0.009	102.251	0.031	15.500	-13.364	17.866
	2.0	1.458	0.126	106.307	0.044	4.400	1.910	10.703
	4.0	3.323	0.123	103.076	0.321	16.050	-12.947	19.098
Quadratique 1/X	0.4	3.667	0.009	102.251	0.031	15.500	-13.364	17.866
	2.0	1.458	0.126	106.307	0.044	4.400	1.910	10.703
	4.0	3.323	0.123	103.076	0.321	16.050	-12.947	19.098
Quadratique 1/X ²	0.4	3.667	0.009	102.251	0.031	15.500	-13.364	17.866
	2.0	1.458	0.126	106.307	0.044	4.400	1.910	10.703
	4.0	3.323	0.123	103.076	0.321	16.050	-12.947	19.098
Racine carré	0.4	1.696	0.013	103.193	0.018	9.000	-5.641	12.026
	2.0	2.789	0.115	105.767	0.135	13.500	-7.745	19.280
	4.0	2.514	0.138	103.440	0.248	12.400	-8.944	15.823
Racine carré 1/X	0.4	3.412	0.010	102.570	0.029	14.554	-11.985	17.124
	2.0	2.503	0.117	105.853	0.124	12.427	-6.573	18.280
	4.0	2.025	0.148	103.693	0.168	8.381	-4.688	12.075
Racine carré 1/X ²	0.4	3.661	0.010	102.442	0.032	15.802	-13.360	18.243
	2.0	1.933	0.121	106.050	0.099	9.937	-3.886	15.987
	4.0	2.044	0.159	103.968	0.120	6.018	-2.050	9.986
Logarithmique	0.4	3.171	0.010	102.482	0.028	14.000	-11.735	16.698
	2.0	2.431	0.139	106.968	0.123	12.300	-5.299	19.234
	4.0	2.039	0.120	103.007	0.180	9.000	-5.993	12.007
Logarithmique 1/X	0.4	3.575	0.010	102.525	0.033	16.326	-13.801	18.851
	2.0	1.918	0.138	106.890	0.099	9.898	-3.008	16.787
	4.0	1.968	0.116	102.899	0.115	5.767	-2.868	8.665
Logarithmique 1/X ²	0.4	3.905	0.010	102.443	0.034	16.865	-14.422	19.309
	2.0	1.545	0.136	106.805	0.071	7.103	-0.298	13.908
	4.0	1.994	0.113	102.830	0.138	6.913	-4.083	9.743
0-max	0.4	5.953	-0.047	88.197	0.044	22.000	-33.711	10.105
	2.0	4.387	0.051	102.570	0.195	19.500	-16.905	22.046
	4.0	3.346	0.124	103.100	0.327	16.350	-13.256	19.457

Tableau III.10 : Résultats de validation de la méthode HPLC pour le dosage du nicotinamide ($\beta = 90\%$ et $\gamma = 90\%$).

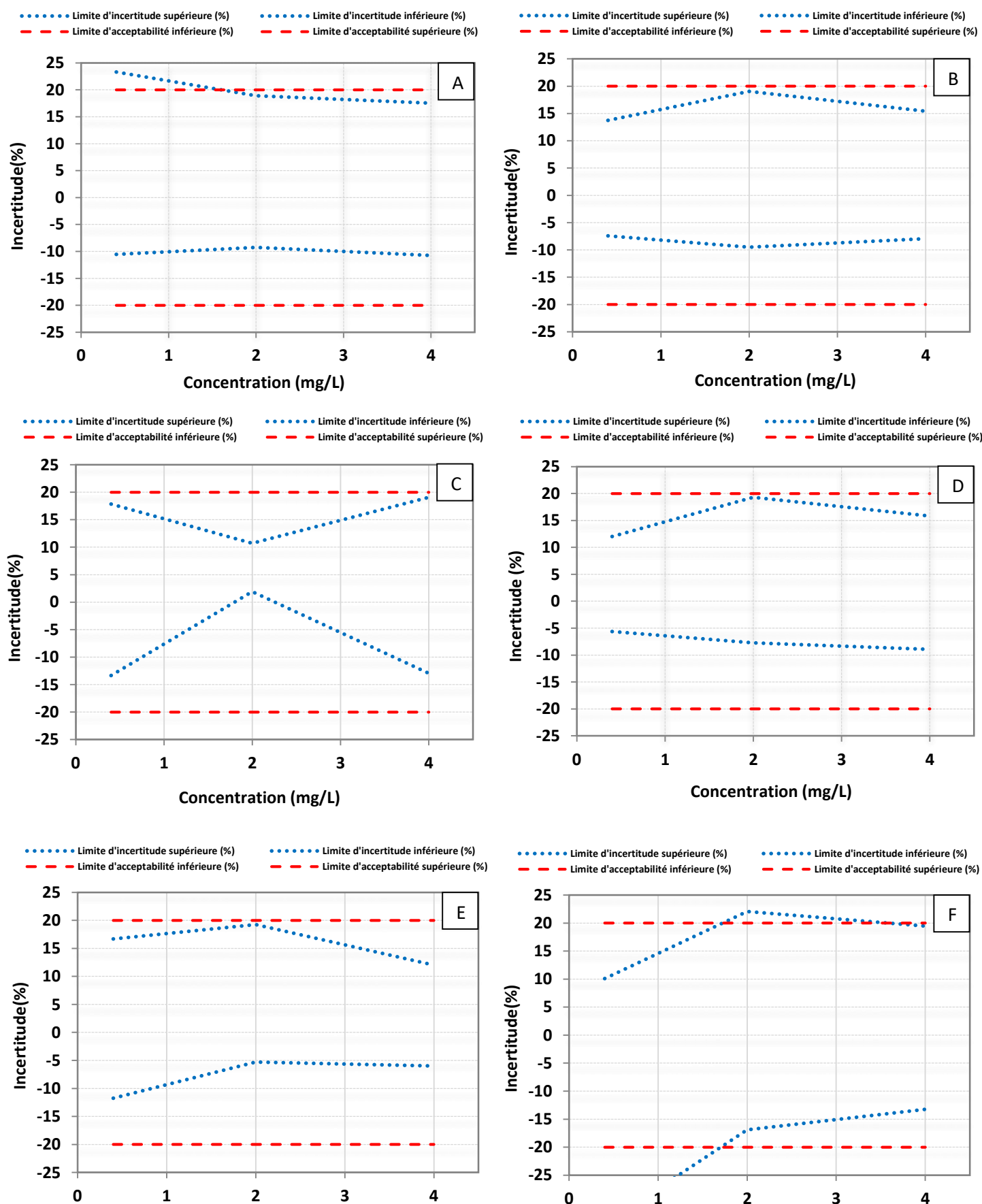


Figure III.5 : Profils d'incertitude du nicotinamide ($\beta = 90\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : linéaire simple, B : linéaire pondéré 1/X, C : Quadratique, D : Racine carré, E : Logarithme, F : 0-max)

7.2. L'acide nicotinique

7.2.1. Pour $\beta = 66.7\%$ et $\gamma = 90\%$

Après avoir interprété les résultats relatifs au nicotinamide, nous allons présenter ceux de l'acide nicotinique, car la méthode montre un effet de matrice qui peut être compensé par un facteur de correction. Il faut noter qu'il y a une différence entre le nicotinamide et l'acide nicotinique réside dans le domaine de validation qui s'étend, dans ce cas, entre 0.2 et 4.0 mg/L, du fait des concentrations attendues qui peuvent être un peu plus faibles et dans les limites d'acceptabilité qui sont fixées à $\pm 20\%$, pour s'approcher des méthodes d'analyse biologique et tenir compte de la correction prévue.

Le Tableau III.11 regroupe tous les résultats de validation obtenus pour l'acide nicotinique avant la correction, alors que la Figure III.6 illustre les différents profils tracés.

L'analyse de ces résultats, montre clairement la présence d'un effet de matrice significatif pour tous les modèles étudiés et confirme les résultats obtenus précédemment. Cet effet de matrice se caractérise par des intervalles d'incertitude qui sortent totalement à l'extérieur des limites d'acceptabilité à l'exception du modèle 0-max.

Modèle	Concentration (mg/L)	CV _{FI} (%)	Biais absolue (mg/L)	R (%)	Incertitude (mg/L)	Incertitude élargie relative (%)	Limites d'incertitude (%)	
							Inférieure	Supérieure
Linéaire simple	0.2	12.15	-0.093	53.349	0.019	19.000	-65.135	-28.168
	2.0	6.371	-0.917	54.133	0.072	7.200	-53.065	-38.669
	4.0	4.973	-1.925	51.878	0.142	7.100	-55.232	-41.013
Linéaire simple pondéré 1/X	0.2	7.880	-0.099	50.760	0.007	7.000	-56.456	-42.025
	2.0	6.389	-0.920	53.996	0.079	7.900	-53.935	-38.073
	4.0	4.964	-1.925	51.874	0.143	7.150	-55.250	-41.003
Linéaire simple pondéré 1/X ²	0.2	7.934	0.010	50.415	0.009	9.101	-58.687	-40.484
	2.0	6.384	-0.919	54.037	0.077	7.703	-53.665	-38.260
	4.0	4.862	-1.923	51.934	0.138	6.890	-54.956	-41.176
Quadratique	0.2	10.071	-0.101	49.6491	0.014	14.000	-64.687	-36.015
	2.0	6.340	-0.912	54.4183	0.060	6.000	-51.592	-39.572
	4.0	4.603	-1.915	52.1381	0.126	6.300	-54.174	-41.550
Quadratique 1/X	0.2	10.071	-0.101	49.6491	0.014	14.000	-64.687	-36.015
	2.0	6.340	-0.912	54.4183	0.060	6.000	-51.592	-39.572
	4.0	4.603	-1.915	52.1381	0.126	6.300	-54.174	-41.550
Quadratique 1/X ²	0.2	10.071	-0.101	49.6491	0.014	14.000	-64.687	-36.015
	2.0	6.340	-0.912	54.4183	0.060	6.000	-51.592	-39.572
	4.0	4.603	-1.915	52.1381	0.126	6.300	-54.174	-41.550
Racine carré	0.2	8.864	-0.099	50.769	0.007	7.000	-56.322	-42.140
	2.0	6.375	-0.918	54.118	0.079	7.900	-53.801	-37.964
	4.0	4.960	-1.923	51.917	0.142	7.100	-55.184	-40.983
Racine carré 1/X	0.2	7.945	-0.099	50.344	0.007	7.052	-56.707	-42.604
	2.0	6.377	-0.918	54.098	0.080	8.035	-53.937	-37.868
	4.0	4.909	-1.922	51.950	0.139	6.938	-54.987	-41.112
Racine carré 1/X ²	0.2	7.957	-0.100	50.273	0.007	7.207	-56.934	-42.521
	2.0	6.372	-0.917	54.143	0.077	7.724	-53.581	-38.133
	4.0	4.759	-1.920	52.011	0.134	6.680	-54.670	-41.309
Logarithmique	0.2	8.946	-0.099	50.300	0.007	7.000	-56.772	-42.629
	2.0	6.365	-0.916	54.202	0.085	8.500	-54.253	-37.342
	4.0	4.905	-1.921	51.988	0.141	7.050	-55.052	-40.973
Logarithmique 1/X	0.2	7.962	-0.100	50.241	0.007	7.063	-56.821	-42.696
	2.0	6.363	-0.916	54.219	0.083	8.261	-54.042	-37.519
	4.0	4.805	-1.919	52.028	0.135	6.763	-54.734	-41.209
Logarithmique 1/X ²	0.2	7.964	-0.100	50.224	0.007	7.064	-56.839	-42.712
	2.0	6.360	-0.915	54.249	0.080	7.950	-53.701	-37.801
	4.0	4.705	-1.917	52.073	0.130	6.516	-54.443	-41.411
0-max	0.2	8.884	-0.009	95.674	0.022	22.000	-26.293	17.641
	2.0	6.298	0.080	103.995	0.110	11.000	-6.973	14.964
	4.0	4.425	0.000	100.000	0.148	7.400	-7.399	7.399

Tableau III.11 : Résultats de validation de la méthode HPLC pour le dosage de l'acide nicotinique ($\beta = 66.7\%$ et $\gamma = 90\%$).

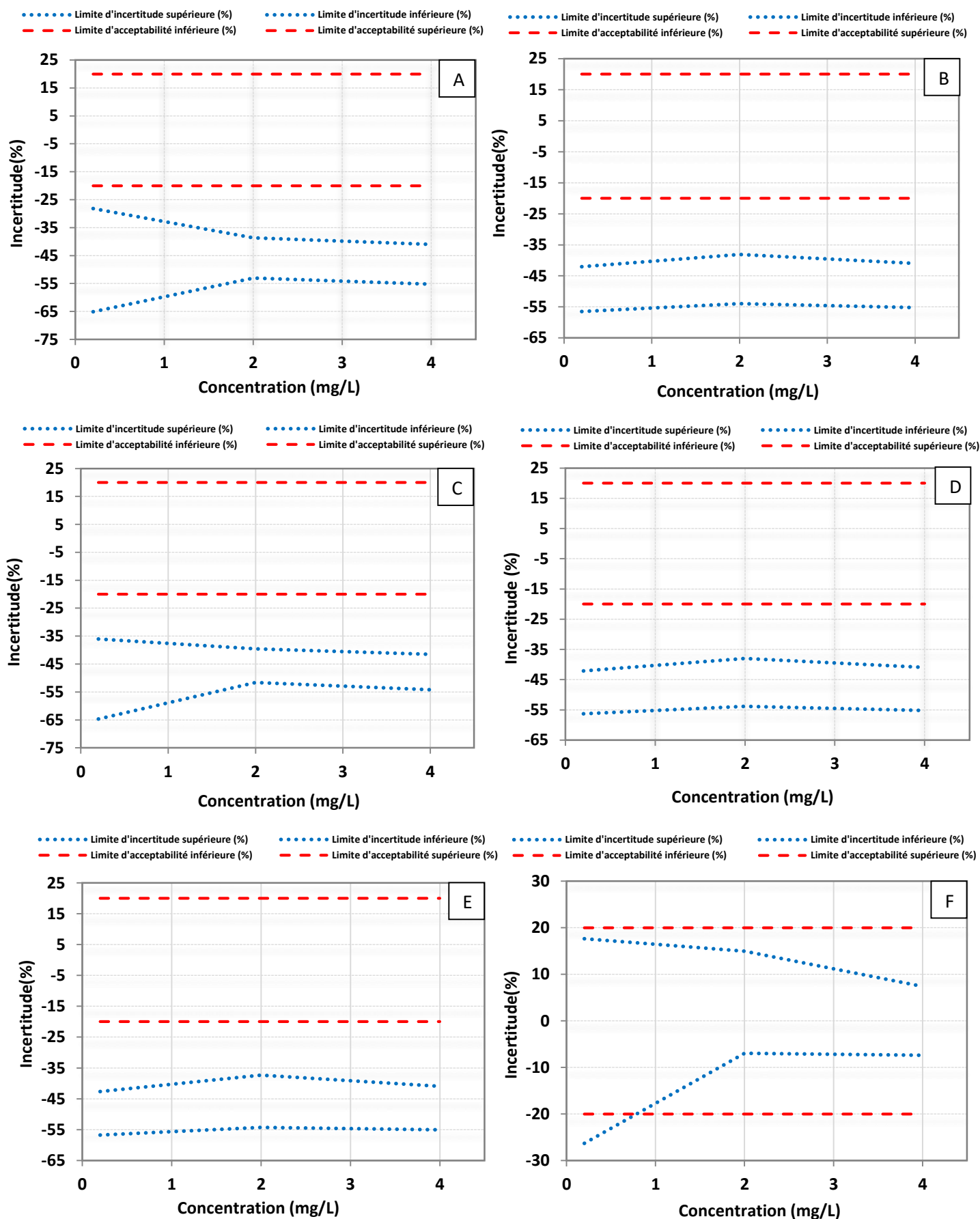


Figure III.6 : Profils d'incertitude de l'acide nicotinique ($\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : linéaire simple, B : linéaire pondéré 1/X, C : Quadratique, D : Racine carré, E : Logarithme, F : 0-max)

Cet effet de matrice n'existant pas pour le nicotinamide, aucune explication satisfaisante ne permet de proposer un protocole d'extraction qui réduirait ce biais systématique. On peut utiliser une méthode très classiquement appliquée pour les mesures physiques qui consiste à corriger les données à l'aide d'un facteur de correction. De nombreuses publications et guidances traitent de la prise en compte du taux de recouvrement dans l'expression du résultat. Par exemple l'IUPAC (International Union for Pure and Applied Chemistry) a publié un guide à ce propos [68]. Pour calculer le facteur de correction, on reporte sur un graphique les deux variables : concentration calculée, notée $C_{calculée}$, et concentration théorique introduite, notée $C_{introduite}$. La Figure III.7 illustre le très bon ajustement linéaire de ces deux variables. Les concentrations calculées sont strictement proportionnelles aux concentrations théoriques introduites et la droite qui les relie est égale à $C_{calculée} = 0,518C_{introduite} + 0,018$.

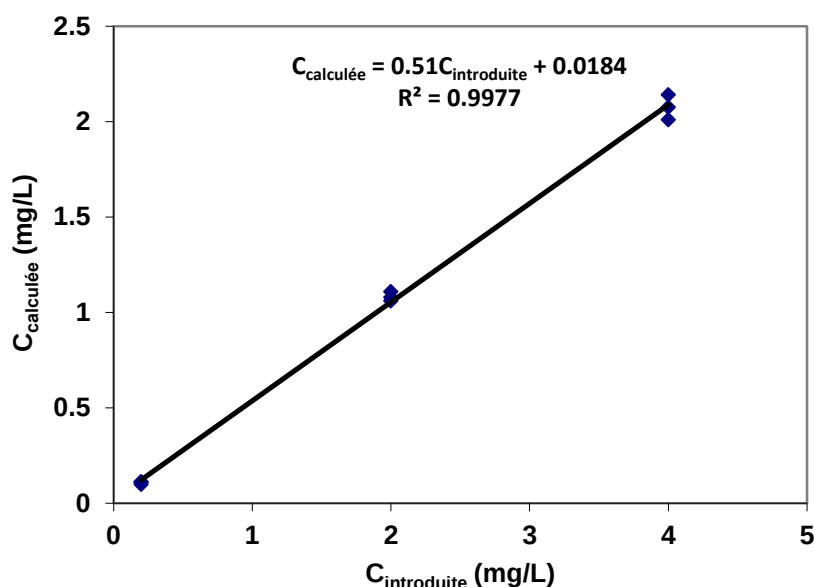


Figure III.7 : Linéarité entre les concentrations calculées et les concentrations introduites.

La pente de cette droite représente le taux moyen de recouvrement et le facteur de correction proposé est égal à l'inverse de cette pente, à savoir $1/0.518 = 1.930$. Comme ce facteur devra être appliqué systématiquement en routine, on a décidé de prendre la valeur approchée de 2.0 pour corriger les réponses obtenues sur les données de validation 2 relatives au lait B.

Tous les calculs sont refaits comme précédemment décrit et les résultats utiles à la production du profil d'incertitude sont reportés dans le Tableau III.12. La Figure III.8 illustre le nouveau profil d'incertitude et il devient évident que la méthode est valide puisque l'ensemble de l'intervalle d'incertitude entre 0.2 et 4.0 mg/L est inclus dans les limites d'acceptabilité.

Modèle	Concentration (mg/L)	CV _{FI} (%)	Biais absolue (mg/L)	R (%)	Incertitude (mg/L)	Incertitude élargie relative (%)	Limites d'incertitude (%)	
							Inférieure	Supérieure
Linéaire simple	0.2	9.430	0.012	106.041	0.029	29.000	-22.553	34.635
	2.0	3.018	0.054	102.715	0.082	8.200	-5.456	10.886
	4.0	3.239	0.137	103.424	0.113	5.650	-2.223	9.070
Linéaire simple pondéré 1/X	0.2	3.378	0.013	103.601	0.014	14.000	-10.308	17.510
	2.0	3.067	0.054	102.704	0.082	8.200	-5.535	10.943
	4.0	3.235	0.143	103.564	0.123	6.150	-2.571	9.699
Linéaire simple pondéré 1/X ²	0.2	8.225	0.007	103.349	0.014	13.950	-10.601	17.298
	2.0	2.869	0.057	102.824	0.073	7.247	-4.423	10.070
	4.0	3.230	0.149	103.714	0.138	6.914	-3.200	10.628
Quadratique	0.2	8.222	0.007	103.385	0.014	14.000	-10.908	17.678
	2.0	2.809	0.007	103.385	0.049	4.900	-1.638	8.107
	4.0	3.245	0.130	103.243	0.112	5.600	-2.341	8.828
Quadratique 1/X	0.2	8.222	0.007	103.385	0.014	14.000	-10.908	17.678
	2.0	2.809	0.007	103.385	0.049	4.900	-1.638	8.107
	4.0	3.245	0.130	103.243	0.112	5.600	-2.341	8.828
Quadratique 1/X ²	0.2	8.222	0.007	103.385	0.014	14.000	-10.908	17.678
	2.0	2.809	0.007	103.385	0.049	4.900	-1.638	8.107
	4.0	3.245	0.130	103.243	0.112	5.600	-2.341	8.828
Racine carré	0.2	8.172	0.008	104.011	0.015	15.000	-10.862	18.884
	2.0	3.064	0.056	102.791	0.084	8.400	-5.601	11.183
	4.0	3.212	0.141	103.516	0.123	6.150	-2.614	9.645
Racine carré 1/X	0.2	8.212	0.007	103.502	0.014	13.962	-10.460	17.464
	2.0	2.965	0.057	102.856	0.077	7.723	-4.867	10.579
	4.0	3.207	0.147	103.674	0.143	7.150	-3.476	10.824
Racine carré 1/X ²	0.2	8.216	0.007	103.462	0.014	13.982	-10.520	17.444
	2.0	2.865	0.060	102.974	0.067	6.716	-3.742	9.690
	4.0	3.202	0.153	103.827	0.163	8.172	-4.345	12.000
Logarithmique	0.2	8.200	0.007	103.665	0.014	14.000	-10.332	17.662
	2.0	3.109	0.059	102.931	0.086	8.600	-5.618	11.479
	4.0	3.186	0.143	103.582	0.149	7.450	-3.846	11.010
Logarithmique 1/X	0.2	8.205	0.007	103.593	0.014	13.996	-10.403	17.589
	2.0	2.864	0.060	103.010	0.073	7.318	-4.309	10.328
	4.0	3.374	0.149	103.730	0.182	9.109	-5.379	12.838
Logarithmique 1/X ²	0.2	8.205	0.007	103.590	0.014	14.007	-10.417	17.597
	2.0	2.910	0.062	103.097	0.063	6.342	-3.245	9.438
	4.0	3.707	0.155	103.865	0.215	10.728	-6.864	14.593
0-max	0.2	5.308	-0.047	88.197	0.034	34.000	-29.005	5.399
	2.0	2.272	0.051	102.570	0.153	15.300	-12.720	17.860
	4.0	0.250	0.012	106.041	0.029	29.000	-22.553	34.635

Tableau III.12 : Résultats de validation de la méthode HPLC pour le dosage de l'acide nicotinique après correction ($\beta = 66.7\%$ et $\gamma = 90\%$).

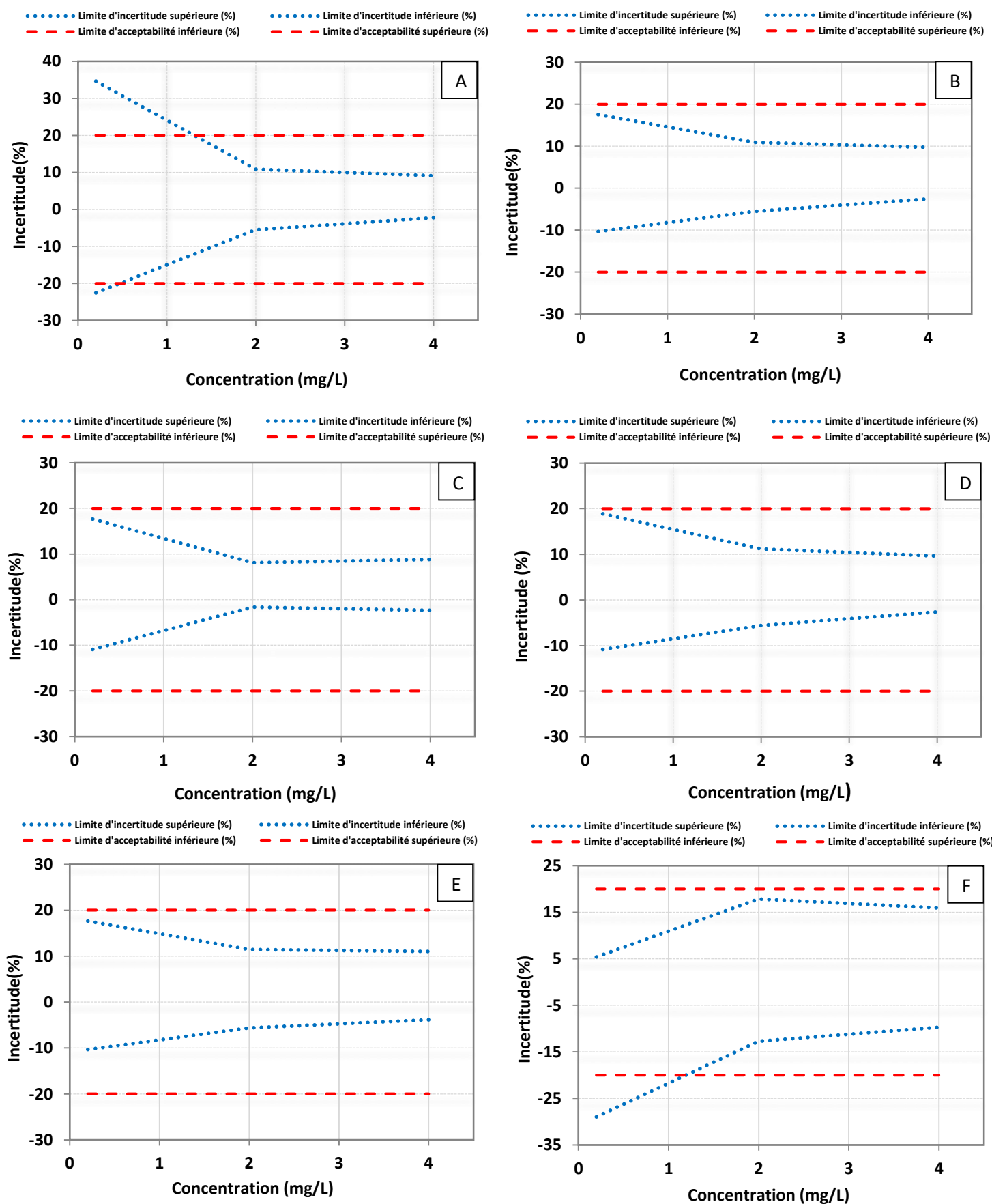


Figure III.8 : Profils d'incertitude de l'acide nicotinique après correction ($\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : linéaire simple, B : linéaire pondéré 1/X, C : Quadratique, D : Racine carré, E : Logarithme, F : 0-max)

L'examen visuel des profils d'incertitude obtenus pour l'acide nicotinique après correction pour $\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$, montre que la méthode est devenue valide tout au long du domaine d'application pour tous les modèles sélectionnés à l'exception de la régression linéaire simple et la régression linéaire 0-max. Les valeurs de β et γ impliquent que 66.7% des résultats futurs générés par la méthode analytique seront inclus dans l'intervalle de tolérance calculé avec un niveau de confiance de 90%. Il apparaît également que les incertitudes élargies relatives n'excèdent pas les limites d'acceptabilité fixées à $\pm 20\%$.

Les principaux critères de validation reportés au tableau III.12 permettent de mesurer l'effet de la correction. Les incertitudes ont fortement augmenté, ce qui explique l'élargissement de l'intervalle d'incertitude. Cette augmentation est en grande partie purement arithmétique et si la correction avait été appliquée dans l'autre sens –un facteur de correction inférieure à 0- la largeur de l'intervalle d'incertitude aurait été réduite.

Si on observe la forme de l'intervalle d'incertitude avant et après correction, on remarque qu'il a tendance à s'élargir. Ce comportement est explicable par l'application du facteur de correction dont l'incertitude est venue s'ajouter à celles des mesures initiales. Cette remarque est en accord avec la théorie de la propagation des erreurs qui est à la base du calcul de l'incertitude : l'application d'un facteur de correction dégrade la qualité des mesures, même si la méthode reste valide. Il est évident qu'un facteur trop élevé pourrait invalider la méthode ce qui représente une limite importante à cette technique de correction.

Au cours du processus de validation, on a pris comme décision de corriger les données en les multipliant par un facteur égal à 2.0. Cette opération doit maintenant faire partie de la méthode et être intégrée au mode opératoire standardisé qui servira en routine.

7.2.2. Pour $\beta = 80\%$ et $\gamma = 90\%$

Comme pour le nicotinamide, nous avons jugé utile d'étendre l'étude des paramètres du β, γ -content tolérance intervalle pour l'acide nicotinique après correction en augmentant la valeur de β à 80%. C'est-à-dire on cherche à avoir 80% des résultats futurs générés par la méthode inclus dans l'intervalle de tolérance avec un niveau de confiance de 90%. Les différents résultats obtenus sont exposés dans le Tableau III.13 de même que la Figure III.9 montre les profils d'incertitude correspondants.

Modèle	Concentration (mg/L)	CV _{FI} (%)	Biais absolue (mg/L)	R (%)	Incertitude (mg/L)	Incertitude élargie relative (%)	Limites d'incertitude (%)	
							Inférieure	Supérieure
Linéaire simple	0.2	9.430	0.012	106.041	0.038	38.000	-31.630	43.712
	2.0	3.018	0.054	102.715	0.108	10.800	-8.057	13.487
	4.0	3.239	0.137	103.424	0.149	7.450	-4.045	10.892
Linéaire simple pondéré 1/X	0.2	3.378	0.013	103.601	0.018	18.000	-14.799	22.001
	2.0	3.067	0.054	102.704	0.109	10.900	-8.158	13.567
	4.0	3.235	0.143	103.564	0.162	8.100	-4.544	11.673
Linéaire simple pondéré 1/X ²	0.2	8.225	0.007	103.349	0.019	18.453	-15.105	21.802
	2.0	2.869	0.057	102.824	0.096	9.559	-6.735	12.383
	4.0	3.230	0.149	103.714	0.183	9.131	-5.417	12.845
Quadratique	0.2	8.222	0.007	103.385	0.019	19.000	-15.523	22.292
	2.0	2.809	0.007	103.385	0.065	6.500	-3.211	9.680
	4.0	3.245	0.130	103.243	0.148	7.400	-4.144	10.631
Quadratique 1/X	0.2	8.222	0.007	103.385	0.019	19.000	-15.523	22.292
	2.0	2.809	0.007	103.385	0.065	6.500	-3.211	9.680
	4.0	3.245	0.130	103.243	0.148	7.400	-4.144	10.631
Quadratique 1/X ²	0.2	8.222	0.007	103.385	0.019	19.000	-15.523	22.292
	2.0	2.809	0.007	103.385	0.065	6.500	-3.211	9.680
	4.0	3.245	0.130	103.243	0.148	7.400	-4.144	10.631
Racine carré	0.2	8.172	0.008	104.011	0.020	20.000	-15.653	23.675
	2.0	3.064	0.056	102.791	0.111	11.100	-8.272	13.854
	4.0	3.212	0.141	103.516	0.195	9.750	-4.586	11.617
Racine carré 1/X	0.2	8.212	0.007	103.502	0.019	18.470	-14.967	21.972
	2.0	2.965	0.057	102.856	0.102	10.185	-7.329	13.040
	4.0	3.207	0.147	103.674	0.189	9.440	-5.766	13.114
Racine carré 1/X ²	0.2	8.216	0.007	103.462	0.019	18.496	-15.034	21.958
	2.0	2.865	0.060	102.974	0.089	8.864	-5.889	11.838
	4.0	3.202	0.153	103.827	0.216	10.780	-6.953	14.608
Logarithmique	0.2	8.200	0.007	103.665	0.019	19.000	-14.851	22.181
	2.0	3.109	0.059	102.931	0.113	11.300	-8.338	14.200
	4.0	3.186	0.143	103.582	0.196	9.800	-6.222	13.386
Logarithmique 1/X	0.2	8.205	0.007	103.593	0.019	18.515	-14.922	22.108
	2.0	2.864	0.060	103.010	0.097	9.654	-6.644	12.663
	4.0	3.374	0.149	103.730	0.240	12.010	-8.280	15.739
Logarithmique 1/X ²	0.2	8.205	0.007	103.590	0.019	18.529	-14.939	22.119
	2.0	2.910	0.062	103.097	0.084	8.373	-5.277	11.470
	4.0	3.707	0.155	103.865	0.283	14.137	-10.272	18.001
0-max	0.2	5.308	-0.047	88.197	0.034	34.000	-29.005	5.399
	2.0	2.272	0.051	102.570	0.153	15.300	-12.720	17.860
	4.0	0.250	0.124	103.100	0.257	12.850	-9.735	15.935

Tableau III.13 : Résultats de validation de la méthode HPLC pour le dosage de l'acide nicotinique après correction ($\beta = 80\%$ et $\gamma = 90\%$).

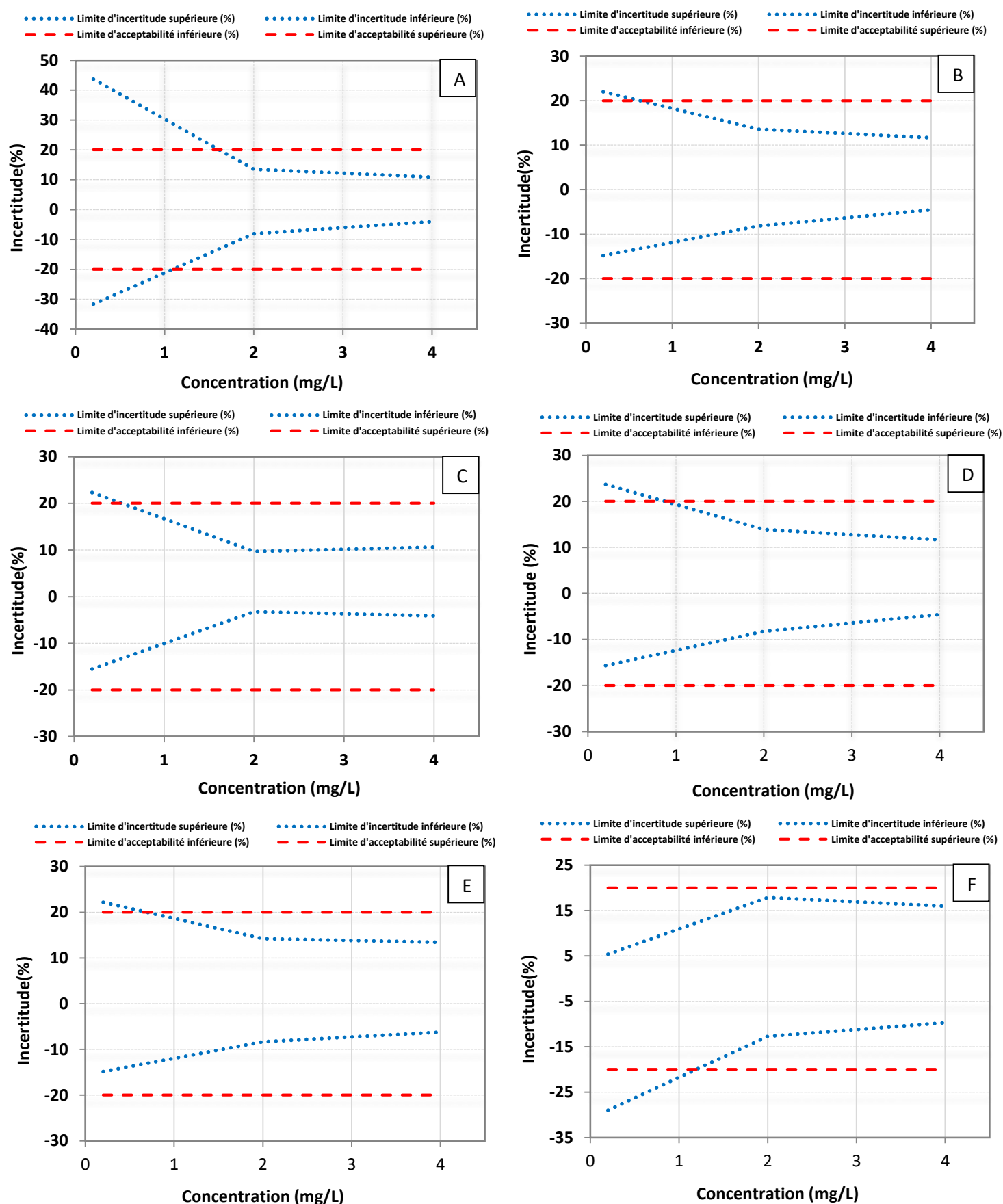


Figure III.9 : Profils d'incertitude de l'acide nicotinique après correction ($\beta = 80\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : linéaire simple, B : linéaire pondéré $1/X$, C : Quadratique, D : Racine carré, E : Logarithme, F : 0-max)

Comme prévu, les profils d'incertitude obtenus illustrent un élargissement attendu des intervalles d'incertitude puisqu'elles excèdent clairement les limites d'acceptabilité fixées à $\pm 20\%$ pour tous les modèles de régression étudiés. Cela confirme les résultats obtenus pour le nicotinamide et nous amène à déduire l'existence d'une relation entre l'incertitude de mesure et le β, γ -content tolérance intervalle. En effet, lorsqu'on augmente la valeur de β , l'incertitude de mesure augmente. Ce qui signifie l'importance du choix du paramètre β qui doit être basé sur un consensus entre l'analyste et l'utilisateur final.

8. Limite de quantification

La limite de quantification (LQ) est la plus petite quantité de la substance ciblée dans un échantillon qui peut être déterminée dans les conditions expérimentales prescrites avec une exactitude définie. Le profil d'incertitude permet d'estimer la limite de quantification (LQ) en se reposant sur l'approche algébrique basée sur les données de validation. Les valeurs obtenues sont résumées dans le Tableau III.14 suivant :

Niveaux de concentration	A	B
Concentration (mg/L)	0.400	2.000
Limite d'incertitude supérieure	0.466	2.264
Limite d'acceptabilité supérieure	0.480	2.400
Paramètres de la droite	Pente	Ordonnée à l'origine
Limite d'incertitude supérieure	1.123	0.016
Limite d'acceptabilité supérieure	1.200	0.000
Limite de quantification (mg/L)	0.216	

Tableau III.14 : Estimation de la LQ en utilisant les résultats de la validation du nicotinamide. ($\beta = 66.7\%$ et $\gamma = 90\%$ et λ de $\pm 20\%$).

La limite de quantification est donc de 0.216 mg/L. On peut aussi remarquer que l'ordonnée à l'origine de la droite correspondant à la limite d'acceptabilité est bien égale à 0, comme prévu.

Le Tableau III.15 réunit les valeurs des LQ obtenus en fonction des modèles de régression sélectionnés et pour différents valeurs de β . L'analyse de ces valeurs montre qu'elles sont marquées d'une différence importante en passant d'une proportion β à une autre et même d'une fonction de réponse à une autre. Les valeurs des LQ augmentent en passant de $\beta = 66.7\%$ à $\beta = 90\%$ et elles sont également différentes, pour une même proportion β , en fonction du modèle de régression choisi. Pratiquement, seules les valeurs provenant des profils où la procédure est valide, sur tous les niveaux de concentrations sont retenues.

Modèle	Limite de quantification (mg/L)		
	$\beta = 66.7\%$	$\beta = 80\%$	$\beta = 90\%$
Linéaire simple	0.216	0.374	0.998
Linéaire simple pondérée 1/X	-0.333	-0.784	6.852
Linéaire simple pondérée 1/X ²	-0.105	-0.115	-0.156
Quadratique	0.114	0.208	0.323
Quadratique 1/X	0.114	0.208	0.323
Quadratique 1/X ²	0.114	0.208	0.323
Racine carré	-0.556	-1.515	3.317
Racine carré 1/X	-0.161	-0.201	-0.403
Racine carré 1/X ²	-0.006	0.078	0.247
Logarithmique	-0.338	-0.552	-9.657
Logarithmique 1/X	-0.036	0.063	0.277
Logarithmique 1/X ²	0.079	0.195	0.362
0-max	-2.502	6.390	1.187

Tableau III.15 : Estimation de la LQ pour le nicotinamide en utilisant 13 modèles ($\beta = 66.7\%$, 80% et 90%).

Les résultats montrent que le passage d'une proportion de β à une autre est accompagné d'une variation remarquable des limites d'incertitude estimées, puis sur la validité de la procédure. Ensuite, les valeurs de la LQ seront effectivement influencées. En outre, LQ estimée est pratiquement la x-coordonnée de l'intersection de la limite d'acceptabilité λ et de la limite d'incertitude. Cela démontre clairement que ce dernier a un effet direct sur ce paramètre critique. Donc il est indispensable de choisir avec prudence la proportion β .

Par ailleurs, il est aussi évident que si on change la valeur de la limite d'acceptabilité, la LQ sera modifiée. Enfin, dans le cas où il est difficile d'établir une limite d'acceptabilité a priori mais où la LQ est un critère majeur, on peut ainsi proposer de fixer λ à rebours, en fonction de la LQ qu'on a besoin d'atteindre. C'est une situation qu'on peut rencontrer pour une méthode de contrôle d'un contaminant environnemental.

Il faut signaler que dans d'autres applications, il arrive que les limites d'incertitude coupent les limites d'acceptabilité : la concentration correspondante peut alors être définie comme une LQ. Cependant cette méthode n'est pas conseillée car la LQ risque d'être inexactement déterminée.

9. Discussion

Dans cette étude, nous avons appliqué notre nouvelle stratégie « profil d'incertitude » pour évaluer la validité d'une méthode HPLC pour le dosage des deux formes chimiques de la vitamine B3 dans le lait soit : le nicotinamide et l'acide nicotinique. Les différents résultats obtenus ont montré un ensemble de points à mettre en lumière.

- La génération de toutes les fonctions de réponse possibles est d'une grande importance puisque la fiabilité des résultats de validation dépend du modèle de régression sélectionné. En l'occurrence, la fonction de réponse a été évaluée à partir de 13 courbes d'étalonnage construites. Les profils d'incertitude obtenus nous ont permis de décider si un modèle d'étalonnage donnera des résultats de qualité suffisante. En conséquence, on sélectionne les modèles de régression qui d'une part, rencontrent les objectifs de la méthode et d'autre part, correspondent à l'utilisation en analyse de routine.
- Le biais de la méthode varie avec la concentration. D'ailleurs, il présente une erreur systématique marquante pour l'acide nicotinique ce qui cause la non-validité de la méthode tout au long du domaine d'application et montre un effet de matrice significatif qui nécessite une correction.
- Notre approche offre la possibilité de valider un facteur de correction qui sera utilisable de façon récurrente en routine. Elle répond à une préoccupation classique en analyse de traces lorsqu'il existe un effet de matrice non-négligeable qui est habituellement contourné par un ajout dosé sur chaque échantillon en routine.
- Les coefficients de variation obtenus montrent que la fidélité de la méthode est acceptable et que la capabilité de la méthode s'améliore aux hautes concentrations.
- Le profil d'incertitude permet de régler les conflits entre la justesse et la fidélité. Les approches classiques de validation les traitant séparément, on débouche parfois sur des conclusions ambiguës si seulement l'un des deux critères est satisfaisant.
- Trois voies de calcul ont été investies pour prédire l'intervalle de tolérance et approcher l'incertitude de mesure. Cette dernière est estimée à l'aide d'une formule innovante en utilisant les données de validation et sans avoir recours à d'autres expériences complémentaires. Nous avons enregistré que les 3 voies de calcul donnent des estimés d'incertitude comparables.
- L'estimation de l'incertitude de mesure a permis le calcul des intervalles d'incertitude ce qui a ouvert la possibilité de construire le profil d'incertitude et donc de décider aisément quant à la validité de la méthode étudiée.

- Le choix approprié de β , γ et λ est basé sur un consensus entre l'analyste et l'utilisateur final. Dans cette étude, les valeurs de γ et λ ont été fixées à 90% et 20% respectivement alors que β a été étudiée sur trois niveaux (66.7%, 80% et 90%). Ce qui donne une flexibilité d'application à l'intervalle de tolérance de type « β -content, γ -confidence » et donne la possibilité aux analystes de choisir les paramètres convenables selon l'étude envisagée.
- Le profil d'incertitude a rendu possible également le calcul exact de la limite de quantification (LQ) à l'aide d'une méthode algébrique simple pour différents modèles de régression et multiple valeurs de β .
- L'estimation de la limite de quantification est influencée par le choix des paramètres β , γ et λ d'où l'importance de planifier correctement la sélection des valeurs de ces paramètres.

A la lumière de ces résultats, nous avons montré que notre stratégie peut facilement être appliquée pour évaluer la performance des méthodes bioanalytiques, ainsi que d'évaluer l'incertitude des mesures en utilisant des informations obtenues à partir du processus de validation. En conséquence, l'expression de l'incertitude devient une extension naturelle de la validation des méthodes, ce qui est, pour les chimistes analytiques, un concept beaucoup mieux compris que l'approche classique et sera donc adoptée beaucoup plus facilement. Enfin, nous estimons que le fait de rassembler la validation et l'incertitude dans le même approche permet à l'analyste de contrôler le risque d'utiliser la méthode d'analyse en routine et d'avoir une information complète sur ses performances.

III. ETUDE COMPARATIVE ENTRE LE PROFIL D'INCERTITUDE ET L'APPROCHE ADOPTÉE PAR LA SFSTP

Pour démontrer davantage la flexibilité d'application du profil d'incertitude pour évaluer la performance des procédures bioanalytiques, nous allons conduire une analyse comparative de notre démarche (basée sur le β, γ -CTI) avec celle adoptée par la SFSTP (basée sur le β -ETI) à travers les résultats collectés en phase de validation de trois méthodes de séparation à savoir : HS-GC-MS, électrophorèse capillaire en milieu non aqueux et CE-ESI/MS. Il sera opportun de confronter les résultats obtenus par les deux approches en vue d'aider les analystes à sélectionner la stratégie convenable pour la validation de leurs méthodes bioanalytiques.

Pour calculer l'intervalle de tolérance et construire le profil d'incertitude, nous avons décidé de choisir plusieurs valeurs de β -content (66.7%, 80% et 90%) afin d'une part, de les comparer entre eux, et d'autre part, de les confronter avec les valeurs de β -expectation.

1. Méthode HS-GC-MS pour la détermination du monoxyde de carbone dans le sang humain

Dans cet exemple, Varlet et al. [76] ont développé une méthode rapide et sensible faisant appel à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse après introduction par espace de tête (HS-GC-MS), conçue pour la détermination systématique de la concentration de CO dans les laboratoires de toxicologie médico-légale. HS-GC/MS semble être la méthode de choix pour mesurer les niveaux de concentration de CO dans le sang. Néanmoins, le principal inconvénient est l'absence d'un standard interne liquide nécessaire pour effectuer une mesure quantitative, ainsi que des étalons de sécurité. La formation stœchiométrique de l'étalon interne de monoxyde de carbone marqué, par la réaction de l'acide formique avec l'acide sulfurique chaud, a permis la production de CO dans des conditions sûres. En utilisant du H^{13}COOH liquide, il est possible de générer avec précision le ^{13}CO comme étalon interne.

La méthode a été validée selon l'approche du SFSTP en utilisant le β -expectation tolérance intervalle pour construire les profils d'exactitude. Le plan expérimental pour l'étalonnage et la validation a été réalisée respectivement comme suit : $5 \times 3 \times 3 = 45$ et $3 \times 3 \times 3 = 27$. En tant que fonction de réponse, le modèle de régression linéaire simple a été sélectionné. La valeur de β -expectation a été choisie égale à 90% alors que les limites d'acceptabilité λ sont fixées à $\pm 30\%$. Le Tableau III.16 regroupe les résultats des paramètres principaux de validation de la méthode.

Concentration ($\mu\text{mol/mL}$)	Biais (%)	Répétabilité (%)	Fidélité intermédiaire (%)
0.25	4.000	1.174	1.270
1.00	-1.000	0.068	0.070
2.50	-2.000	0.083	0.100

Tableau III.16 : Paramètres de validation de la Méthode HS-GC-MS pour la détermination du monoxyde de carbone dans le sang humain.

Toutes ces données ont été exploitées pour estimer l'incertitude de mesure et construire le profil d'incertitude moyennant différents valeurs de β -content. Les différents résultats obtenus sont résumés dans les Tableaux III.17 et III.18. Les profils correspondants sont illustrés dans les Figures III.10 et III.11.

Concentration ($\mu\text{mol/mL}$)	β -Expectation tolérance intervalle ($\beta=90\%$)				β,γ -Content tolérance intervalle ($\beta=66.7\%$ et $\gamma=90\%$)			
	Incertitude (%)	Incertitude élargie (%)	Limites de tolérance (%)		Incertitude (%)	Incertitude élargie (%)	Limites d'incertitude (%)	
			Inférieure	Supérieure			Inférieure	Supérieure
0.25	1.358	2.716	1.417	6.583	1.691	3.382	0.62	7.32
1.00	0.074	0.148	-1.139	-0.861	0.089	0.178	-1.18	-0.82
2.50	0.109	0.217	-2.215	-1.786	0.141	0.281	-2.28	-1.72

Tableau III.17 : Résultats de validation de la Méthode HS-GC-MS pour la détermination du CO dans le sang humain par le profil d'exactitude ($\beta=90\%$) et le profil d'incertitude ($\beta=66,7\%$ et $\gamma=90\%$). (Limite d'acceptabilité $\lambda=30\%$).

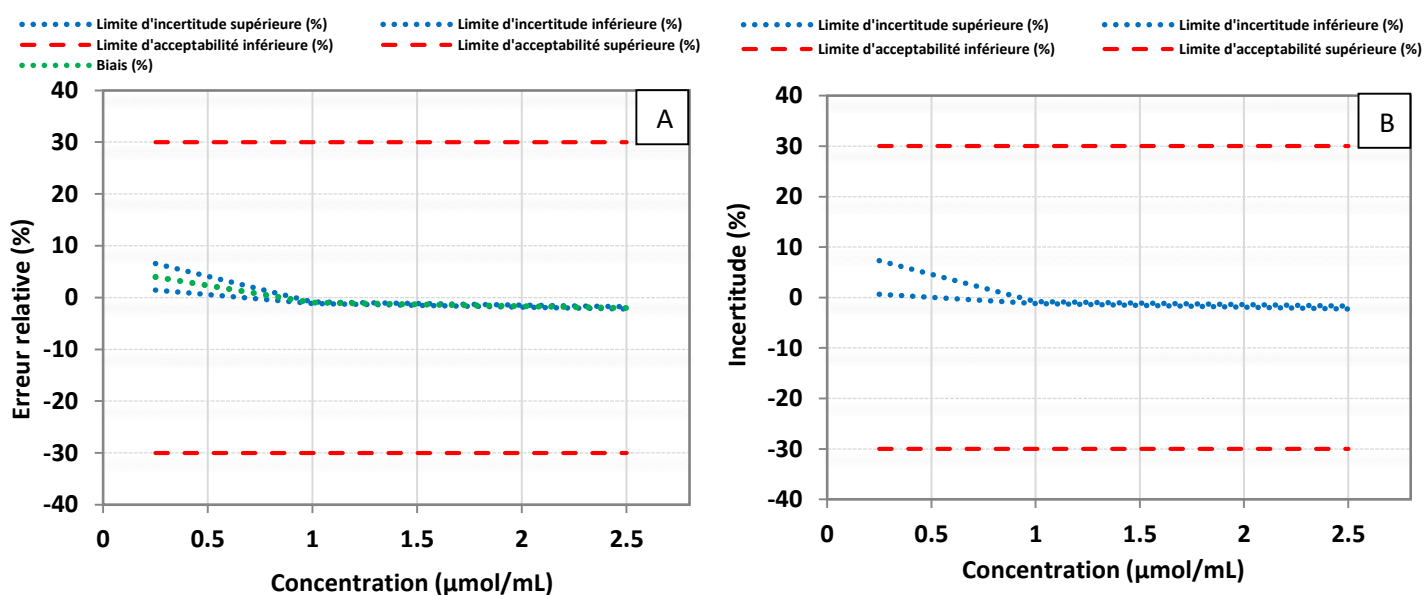


Figure III.10 : (A) : Profil d'exactitude ($\beta=90\%$) et (B) : Profil d'incertitude ($\beta=66,7\%$ et $\gamma=90\%$) de la méthode HS-GC-MS pour la détermination du CO dans le sang humain. (Limite d'acceptabilité $\lambda=30\%$).

A partir des résultats du Tableau III.17, on remarque que les incertitudes élargies relatives ne dépassent pas les limites d'acceptabilité fixées à 30% pour chaque niveau de concentration testé. Tout aussi important, on constate que l'incertitude de mesure estimée par le profil d'incertitude montre toujours une valeur plus grande que celle estimée par le profil d'exactitude.

La Figure III.10 montre clairement que les deux approches conduisent à la même décision : la validité de la méthode étudiée tout au long du domaine d'application, puisque les intervalles de tolérance et d'incertitude ne dépassent pas les limites d'acceptabilité fixées à $\pm 30\%$.

Concentration ($\mu\text{mol/mL}$)	β, γ -Content tolérance intervalle ($\beta=80\%$ et $\gamma=90\%$)				β, γ -Content tolérance intervalle ($\beta=90\%$ et $\gamma=90\%$)			
	Incertitude (%)	Incertitude élargie (%)	Limites d'incertitude (%)		Incertitude (%)	Incertitude élargie (%)	Limites d'incertitude (%)	
			Inférieure	Supérieure			Inférieure	Supérieure
0.25	2.229	4.459	-0.459	8.459	2.846	5.691	-1.691	9.691
1.00	0.117	0.234	-1.235	-0.766	0.150	0.299	-1.300	-0.701
2.50	0.185	0.371	-2.371	-1.629	0.236	0.473	-2.473	-1.527

Tableau III.18 : Résultats de validation de la Méthode HS-GC-MS pour la détermination du CO dans le sang humain par le profil d'incertitude ($\beta=80\%$, 90% et $\gamma=90\%$). (Limite d'acceptabilité $\lambda=30\%$)

La comparaison des résultats trouvés par le profil d'incertitude avec différents valeurs de β montre une augmentation de l'incertitude de mesure lorsqu'on change la valeur de β d'une manière croissante ce qui reflète l'existence d'une relation proportionnelle.

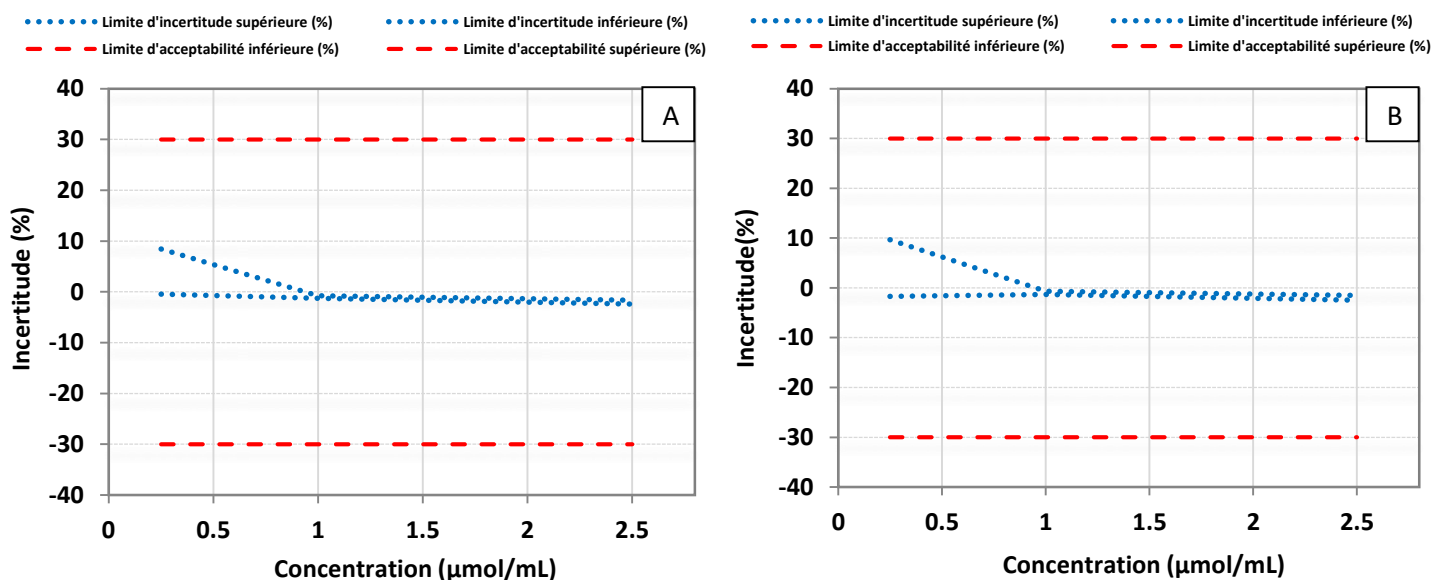


Figure III.11 : Profils d'incertitude de la méthode HS-GC-MS pour la détermination CO dans le sang humain. A : $\beta = 80\%$ et $\gamma = 90\%$ et B : $\beta = 90\%$ et $\gamma = 90\%$. (Limite d'acceptabilité $\lambda=30\%$).

Cette augmentation provoque un élargissement de l'intervalle d'incertitude mais sans qu'il dépasse les limites d'acceptabilité comme l'expose la Figure III.11. Ces résultats sont considérés très encourageants car ils impliquent que 90% des résultats futurs générés par la méthode seront inclus dans l'intervalle de tolérance calculé avec un niveau de confiance de 90%.

2. Electrophorèse capillaire pour la détermination de la pureté énantiomérique du S-timolol

Cette étude concerne la validation de la méthode d'électrophorèse capillaire en milieu non aqueux (NACE) pour la détermination de la pureté énantiomérique du maléate de S-timolol. Elle a été proposée par Marini et al. [77].

La validation de la méthode a été menée conformément aux recommandations du SFSTP en se basant sur le profil d'exactitude. La justesse, la répétabilité et la fidélité intermédiaire ont été évaluées sur trois séries de validation différentes. Les plans expérimentaux de calibration et de validation ont été successivement réalisés comme suit : $1 \times 3 \times 3 = 9$ et $4 \times 3 \times 3 = 36$. Le modèle de régression linéaire simple a été sélectionné comme fonction de réponse. Les principaux résultats de cette étude sont réunis dans le Tableau III.19.

Concentration (µg/mL)	Biais (%)	Répétabilité (%)	Fidélité intermédiaire (%)
2.00	6.07	1.8	1.8
5.00	-1.12	1.4	2.3
12.00	0.37	1.7	2.4
24.00	1.37	0.7	0.8

Tableau III.19 : Paramètres de validation de la méthode d'électrophorèse capillaire pour la détermination de la pureté énantiomérique du S-timolol.

Nous avons construit les profils d'incertitude à travers les données issues de cette étude. Les Tableaux III.20 et III.21 rassemblent les différents résultats obtenus alors que les Figures III.12 et III.13 présentent les profils correspondants.

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	β -Expectation tolérance intervalle ($\beta=90\%$)				β,γ -Content tolérance intervalle ($\beta=66.7\%$ et $\gamma=90\%$)			
	Incertitude (%)	Incertitude élargie (%)	Limites de tolérance (%)		Incertitude (%)	Incertitude élargie (%)	Limites d'incertitude (%)	
			Inférieure	Supérieure			Inférieure	Supérieure
2.00	1.840	3.68	2.64	9.51	1.960	3.92	2.15	9.99
5.00	2.555	5.11	-6.89	4.65	3.235	6.47	-7.59	5.35
12.00	2.690	5.38	-5.4	6.14	3.430	6.86	-6.49	7.23
24.00	0.915	1.83	-0.45	3.20	1.105	2.21	-0.84	3.58

Tableau III.20 : Résultats de validation de la méthode d'électrophorèse capillaire par le profil d'exactitude ($\beta=90\%$) et le profil d'incertitude ($\beta=66,7\%$ et $\gamma=90\%$). (Limite d'acceptabilité $\lambda = \pm 10\%$).

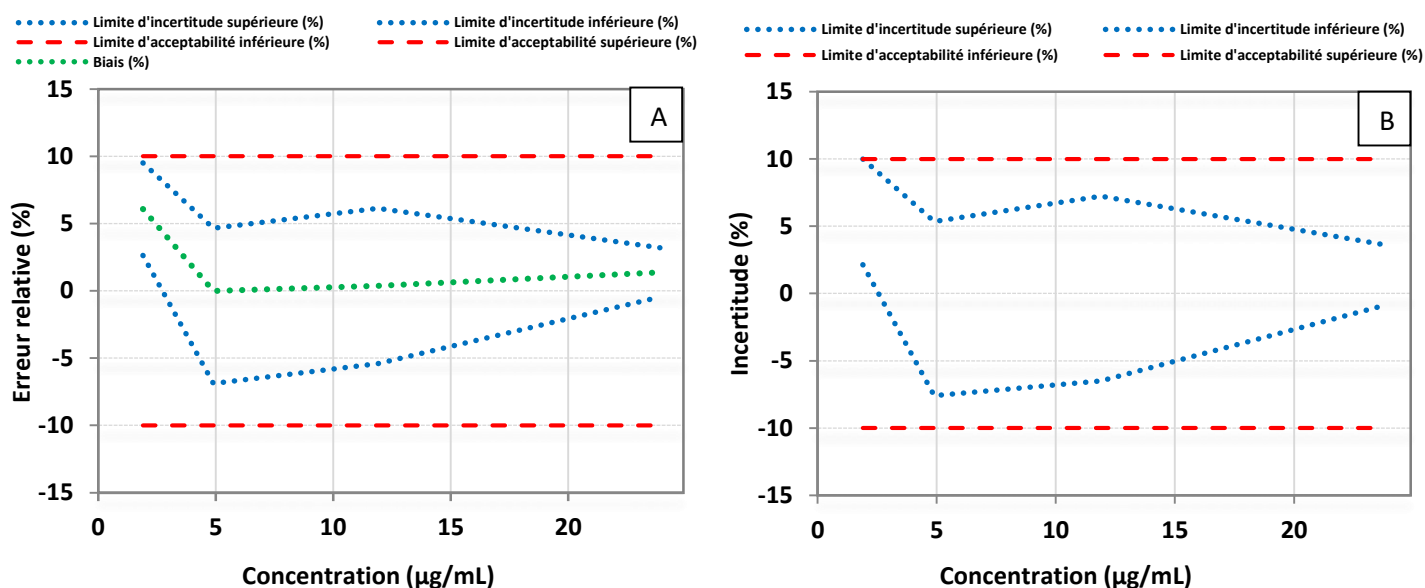


Figure III.12 : (A) : Profil d'exactitude ($\beta=90\%$) et (B) : Profil d'incertitude ($\beta=66,7\%$ et $\gamma=90\%$) de la méthode d'électrophorèse capillaire pour la détermination de la pureté énantiomérique du S-timolol. (Limite d'acceptabilité $\lambda = \pm 10\%$).

En confrontant les résultats obtenus via le profil d'exactitude avec ceux issues du profil d'incertitude, on voit distinctement qu'ils sont très similaires. La seule différence réside dans l'ampleur de l'intervalle caractérisée plus grande pour le profil d'incertitude.

Les limites supérieure et inférieure des intervalles de tolérance et d'incertitude exprimés en valeur relative (%) en fonction des concentrations introduites ne dépassent pas les limites d'acceptabilité fixées à $\pm 10\%$ pour tous les niveaux de concentration testés. Ainsi, la méthode est considérée comme valide. Ces résultats ont été confirmés par les incertitudes élargies relatives qui n'excèdent pas les limites d'acceptabilité.

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	β, γ -Content tolérance intervalle ($\beta=80\%$ et $\gamma=90\%$)				β, γ -Content tolérance intervalle ($\beta=90\%$ et $\gamma=90\%$)			
	Incertitude (%)	Incertitude élargie (%)	Limites d'incertitude (%)		Incertitude (%)	Incertitude élargie (%)	Limites d'incertitude (%)	
			Inférieure	Supérieure			Inférieure	Supérieure
2.00	2.906	5.812	0.258	11.882	3.713	7.425	-1.355	13.495
5.00	4.261	8.522	-9.642	7.402	5.430	10.860	-11.980	9.740
12.00	4.518	9.035	-8.665	9.405	5.759	11.518	-11.148	11.888
24.00	1.453	2.906	-1.536	4.276	1.854	3.708	-2.338	5.078

Tableau III.21 : Résultats de validation de la méthode d'électrophorèse capillaire par profil d'incertitude ($\beta=80\%$, 90% et $\gamma=90\%$). (Limite d'acceptabilité $\lambda = \pm 10\%$).

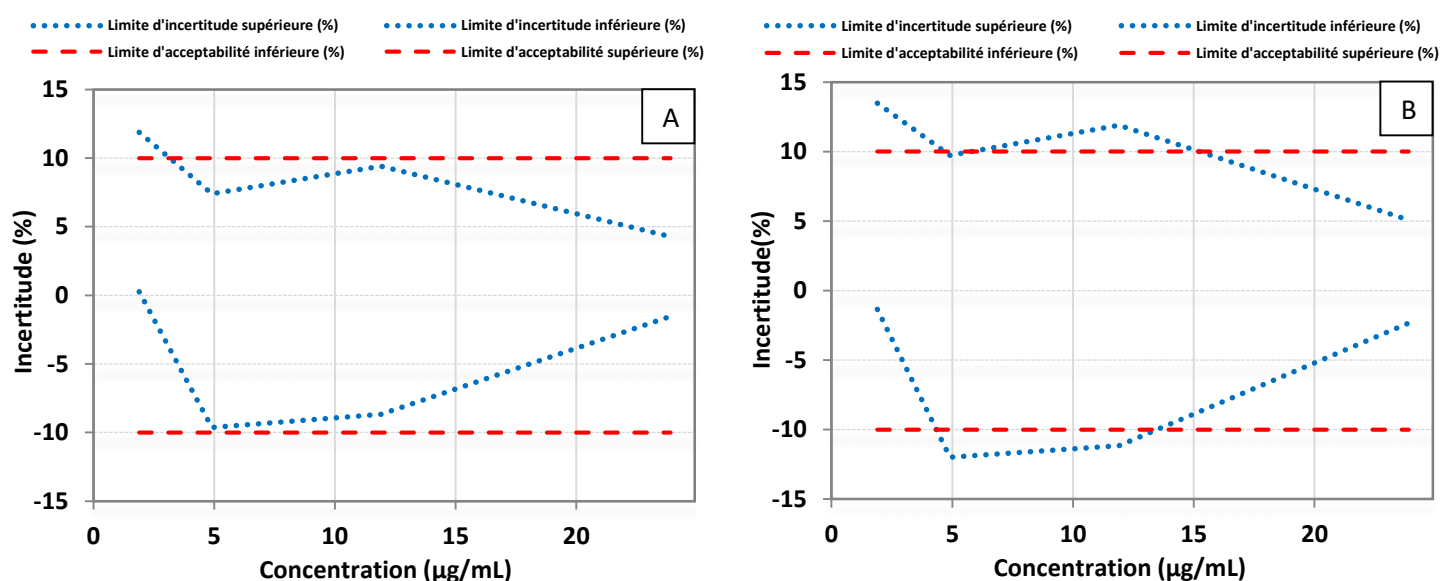


Figure III.13 : Profils d'incertitude de la méthode d'électrophorèse capillaire pour la détermination de la pureté énantiomérique du S-timolol. A : $\beta = 80\%$ et $\gamma = 90\%$ et B : $\beta = 90\%$ et $\gamma = 90\%$. (Limite d'acceptabilité $\lambda = \pm 10\%$).

Un examen des résultats illustrés par le Tableau III.21 et la Figure III.13 indique que la méthode étudiée est devenue invalide dans toute l'étendue du domaine d'application. Cette invalidation commence à apparaître par l'exclusion du niveau bas de concentration pour $\beta = 80\%$, cependant, la méthode est manifestée quasiment inacceptable pour $\beta = 90\%$ puisque les limites d'incertitude sortent totalement des limites d'acceptabilité pour multiple niveaux de concentration.

3. Méthode CE-ESI/MS pour la détermination de l'ecstasy et de la méthadone

Une méthode générique d'électrophorèse capillaire-ionisation par électronébuliseur spectrométrie de masse (CE-ESI/MS) a été développée pour la détermination énantiosélective de l'ecstasy et de la méthadone dans le plasma [78]. Les auteurs ont proposé, pour préparation d'échantillon, de prélever les sels et la plupart des protéines avant l'injection (précipitation de protéines, PP par rapport à l'extraction liquide-liquide, LLE) ainsi qu'un mode d'injection pour

améliorer la sensibilité par des procédures d'enrichissement d'échantillon (hydrodynamique, HD par rapport à l'électrocinétique, injections d'EK). Les procédures ont été entièrement validées par le profil d'exactitude selon le modèle expérimental suivant :

- Les standards d'étalonnage comprenaient des échantillons avec une matrice contenant des concentrations connues d'analytes et préparés de manière indépendante. Une série de trois niveaux correspondant à une concentration faible, moyenne et élevée a été sélectionnée. Les standards d'étalonnage ont été reproduits deux fois et préparés de manière indépendante en trois jours différents.
- Les standards de validation comprenaient des échantillons reconstitués dans la matrice contenant des concentrations connues d'analytes et préparés indépendamment. Trois répétitions indépendantes ont été préparées pour chaque niveau de concentration sur trois jours.

Les données relatives concernant les principaux paramètres de validation (biais, répétabilité et fidélité intermédiaire) sont reprises dans les Tableaux III.22 et III.23.

Concentration (ng/mL)	S(+)-MDMA			S(+)-MTD		
	Biais (%)	Répétabilité (%)	Fidélité intermédiaire (%)	Biais (%)	Répétabilité (%)	Fidélité intermédiaire (%)
0.25	-7.2	2.9	3.2	-2.5	2.5	8.3
2.50	3.2	6.1	6.8	-0.3	2.0	2.2
3.50	3.5	1.4	2.6	-2.3	2.3	2.3

Tableau III.22 : Paramètres de validation de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et de S-MTD dans le plasma traité par la procédure PP-HD.

Concentration (ng/mL)	S(+)-MDMA			S(+)-MTD		
	Biais (%)	Répétabilité (%)	Fidélité intermédiaire (%)	Biais (%)	Répétabilité (%)	Fidélité intermédiaire (%)
0.25	-4.7	4.4	4.4	1.1	10.2	10.2
2.50	0.8	2.5	2.5	1.8	2.3	2.8
3.50	-0.9	1.1	1.3	1.1	1.1	1.1

Tableau III.23 : Paramètres de validation de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et de S-MTD dans le plasma traité par la procédure LLE-EK.

Comme pour les exemples précédents, nous avons décidé de faire une analyse comparative du profil d'incertitude et du profil d'exactitude en tenant compte des valeurs de β . Pour cela nous nous sommes servis des données des Tableaux III.22 et III.23.

3.1. Procédure PP-HD

Les résultats obtenus au cours du processus de validation sont regroupés dans les Tableaux III.24 et III.25. Ensuite, les intervalles de tolérance et d'incertitude qui leurs conviennent sont tracés, ce qui permet une évaluation simple et rapide de l'exactitude actuelle et future de la méthode (Figures III.14 et III.15).

	Concentration (ng/mL)	β-Expectation tolérance intervalle (β=90%)				β,γ-Content tolérance intervalle (β=66.7% et γ=90%)			
		Incertitude (%)	Incertitude élargie (%)	Limites de tolérance (%)		Incertitude (%)	Incertitude élargie (%)	Limites d'incertitude (%)	
				Inférieure	Supérieure			Inférieure	Supérieure
S-MDMA	0.25	3.433	6.865	-13.500	-0.900	4.320	8.64	-15.84	1.44
	2.50	7.307	14.613	-10.000	16.300	9.245	18.49	-15.29	21.69
	3.50	2.929	5.857	-1.700	8.600	3.585	7.17	-3.67	10.67
S-MTD	0.25	9.511	19.022	-8.700	13.7	10.495	20.99	-23.49	18.49
	2.50	2.359	4.717	-4.500	4.000	2.965	5.93	-6.23	5.63
	3.50	2.424	4.848	-7.000	2.100	2.815	5.63	-8.03	3.23

Tableau III.24 : Résultats de validation par profil d'exactitude et profil d'incertitude de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et S-MTD dans le plasma traité par la procédure PP-HD.

Comme la montre le Tableaux III.24, la méthode est considérée comme valide par les deux approches comparés à savoir : le profil d'exactitude et le profil d'incertitude, car les intervalles de tolérance et d'incertitude ainsi que les incertitudes élargies sont inclus dans les limites d'acceptabilité de 30% pour tous les niveaux de concentration testés et ce pour le S-MDMA et le S-MTD.

L'analyse visuelle des profils illustrés dans la Figure III.14 confirme la décision de la validité de la méthode. Néanmoins, on constate toujours la caractérisation d'un intervalle plus étendu pour le profil d'incertitude par rapport au profil d'exactitude.

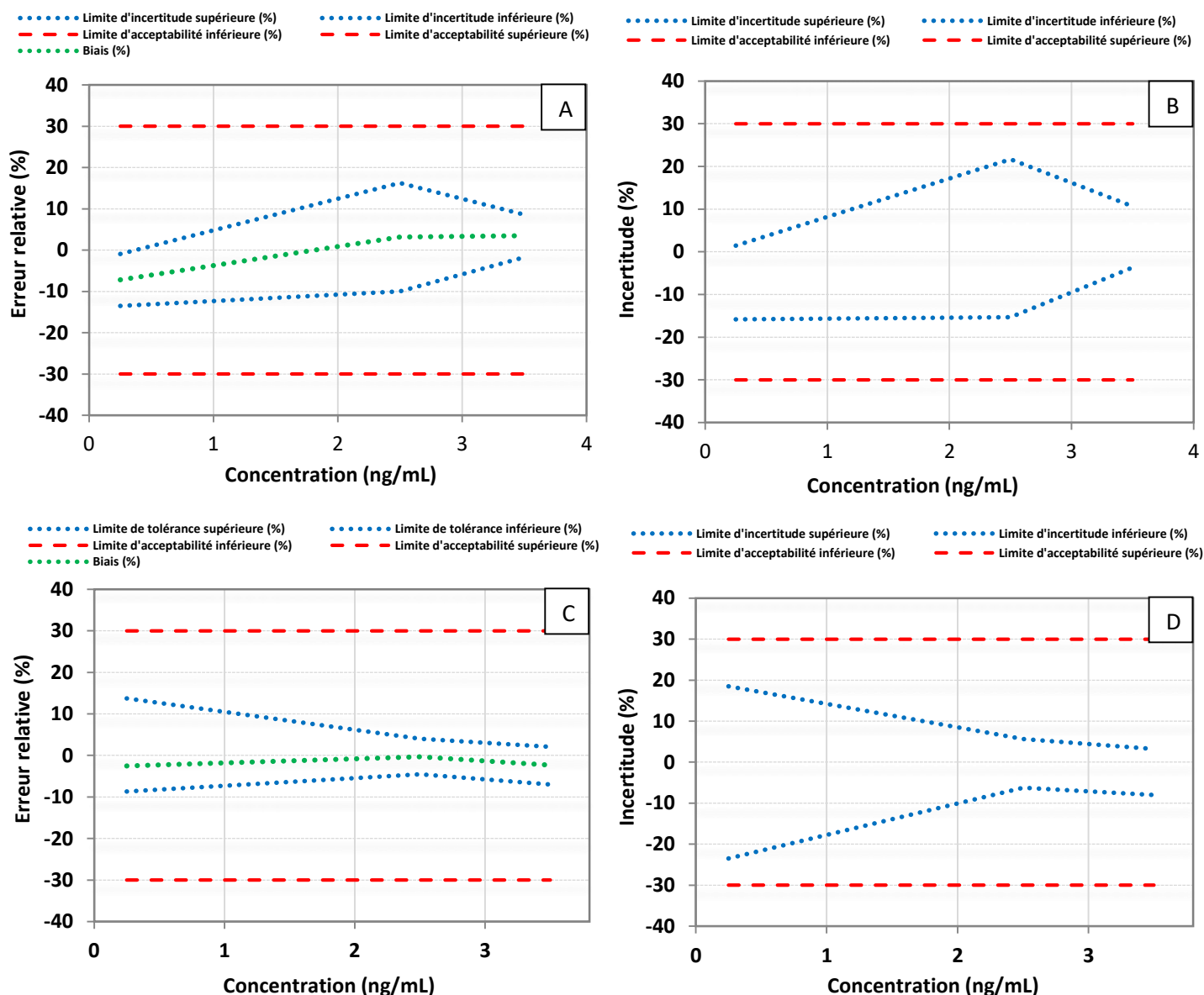


Figure III.14 : Profils d'exactitude (A : S-MDMA et C : S-MTD) et profils d'incertitude (B : S-MDMA et D : S-MTD) de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et S-MTD dans le plasma traité par la procédure PP-HD. Les limites d'acceptabilité sont fixées à 30%.

Pour le test de différentes valeurs de β (80% et 90%), les résultats du Tableau III.25 et de la Figure III.15 montrent que la méthode étudiée est déclarée valide entièrement juste pour le S-MDMA avec $\beta = 80\%$, alors que dans les autres cas, les intervalles d'incertitude excèdent les limites d'acceptabilité de 30%.

		β, γ -Content tolérance intervalle ($\beta=80\%$ et $\gamma=90\%$)				β, γ -Content tolérance intervalle ($\beta=90\%$ et $\gamma=90\%$)			
	Concentration (ng/mL)	Incertitude (%)	Incertitude élargie (%)	Limites d'incertitude(%)		Incertitude (%)	Incertitude élargie (%)	Limites d'incertitude (%)	
				Inférieure	Supérieure			Inférieure	Supérieure
S-MDMA	0.25	5.697	11.395	-18.595	4.195	7.271	14.542	-21.743	7.343
	2.50	12.185	24.370	-21.170	27.570	15.550	31.100	-27.900	34.300
	3.50	4.719	9.437	-5.937	12.937	6.012	12.024	-8.524	15.524
S-MTD	0.25	13.813	27.626	-30.127	25.127	17.594	35.188	-37.688	32.688
	2.50	3.909	7.817	-8.118	7.518	4.989	9.977	-10.277	9.677
	3.50	3.714	7.427	-9.727	5.127	4.744	9.488	-11.788	7.188

Tableau III.25 : Résultats de validation par le profil d'incertitude de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et S-MTD dans du plasma traité par la procédure PP-HD.

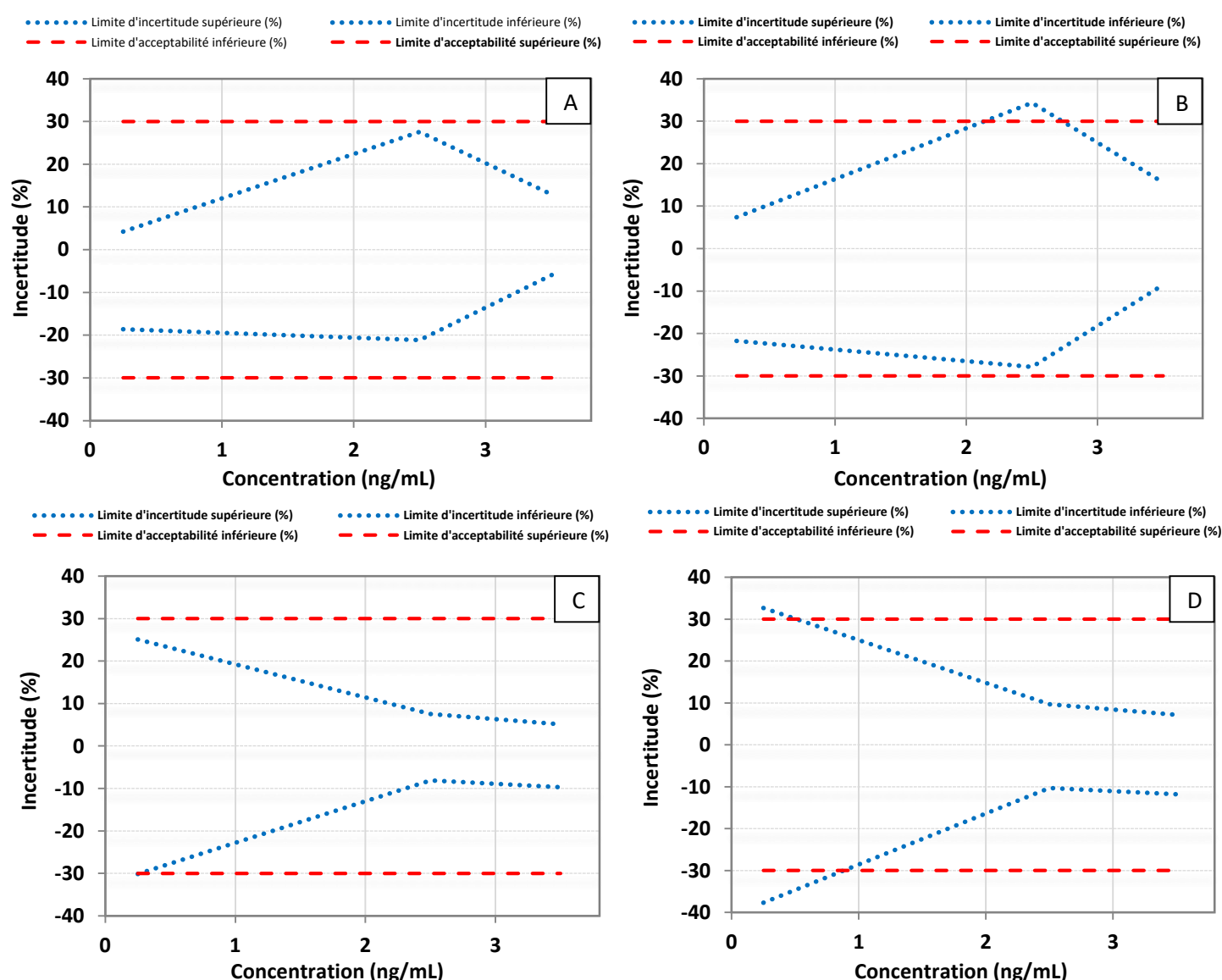


Figure III.15 : Profils d'incertitude de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et S-MTD dans le plasma traité par la procédure PP-HD. A : S-MDMA ($\beta = 80\%$), B : S-MDMA ($\beta = 90\%$), C : S-MTD ($\beta = 80\%$) et D : S-MTD ($\beta = 90\%$). Les limites d'acceptabilité sont fixées à 30%.

3.2. Procédure LLE-EK

Les données issues de la détermination de S-MDMA et S-MTD dans le plasma traité par la procédure LLE-EK sont exploitées pour la validation à l'aide du profil d'incertitude. Les résultats obtenus au cours du processus de validation sont regroupés dans les Tableaux III.26 et III.27. Ensuite, les intervalles de tolérance et d'incertitude qui leurs conviennent sont tracés et illustrés dans les Figures III.16 et III.17.

	Concentration (ng/mL)	β -Expectation tolérance intervalle ($\beta=90\%$)				β,γ -Content tolérance intervalle ($\beta = 66.7\%$ et $\gamma = 90\%$)			
		Incertitude (ng/mL)	Incertitude élargie (%)	Limites de tolérance (%)		Incertitude (ng/mL)	Incertitude élargie (%)	Limites d'incertitude (%)	
				Inférieure	Supérieure			Inférieure	Supérieure
S-MDMA	0.25	4.638	9.276	-13.30	3.80	5.385	10.77	-15.47	6.07
	2.50	2.635	5.270	-3.80	5.70	3.060	6.12	-5.32	6.92
	3.50	1.409	2.817	-3.50	1.70	1.815	3.63	-4.53	2.73
S-MTD	0.25	10.752	21.503	-18.70	210	12.485	24.97	-23.87	26.07
	2.50	3.046	6.091	-3.70	7.20	3.950	7.90	-6.10	9.70
	3.50	1.160	2.319	-1.00	3.20	1.345	2.69	-1.59	3.79

Tableau III.26 : Résultats de validation par le profil d'exactitude et le profil d'incertitude de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et S-MTD dans le plasma traité par la procédure LLE-EK.

Une analyse des résultats du Tableau III.26 et de la Figure III.16 montre une similarité des décisions prises quant à la validité de la méthode étudiée. En fait, tous les critères décisifs comme l'incertitude élargie donnent des résultats acceptables pour chaque niveau de concentration.

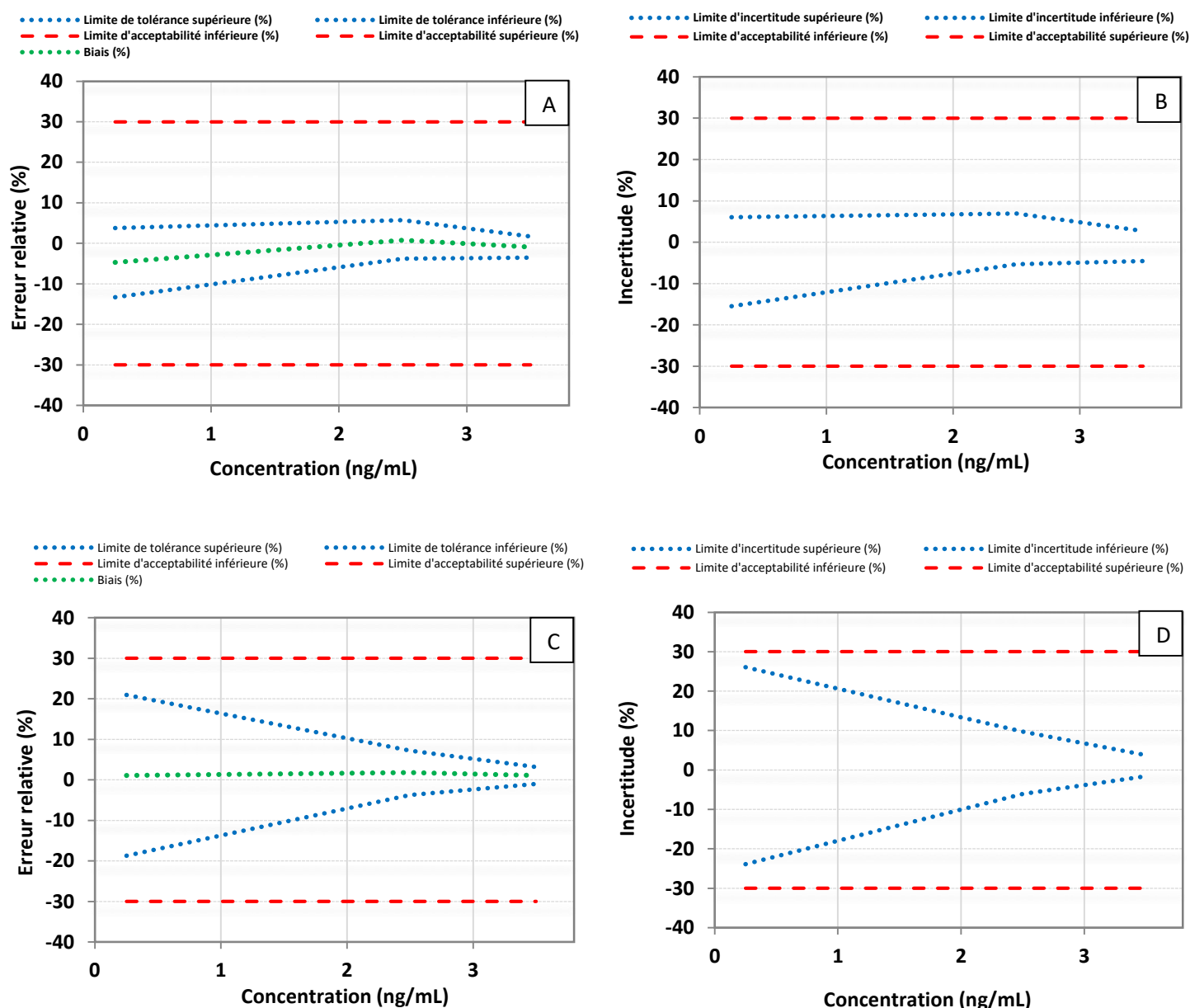


Figure III.16 : Profils d'exactitude (A : S-MDMA et C : S-MTD) et profils d'incertitude (B : S-MDMA et D : S-MTD) de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et S-MTD dans le plasma traité par la procédure LLE-EK. Les limites d'acceptabilité sont fixées à 30%.

Dans ce qui suit, nous avons testé les différentes valeurs de β (80% et 95%) choisies pour cette étude et les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau III.27 et la Figure III.17. La comparaison des différents profils montre bien une différence entre le S-MDMA et le S-MTD, pour le premier la méthode reste valide même après augmentation de β alors que pour le deuxième la méthode n'est pas valide du tout. Ce qui veut dire que pour valider la méthode de dosage du S-MTD il faut choisir une valeur de β basse comme 66.7%.

	Concentration (ng/mL)	β, γ -Content tolérance intervalle ($\beta=80\%$ et $\gamma=90\%$)				β, γ -Content tolérance intervalle ($\beta = 90\%$ et $\gamma = 90\%$)			
		Incertitude (ng/mL)	Incertitude élargie (%)	Limites d'incertitude(%)		Incertitude (ng/mL)	Incertitude élargie (%)	Limites d'incertitude (%)	
				Inférieure	Supérieure			Inférieure	Supérieure
S-MDMA	0.25	7.104	14.208	-18.908	9.508	9.075	18.151	-22.851	13.451
	2.50	4.036	8.073	-7.273	8.873	5.156	10.313	-9.513	11.113
	3.50	2.395	4.789	-5.689	3.889	3.055	6.109	-7.009	5.209
S-MTD	0.25	16.469	32.937	-31.837	34.037	21.038	42.076	-40.976	43.176
	2.50	5.204	10.407	-8.608	12.208	6.637	13.275	-11.475	15.075
	3.50	1.776	3.552	-2.452	4.652	2.269	4.538	-3.438	5.638

Tableau III.27 : Résultats de validation de la méthode d'analyse CE-MS pour la détermination quantitative de S-MDMA et S-MTD dans du plasma traité par la procédure LLE-EK par le profil d'incertitude.

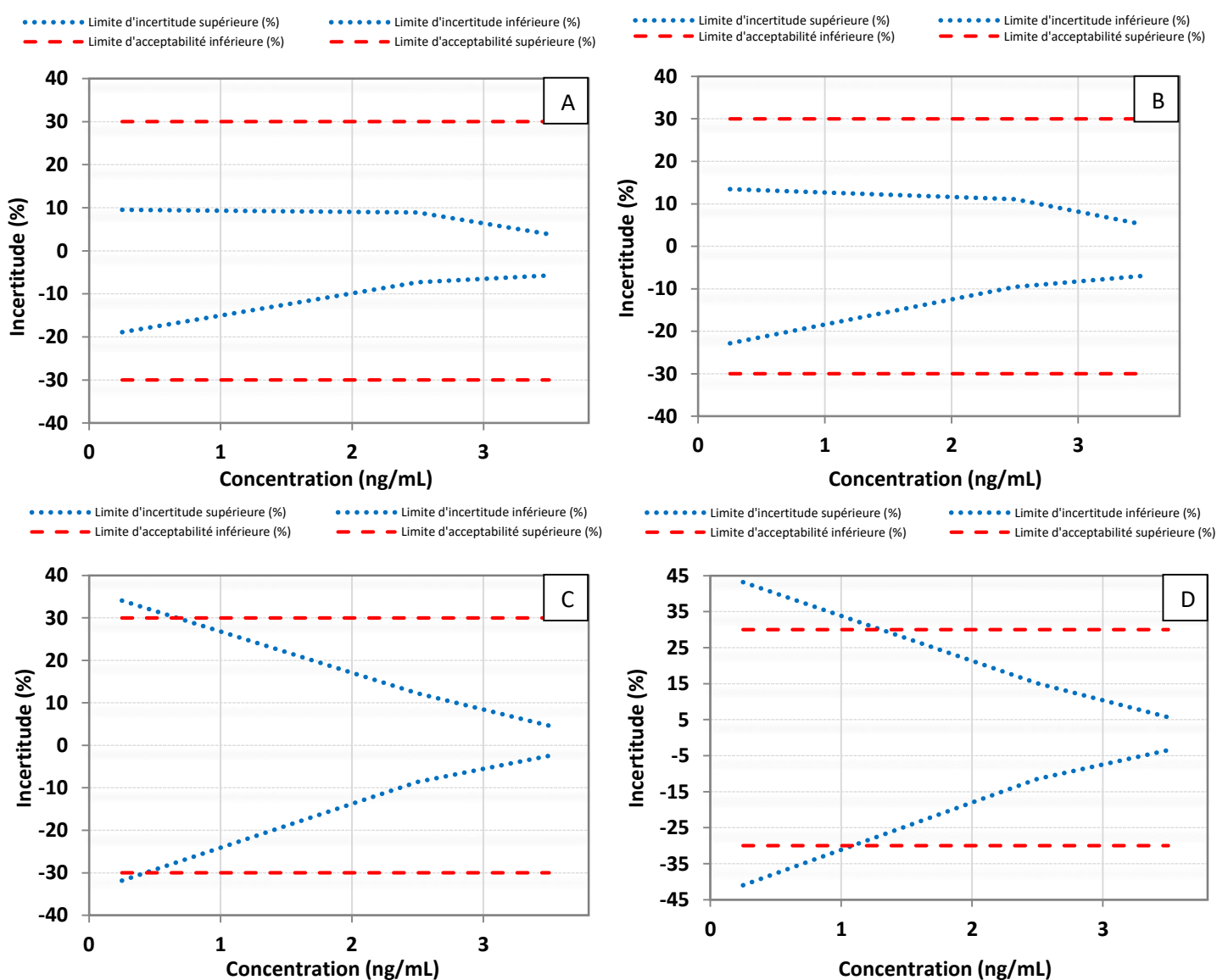


Figure III.17 : Profils d'incertitude de la méthode CE-MS pour la détermination de S-MDMA et S-MTD dans le plasma traité par la procédure LLE-EK. A : S-MDMA ($\beta = 80\%$), B : S-MDMA ($\beta = 90\%$), C : S-MTD ($\beta = 80\%$) et D : S-MTD ($\beta = 90\%$). Les limites d'acceptabilité sont fixées à 30%.

4. Discussion

Afin d'interpréter et comparer correctement les résultats fournis par une procédure analytique, leur fiabilité doit être confirmée. La validation est une première étape pour y parvenir, mais elle n'est pas suffisante. L'incertitude des mesures doit donc être également évaluée pour assurer la qualité du résultat. À cette fin, nous avons introduit le concept d'incertitude dans notre méthodologie de validation car, lorsqu'il est associé à une mesure, il peut fournir une indication quantitative de la qualité du résultat. Cette information est essentielle pour les analystes en matière de la prise des décisions critiques.

Dans cette étude, nous avons réussi à évaluer la performance de plusieurs méthodes de séparation analytique en appliquant le profil d'incertitude. Ainsi, nous avons montré que notre stratégie est un outil de décision puissant pour décider de la validité des méthodes analytiques et pour évaluer leur adaptation à leurs objectifs (Figures III.10-17). A travers les différents exemples présentés, nous avons prouvé que le profil d'incertitude peut être utilisé comme approche de validation pour différentes matrices et différentes techniques couramment rencontrées dans l'industrie pharmaceutique et biopharmaceutique. Son applicabilité universelle et sa souplesse en tant que méthodologie de validation efficace pour les techniques chromatographiques et électrophorétiques ont été démontrées (Tableau III.28). En outre, nous notons que notre stratégie permet de tester diverses fonctions de réponse.

Méthode	Analyte	Matrice	Modèle de régression
GC-MS	Monoxyde de carbone	Sang	Linéaire simple
NACE	S-Timolol	Produit pharmaceutique	Linéaire simple
CE-ESI/MS	Ecstasy et méthadone	Plasma	Linéaire simple après transformation racine carré

Tableau III.28 : Tableau récapitulatif montrant l'applicabilité du profil d'incertitude pour valider différentes méthodes de séparation analytique avec différentes matrices et différents modèles de régression.

Tout aussi important, l'utilisation de l'intervalle de tolérance de type « β -content, γ -confidence » a permis d'avoir une flexibilité d'application traduite par la possibilité de tester multiple valeurs de β (66.7%, 80% et 90%), ce qui donne aux analystes l'occasion de constater le changement de critères de décision (incertitude élargie, intervalle d'incertitude) par rapport à ces tests de β afin de choisir les paramètres convenables selon l'étude envisagée.

D'autre part, une analyse comparative du profil d'incertitude (basé sur le β, γ -CTI) avec le profil d'exactitude (basé sur le β -ETI) à travers les résultats de trois méthodes de séparation soit : HS-GC-MS, électrophorèse capillaire en milieu non aqueux et CE-ESI/MS, a été menée. Les résultats obtenus ont montré que les deux approches conduisent chaque fois à la même décision. Toutefois, l'approche basée sur le β, γ -content tolérance intervalle se caractérise par une incertitude de mesure grande que celle estimée par le β -expectation tolérance intervalle. Ce qui veut dire que la première approche prend en considération d'autres sources d'incertitude ce qui permet une meilleure estimation de l'incertitude de mesure.

De plus, nous avons réussi à estimer l'incertitude des résultats analytiques pour différents niveaux de concentration des différents exemples étudiés, sans avoir recours à d'autres expériences additionnels. En fait, nous avons proposé une formule originale pour estimer l'incertitude en fonction de l'intervalle de tolérance de type (β, γ -content). L'incertitude élargie a été calculée en utilisant un facteur de couverture de $k = 2$ représentant un intervalle autour des résultats où la valeur vraie inconnue peut être observée avec un niveau de confiance de 95%. Par conséquent, l'évaluation de l'incertitude avec cette nouvelle approche présente l'avantage que l'effort effectué pour vérifier la fidélité peut également être utilisé pour calculer l'incertitude des futures mesures de routine.

Pour soutenir ces conclusions, nous avons cherché des preuves dans l'exemple de Lecomte et al. [79]. En effet, les données fournies dans cet article permettent une comparaison entre l'incertitude estimée issue de la validation et celle des essais de routine d'une méthode bioanalytique. Pour ce faire, une nouvelle méthode de chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) a été utilisée. Cette méthode a été développée pour la détermination du cidofovir, un médicament antiviral, dans le plasma humain. À travers cet exemple, nous aimerions montrer que notre approche fournit une bonne estimation de l'incertitude de routine. Ainsi, le modèle III.1 a été testé pour effectuer une comparaison entre les estimations d'incertitude de mesure obtenues à partir de la validation de la méthode (β, γ -content tolérance intervalle) et celles obtenues à partir d'applications de routine d'une méthode chromatographique pour le dosage du cidofovir.

$$U_c = \beta_0 + \beta_1 C + \beta_2 \text{étude} + \beta_{12} \text{étude} \times C + \beta_{11} C^2 + \varepsilon \quad (III.1)$$

Avec U_c est l'incertitude, C est la concentration de cidofovir en (ng/mL) et ε est l'erreur résiduelle supposée normalement distribuée $N(0, \sigma^2)$. Le vecteur β_2 modélise l'effet du type d'étude. Le vecteur β_{12} modélise l'effet de l'interaction entre la concentration de cidofovir et le type d'étude.

Contraste par test t		
Comparaison	$U_{\text{validation}}$ vs. U_{routine1}	$U_{\text{validation}}$ vs. U_{routine2}
Différence estimée	1.092	9.132
S.E.	5.008	5.008
t -ratio	0.218	1.823
p-value	0.8381	0.1423
t_{tableau}	2.776	

Tableau III.29 : Comparaison de l'incertitude de mesure obtenue lors de la validation de la méthode (β, γ -content tolérance intervalle) avec celle obtenue lors de l'utilisation en routine de la méthode chromatographique pour la détermination du cidofovir.

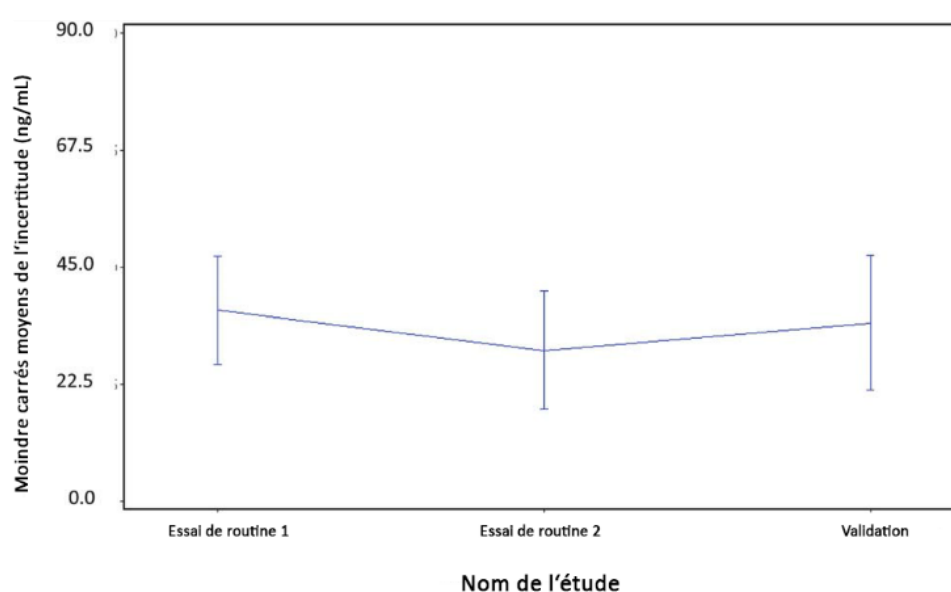


Figure III.18 : Tracé des moindres carrés moyens d'incertitude en fonction des études de validation (β, γ -content tolérance intervalle), essai de routine 1 et essai de routine 2.

Le coefficient de détermination R^2 de ce modèle est égal à 0.97, ce qui signifie que l'incertitude est correctement modélisée par cette régression polynomiale. Après la validation du modèle, nous avons procédé à une comparaison statistique des différentes estimations d'incertitude obtenues dans divers ensembles d'études. En effet, diverses hypothèses ont été testées en utilisant le contraste par test t . Les contrastes estimés présentés dans le Tableau III.29 montrent clairement que les estimations des incertitudes de $U_{\text{validation}}$, U_{routine1} et U_{routine2} ne sont pas significativement différentes. Ce résultat est évident lorsqu'on regarde le graphique de la Figure III.18. On peut donc dire que le grand avantage de notre stratégie est qu'elle donne une meilleure approximation de l'incertitude de routine en utilisant les informations générées dans le processus d'évaluation de la validité d'une procédure analytique.

IV. CONCLUSION

Au terme de ce chapitre, nous avons montré que la stratégie du profil d'incertitude peut être retenue pour évaluer les performances des méthodes d'analyse bioanalytiques, ainsi que pour évaluer l'incertitude des résultats de mesure en utilisant les informations obtenues à partir du processus de validation. En conséquence, l'expression de l'incertitude devient une extension naturelle de la validation des méthodes et l'adoption de cette stratégie par les analystes est rendue aisée par rapport à celle classique.

Dans l'ensemble, nous avons appliqué notre stratégie, basée sur l'intervalle de tolérance de type β, γ -content, pour la validation d'une méthode de détermination de la vitamine B3 dans le lait par HPLC avec détection fluorométrique, tout en examinant 13 fonctions de réponses et en utilisant trois approches chimiométriques. À travers cette étude détaillée, nous avons pu montrer l'efficacité du profil d'incertitude nonobstant la variabilité des données ou la présence d'un effet de matrice.

Afin d'étayer cette affirmation, la stratégie du profil d'incertitude a été également appliquée pour valider d'autres procédures de séparation dans le cadre d'une étude comparative avec le profil d'exactitude. Ainsi, toutes les décisions sont significativement très proches de celles prises par profil d'exactitude. Néanmoins, le profil d'incertitude utilise le concept d'incertitude et l'idée de l'utiliser est en harmonie avec l'objectif d'une méthode d'analyse. Il présente l'avantage de quantifier aussi précisément que possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire devra déterminer.

En conclusion, cette originale approche se caractérise par :

- L'évaluation correcte des critères de validation ;
- La possibilité de corriger les données via un facteur de correction ;
- L'étude de différentes fonctions de réponse afin de sélectionner les modèles de régression appropriés ;
- La flexibilité d'application basée sur l'utilisation du β, γ -content tolérance intervalle ;
- L'applicabilité universelle pour différentes matrices et différentes procédures d'analyse ;
- L'estimation de l'incertitude de mesure à l'aide d'une formule novatrice moyennant trois voies de calculs différentes ;
- Et, enfin, la prédiction du comportement futur de la méthode analytique lors de son application en routine afin d'assurer la fiabilité des décisions qui seront basées sur ses résultats.

Chapitre IV

Validation des Méthodes Microbiologiques par Approche du Profil d'Incertitude

I. INTRODUCTION

Actuellement, il est bien connu que les méthodes microbiologiques sont très cruciales en raison de leur rôle et de leur efficacité dans l'évaluation de la contamination des échantillons par des micro-organismes. En outre, les analyses microbiologiques restent indispensables pour la maîtrise de la sécurité sanitaire des aliments [80] et de l'eau potable [81]. Les microbiologistes doivent vérifier que leurs méthodes sont applicables pour les dénombrements bactériens, puis donner leur confiance dans la validité des résultats fournis aux clients. Néanmoins, la validation des méthodes microbiologiques n'est pas similaire à celle des procédures analytiques et bioanalytiques. Dans le domaine de la microbiologie, la validation est effectuée par comparaison entre une méthode alternative et une méthode de référence normalisée.

À cet égard, la norme ISO 16140 [80] est un document d'information clé pour les microbiologistes. Il propose, séparément, des protocoles de validation pour les méthodes quantitatives et qualitatives en comparant une méthode alternative avec une méthode de référence. Une exigence essentielle de l'ISO 16140 pour la validation quantitative des méthodes microbiologiques est l'organisation d'une étude interlaboratoire conformément aux recommandations de l'ISO 5725 [82]. L'acceptation d'une telle procédure par les microbiologistes démontre que cette approche collaborative classique peut également être mise en œuvre, de même que les méthodes analytiques chimiques, et que l'instabilité de l'échantillon biologique souvent réclamée et les contraintes organisationnelles ne posent aucun problème [83].

Dans ce contexte, nous proposons par le présent chapitre d'élargir le domaine d'application du profil d'incertitude dans le but de démontrer son universalité. Ainsi, le profil est appliqué en vue d'évaluer la performance des méthodes Microbiologiques. En effet, la stratégie innovante développée dans le cadre de cette thèse, est exploitée dans deux domaines de la Microbiologie à savoir : la Microbiologie de l'eau et des aliments. L'objectif est d'expliquer éventuellement comment cette démarche à caractère holistique peut être efficacement appliquée conformément aux guidelines de la norme ISO 16140 dans le cadre d'une étude interlaboratoire.

1. Caractéristiques d'une méthode microbiologique

Il convient de noter qu'une méthode de comptage microbiologique présente plusieurs points qui la différencient des autres méthodes analytiques [72] :

- Les mesures sont des énumérations sur des boîtes de Pétri et non des réponses instrumentales.

- Les données ont été recueillies par plusieurs laboratoires et nous sommes en conditions de reproductibilité au lieu de fidélité intermédiaire.
- C'est une méthode directe qui n'utilise pas d'étalonnage.
- Comme il n'y a pas de matériaux étalon ou de matériaux de référence, les valeurs de référence sont établies à l'aide d'une méthode de référence officielle [80].

II. METHODE COLILERT-18/QUANTI-TRAY POUR LE DENOMBREMENT DES BACTERIES ESCHERICHIA COLI DANS L'EAU POTABLE

L'exemple choisi pour cette étude concerne la validation d'une méthode alternative (Colilert-18/Quanti-Tray) [84] pour le dénombrement des bactéries *Escherichia coli* dans l'eau potable par rapport à une procédure de référence (ISO 9308-1) [85]. Les auteurs [86] ont montré que la méthode Colilert-18 a été soumise à validation en suivant les instructions de la norme ISO 16140 dans le cadre d'une étude interlaboratoire collaborative.

Afin d'assurer l'homogénéité des variances étant donné que les dénombrements microbiologiques ne sont pas normalement distribués, toutes les données ont été transformées en logarithme décimal pour mieux interpréter les résultats.

1. Domaine d'application

Le domaine d'application de la méthode étudiée est le suivant :

- Les limites d'acceptabilité sont fixées à $\pm 0.3 \log$ (CFU/100 mL).
- L'étude à 3 niveaux de contamination artificielle a été menée par 11 laboratoires avec 2 répétitions.
- Les données ont été collectées conformément aux consignes de la norme ISO 16140 dans le cadre d'une étude interlaboratoire collaborative.
- Dans le but de sélectionner les valeurs des paramètres β et γ les plus adaptées aux méthodes microbiologiques, nous avons jugé utile de tester divers choix ($\beta = 66.7\%$, 80% et $\gamma = 90\%$, 95%).
- Les valeurs de référence sont égales aux médianes calculées à partir des résultats obtenus par la méthode de référence pour chaque niveau de contamination. Pour les niveaux bas, moyens et hauts, les médianes en $\log$ (CFU/100 mL) sont : 1.000, 1.716 et 2.049, respectivement.

2. Résultats et discussion

Au cours de cette étude, le profil d'incertitude a été construit en utilisant trois méthodes chimiométriques à partir des données brutes collectées par le laboratoire organisateur. Pour les trois niveaux de concentration, des critères de validation tels que : biais, répétabilité, reproductibilité, ont été calculés pour la méthode alternative (Tableau IV.1).

Niveaux de contamination (log CFU/100 mL)	Biais (log CFU/100 mL)	Répétabilité (log CFU/100 mL)	Effet inter-laboratoires (log CFU/100 mL)	Reproductibilité (log CFU/100 mL)
1.000	0.024	0.141	0.092	0.168
1.716	0.055	0.093	0.081	0.123
2.049	0.093	0.099	0.141	0.172

Tableau IV.1 : Paramètres de validation de la méthode alternative.

Par la suite, l'incertitude de mesure a été calculée pour chaque niveau de contamination ce qui a permis de trouver les incertitudes élargies ainsi que les limites d'incertitudes. Le Tableau IV.2 présente les résultats importants obtenus pour différents valeurs de β et γ étudiées en utilisant trois approches chimiométriques. L'illustration graphique de ces résultats est présentée dans la Figure VI.1.

β -content	γ -confidence	Approche	Valeur cible (Log CFU/100 mL)	Incertitude (Log CFU/100 mL)	Incertitude Elargie (Log CFU/100 mL)	Limites d'incertitude (Log CFU/100 mL)	
						Inférieure	Supérieure
0.667	0.90	Satterthwaite	1.000	0.129	0.258	-0.234	0.282
			1.716	0.096	0.191	-0.137	0.246
			2.049	0.136	0.271	-0.178	0.364
		Monte Carlo	1.000	0.132	0.264	-0.240	0.288
			1.716	0.097	0.194	-0.140	0.249
			2.049	0.136	0.272	-0.181	0.366
		MLS	1.000	0.129	0.258	-0.234	0.282
			1.716	0.094	0.187	-0.119	0.255
			2.049	0.135	0.270	-0.178	0.363
0.667	0.95	Satterthwaite	1.000	0.117	0.234	-0.209	0.257
			1.716	0.087	0.174	-0.119	0.228
			2.049	0.123	0.246	-0.153	0.339
		Monte Carlo	1.000	0.118	0.237	-0.213	0.261
			1.716	0.088	0.176	-0.121	0.230
			2.049	0.123	0.247	-0.154	0.340
		MLS	1.000	0.117	0.233	-0.210	0.257
			1.716	0.087	0.173	-0.118	0.228
			2.049	0.122	0.245	-0.152	0.338
0.80	0.90	Satterthwaite	1.000	0.341	-0.317	0.364	0.171
			1.716	0.253	-0.198	0.308	0.127
			2.049	0.359	-0.266	0.451	0.179
		Monte Carlo	1.000	0.175	0.350	-0.326	0.373
			1.716	0.129	0.258	-0.203	0.313
			2.049	0.181	0.361	-0.269	0.454
		MLS	1.000	0.171	0.342	-0.318	0.366
			1.716	0.127	0.253	-0.198	0.308
			2.049	0.179	0.358	-0.265	0.451
0.80	0.95	Satterthwaite	1.000	0.309	-0.285	0.333	0.155
			1.716	0.230	-0.175	0.285	0.115
			2.049	0.326	-0.233	0.418	0.163
		Monte Carlo	1.000	0.157	0.313	-0.290	0.337
			1.716	0.116	0.231	-0.177	0.286
			2.049	0.163	0.326	-0.234	0.419
		MLS	1.000	0.155	0.309	-0.285	0.333
			1.716	0.115	0.229	-0.174	0.284
			2.049	0.162	0.324	-0.231	0.417

Tableau IV.2 : Résultats de validation de la méthode alternative en utilisant le profil d'incertitude.
(Limite d'acceptabilité λ est de $\pm 0.3 \log \text{CFU}/100 \text{ mL}$).

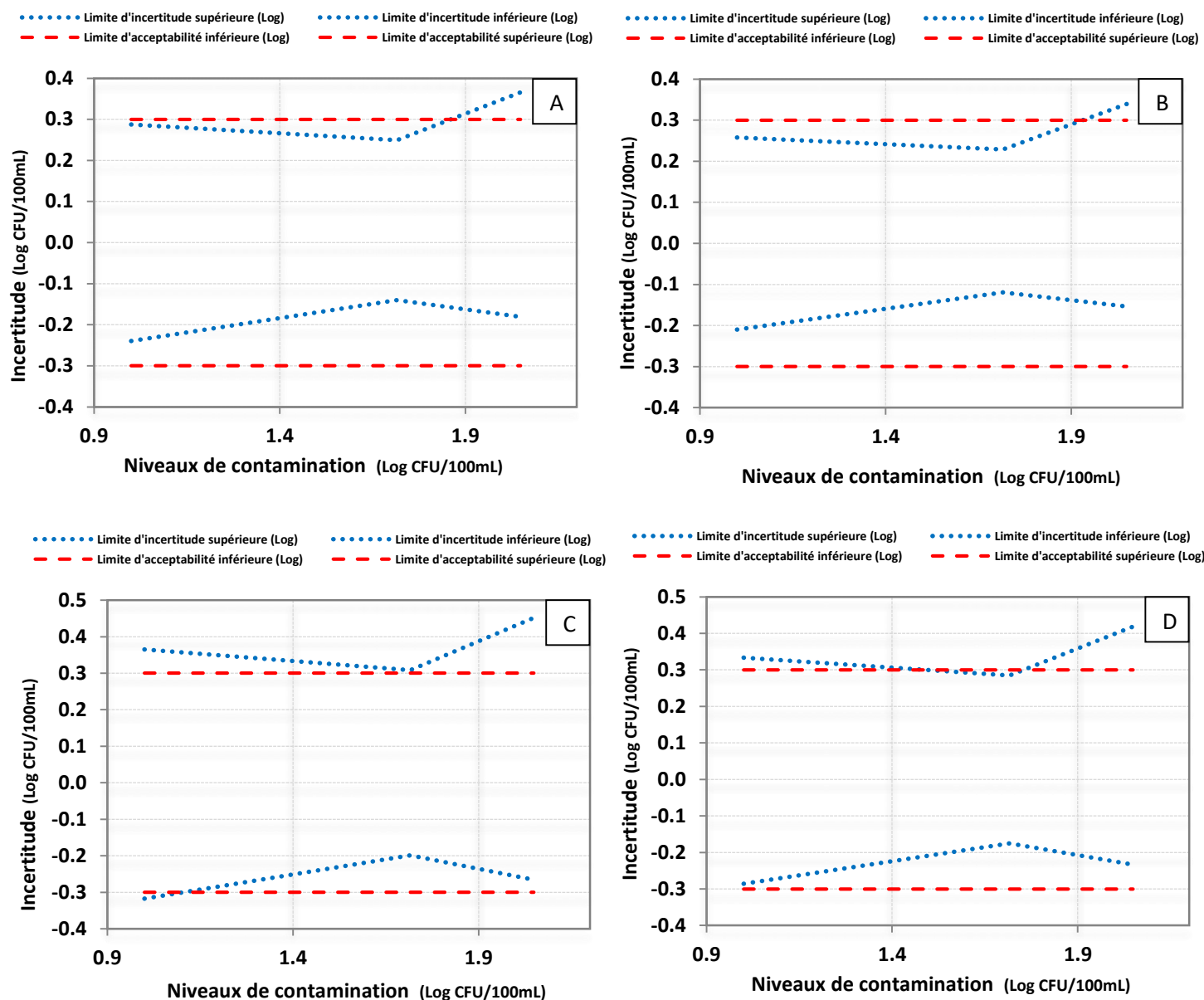


Figure IV.1 : Profils d'incertitude de la méthode alternative (A : $\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$, B : $\beta = 66.7\%$, $\gamma = 95\%$, C : $\beta = 80\%$, $\gamma = 90\%$ et D : $\beta = 80\%$, $\gamma = 95\%$). (λ de ± 0.3 log CFU/100 mL).

L'examen des différents résultats obtenus montre que :

- La comparaison des différents profils illustre bien une différence entre les intervalles d'incertitude, c'est à dire, lorsqu'on change les valeurs des paramètres β et γ , le profil d'incertitude change automatiquement.
- Pour une proportion de β égale à 66.7% et un degré de confiance γ égal à 90% et 95%, nous observons que la procédure alternative est valide sur un domaine de validité n'incluant pas le niveau haut, puisque les intervalles d'incertitude sont inclus dans les limites d'acceptabilité fixées à ± 0.3 log CFU/100 mL, seulement pour les niveaux de contamination bas et moyen.

- En revanche, la méthode est déclarée invalide pour une proportion de β égale à 80% et un degré de confiance γ égal à 90% et 95%, puisque la quasi-totalité des limites d'incertitude excèdent les limites d'acceptabilité.
- L'incertitude élargie a été calculée en utilisant un facteur de couverture de $k = 2$ estimant un intervalle autour des résultats avec un niveau de confiance de 95%. On constate également que l'incertitude élargie varie en fonction de la contamination bactérienne.
- Sur la figure on note qu'il existe une concentration seuil au-dessus de laquelle la méthode alternative est incapable de garantir la fiabilité des résultats. Elle correspond à l'intersection entre la limite d'incertitude et la limite d'acceptabilité.
- Le niveau de contamination correspondant à l'intersection peut être noté la limite supérieure de quantification (LQS) de la méthode alternative et déduit graphiquement par projection sur l'axe des abscisses. Cependant, cette valeur n'est pas supportée tant que les données seront corrigées afin de valider la méthode sur l'ensemble du domaine étudié. De plus, nous allons présenter une autre méthode pour estimer exactement la LQ.

L'évaluation de l'incertitude de mesure montre une valeur élevée observée pour le niveau de contamination haut (2.049 log CFU/100 mL) et qui a provoqué le dépassement des intervalles d'acceptabilité par la limite d'incertitude supérieure comme le montre la Figure IV.1. Cela peut être dû en grande partie aux causes suivantes :

- Un biais dû à un effet de matrice qui influence de manière significative sur les résultats.
- La dissemblance dans les procédures de comptage entre la méthode de référence et la méthode alternative [86].
- Les effets inter-laboratoires, puisque les données ont été recueillies dans le cadre d'une étude interlaboratoire, et les intervalles d'incertitude ont été calculés en tenant compte de la reproductibilité dans l'estimation de l'incertitude.

Il peut être intéressant de tester l'ajustement du biais observé en appliquant un facteur de correction. Afin de le calculer, la linéarité doit être vérifiée entre les données de la méthode de référence ($C_{référence}$) et celles de la méthode alternative ($C_{alternative}$) comme illustré graphiquement sur la Figure IV.2. Il semble clair qu'il existe une relation proportionnelle entre les deux méthodes ce qui est conforme au concept de linéarité.

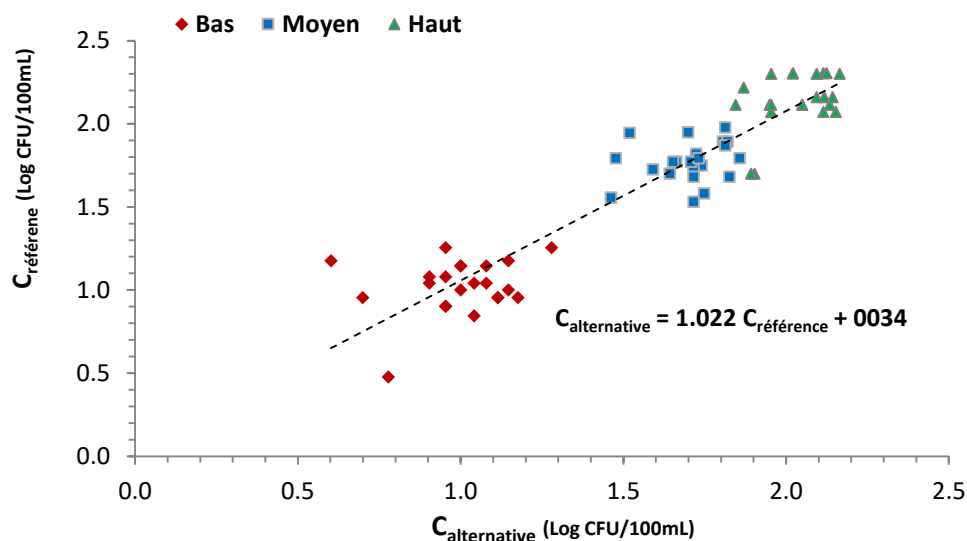


Figure IV.2 : Vérification de la linéarité (Bas, moyen et haut sont les trois niveaux de contamination).

La Figure 17 montre le très bon ajustement linéaire entre la méthode de référence et la méthode alternative, qui se traduit par la valeur de la pente égale à 1.02. Le facteur de correction proposé est égal à l'inverse de cette pente, c'est-à-dire $1/1.022 \approx 0.98$. Tous les calculs sont refaits, comme décrit précédemment, et de nouvelles limites d'incertitude sont présentées dans le Tableau IV.3. De même, des nouveaux profils d'incertitude peuvent être établis (Figure IV.3).

β -content	γ -confidence	Approche	Valeur cible (Log CFU/100 mL)	Incertitude (Log CFU/100 mL)	Incertitude Elargie (Log CFU/100 mL)	Limites d'incertitude (Log CFU/100 mL)	
						Inférieure	Supérieure
0.667	0.90	Satterthwaite	1.000	0.126	0.253	-0.248	0.256
			1.716	0.094	0.188	-0.168	0.207
			2.049	0.133	0.266	-0.215	0.315
		Monte Carlo	1.000	0.129	0.258	-0.254	0.262
			1.716	0.095	0.190	-0.171	0.210
			2.049	0.134	0.267	-0.217	0.317
		MLS	1.000	0.127	0.253	-0.249	0.257
			1.716	0.094	0.187	-0.168	0.207
			2.049	0.133	0.265	-0.215	0.315
0.667	0.95	Satterthwaite	1.000	0.115	0.229	-0.225	0.232
			1.716	0.085	0.170	-0.150	0.189
			2.049	0.121	0.242	-0.191	0.291
		Monte Carlo	1.000	0.116	0.232	-0.228	0.236
			1.716	0.086	0.171	-0.152	0.191
			2.049	0.121	0.242	-0.192	0.292
		MLS	1.000	0.114	0.229	-0.225	0.233
			1.716	0.085	0.170	-0.150	0.189
			2.049	0.120	0.240	-0.190	0.290
0.80	0.90	Satterthwaite	1.000	0.167	0.334	-0.330	0.337
			1.716	0.124	0.248	-0.228	0.267
			2.049	0.176	0.352	-0.301	0.401
		Monte Carlo	1.000	0.171	0.342	-0.339	0.346
			1.716	0.126	0.252	-0.233	0.272
			2.049	0.177	0.353	-0.303	0.403
		MLS	1.000	0.168	0.335	-0.331	0.339
			1.716	0.124	0.248	-0.228	0.267
			2.049	0.175	0.351	-0.301	0.401
0.80	0.95	Satterthwaite	1.000	0.152	0.303	-0.285	0.333
			1.716	0.113	0.225	-0.206	0.245
			2.049	0.160	0.320	-0.269	0.369
		Monte Carlo	1.000	0.154	0.308	-0.304	0.311
			1.716	0.113	0.227	-0.207	0.246
			2.049	0.160	0.319	-0.269	0.369
		MLS	1.000	0.152	0.303	-0.299	0.307
			1.716	0.112	0.224	-0.205	0.244
			2.049	0.159	0.318	-0.268	0.368

Tableau IV.3 : Résultats de validation de la méthode alternative en utilisant le profil d'incertitude après correction. (Limite d'acceptabilité λ est de $\pm 0.3 \log \text{CFU}/100 \text{ mL}$).

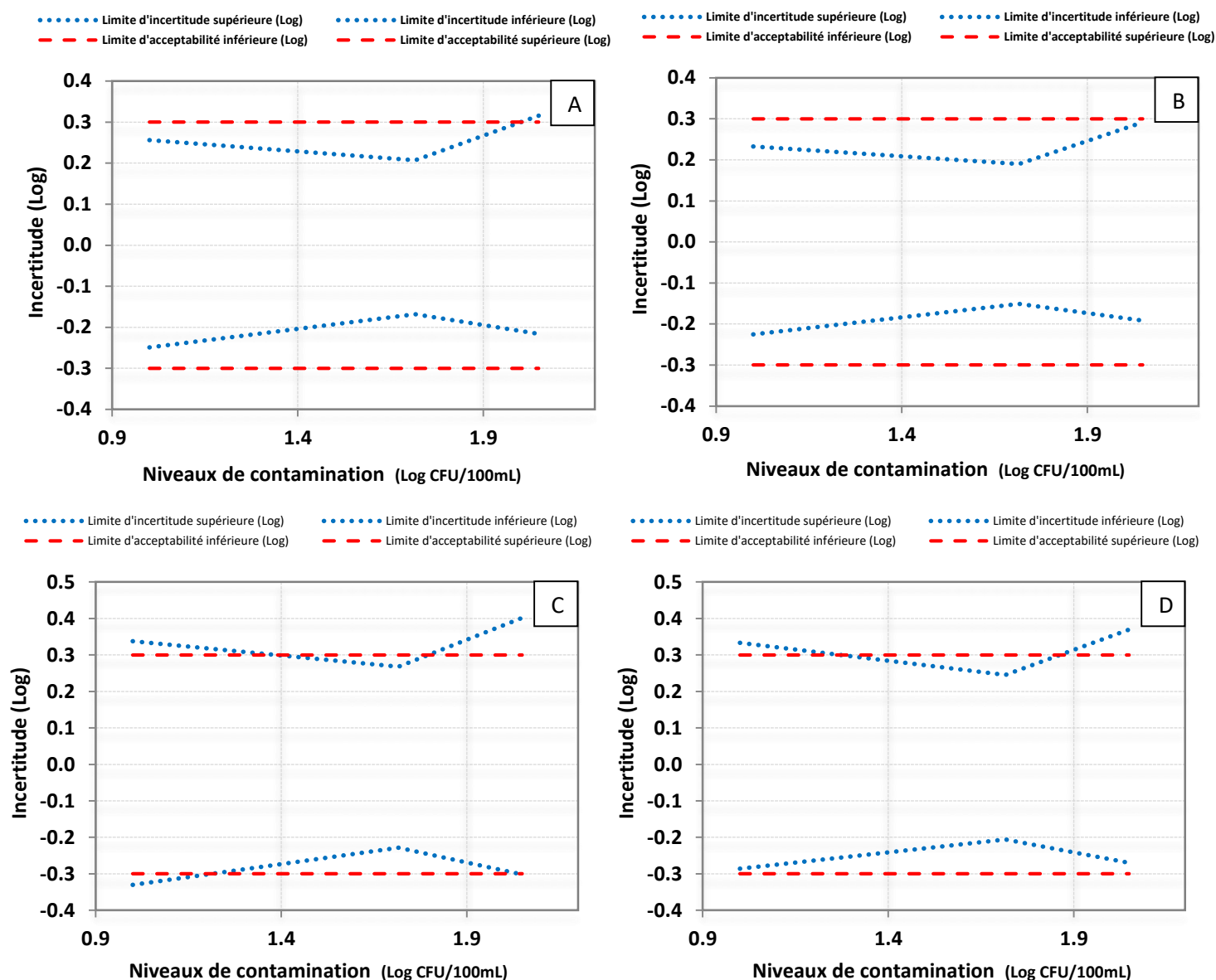


Tableau IV.3 : Profils d'incertitude de la méthode alternative après correction (A : $\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$, B : $\beta = 66.7\%$, $\gamma = 95\%$, C : $\beta = 80\%$, $\gamma = 90\%$ et D : $\beta = 80\%$, $\gamma = 95\%$). (λ de ± 0.3 log CFU/100 mL).

Après correction des données, il apparaît clairement que les incertitudes élargies sont devenues plus réduites. Cependant, cela n'a pas influencé significativement sur les intervalles d'incertitude pour une proportion β de 80% et un niveau de confiance γ de 90% et 95% puisqu'ils demeurent hors les limites d'acceptabilité de ± 0.3 log CFU/100 mL. En revanche, on remarque que le profil tracé en utilisant un $\beta = 66.7\%$ et $\gamma = 95\%$ montre un intervalle d'incertitude inclus totalement dans les limites d'acceptabilité. Ainsi, dans ce cas, la méthode alternative peut être considérée comme valide sur tous le domaine d'application étudié.

Tout aussi important, dans l'intervalle de tolérance de type « β, γ -content », la proportion et le risque sont séparés, ainsi β indique la proportion des futures mesures acceptables et γ indique le degré de confiance (le risque pris est égal à $1-\gamma$). Cette séparation entre la proportion et le risque révèle une caractéristique de flexibilité importante pour l'approche du profil d'incertitude basée sur le « β, γ -content tolérance intervalle ». Par conséquent, le changement de valeurs de β et γ donne aux analystes plusieurs options pour valider leurs méthodes. Dans cette étude, nous avons tracé les différents profils en utilisant différentes valeurs de β (66.7%, 80%) et γ (90% et 95%) mais le choix final est celui de l'analyste selon ces objectifs définis et le besoin des clients.

➤ Estimation de la limite de quantification

Le profil d'incertitude permet d'estimer la limite de quantification (LQ) en se reposant sur les données de validation du profil d'incertitude retenu comme acceptable après correction. Les valeurs obtenues sont résumées dans le Tableau IV.4 suivant :

Niveaux de contamination	A	B
Valeur cible (log CFU/100 mL)	1.000	1.716
Limite d'incertitude supérieure	0.232	0.189
Limite d'acceptabilité supérieure	1.300	2.231
Paramètres de la droite	Pente	Ordonnée à l'origine
Limite d'incertitude supérieure	-0.060	0.292
Limite d'acceptabilité supérieure	1.300	0
Limite de quantification (log CFU/100 mL)	0.215	

Tableau IV.4 : Estimation de la LQ en utilisant les résultats de validation de la méthode alternative après correction pour $\beta = 66.7\%$ et $\gamma = 95\%$ et λ de ± 0.3 log CFU/100 mL.

Selon les résultats obtenus, la LQ est égale à 0.215 (log CFU/100 mL). On peut également noter que l'interception de la ligne correspondant à la limite d'acceptabilité est en effet égale à 0 comme prévu. Cela signifie que 0.215 log CFU/100 mL est le seuil à partir duquel la limite d'incertitude supérieure croise la limite supérieure d'acceptabilité. Au-delà de ce seuil, l'analyste peut garantir que la méthode produira une proportion β de résultats fiables. Selon les règles de décision proposées, la méthode est donc valide puisqu'elle garantit les objectifs fixés. En revanche, en dessous de ce seuil, il n'est plus possible de conclure cette validité.

Après l'évaluation de ces résultats, il est possible de conclure que le profil d'incertitude peut fournir une estimation précise de la LQ ; toutefois, cette dernière est pratiquement la coordonnée x de l'intersection entre les intervalles d'incertitude et les limites d'acceptabilité. La LQ sera donc

influencée par le choix des paramètres β , γ et λ utilisés pour construire ces limites. Cela souligne l'importance de sélectionner correctement ces paramètres lors de la construction d'un profil d'incertitude. A l'issue de cette étude, nous avons retenu $\beta = 66.7\%$ et $\gamma = 95\%$, ce qui veut dire qu'on peut garantir qu'en moyenne 66.7% des futurs résultats tomberont dans les limites d'incertitude avec un degré de confiance égal à 95% dans l'intervalle [LQ, 2.049]. Ainsi, les mesures futures obtenus via la méthode alternative seront équivalentes à celles obtenues par la méthode de référence pour les limites d'acceptabilité de $\pm 0.3 \log \text{CFU}/100 \text{ mL}$.

III. METHODE PETRIFILM EB D'ENUMERATION DES ENTEROBACTERIES DANS LES ALIMENTS

Cette étude vise à illustrer la validité d'une méthode alternative (Petrifilm EB) pour le dénombrement quantitatif des Entérobactéries dans les aliments par rapport à une méthode de référence (ISO 21528-2) [87] en utilisant l'approche du profil d'incertitude. L'application originale de cette étude a comme objectif : de montrer comment cette approche peut être efficacement appliquée à tout ensemble de données collectées conformément aux directives de l'ISO 16140 et comment interpréter les calculs finaux pour décider si une méthode microbiologique est valide ou non. A cet égard, nous allons appliquer notre approche aux données obtenues lors de la validation d'un kit commercial pour le dénombrement des Entérobactéries dans les aliments [88].

1. Domaine d'application

Le domaine d'application de la méthode étudiée est le suivant :

- Les limites d'acceptabilité sont fixées à $\pm 0.3 \log (\text{CFU}/\text{g})$.
- L'étude à 3 niveaux de contamination artificielle a été menée par 14 laboratoires avec 2 répétitions.
- Les données ont été collectées conformément aux consignes de la norme ISO 16140 dans le cadre d'une étude interlaboratoire collaborative.
- En vue d'examiner la flexibilité du profil d'incertitude par rapport aux méthodes microbiologiques, nous avons décidé de choisir différentes valeurs de β et γ ($\beta = 66.7\%$, 80% et $\gamma = 90\%$, 95%).
- Les valeurs de référence sont égales aux médianes calculées à partir des résultats obtenus par la méthode de référence pour chaque niveau de contamination. Pour les niveaux bas, moyens et hauts, les médianes en $\log (\text{CFU}/\text{g})$ sont : 2.267, 3.230 et 4.176, respectivement.

2. Résultats et discussion

Dans le cadre d'une étude de validation, la méthode Petrifilm EB a été validée par le profil d'incertitude selon les consignes de la norme ISO 16140. Les résultats ont été recueillis lors d'une étude interlaboratoire collaborative. A chaque niveau de contamination, le biais, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité sont calculés. Tous les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau IV.5.

Niveaux de contamination (log CFU/g)	Biais (log CFU/g)	Répétabilité (log CFU/g)	Effet inter-laboratoires (log CFU/g)	Reproductibilité (log CFU/g)
2.267	-0.043	0.122	0.031	0.126
3.230	0.014	0.110	0.052	0.122
4.176	0.047	0.104	0.071	0.176

Tableau IV.5 : Résultats statistiques de la méthode Petrifilm EB en Log (CFU/g)

Afin de calculer les intervalles de tolérance, nous fixons au début la valeur de β -content à 66,7%, le degré de confiance γ est testé à 90% et 95%. Ensuite, nous avons augmenté la valeur de β à 80% et vérifié la validité de la méthode pour les deux valeurs de risque choisies.

Comme les données proviennent d'une étude interlaboratoire, l'estimation de l'incertitude de mesure doit tenir compte de toutes les sources d'incertitude possibles, telles que l'évolution de l'échantillon, l'imprécision de la dilution, l'hétérogénéité de l'échantillon, l'interférence matricielle, l'état physiologique des bactéries, capacité des bactéries à croître et à développer une colonie, et beaucoup d'autres [88]. Ainsi, les limites d'acceptabilité de 0.3 log CFU/g sont plutôt strictes, alors que les documents réglementaires considèrent déjà qu'une différence de 0.5 log entre les résultats mesurés sur 2 plaques d'agar est acceptable [89]. Depuis 1979, cette valeur d'acceptation est la norme dans la réglementation française.

Le Tableau IV.6 regroupe tous les résultats concernant : l'incertitude, l'incertitude élargie et les limites d'incertitude, en utilisant trois méthodes chimométriques de calcul et pour différents valeurs de β et γ .

β -content	γ -confidence	Approche	Valeur cible (Log CFU/g)	Incertitude (Log CFU/g)	Incertitude Elargie (Log CFU/g)	Limites d'incertitude (Log CFU/g)	
						Inférieure	Supérieure
0.667	0.90	Satterthwaite	2.267	0.081	0.162	-0.209	0.124
			3.230	0.079	0.158	-0.150	0.177
			4.176	0.083	0.166	-0.125	0.219
		Monte Carlo	2.267	0.083	0.166	-0.214	0.128
			3.230	0.081	0.162	-0.153	0.180
			4.176	0.084	0.168	-0.127	0.221
		MLS	2.267	0.082	0.164	-0.211	0.126
			3.230	0.080	0.160	-0.151	0.178
			4.176	0.083	0.166	-0.125	0.219
0.667	0.95	Satterthwaite	2.267	0.091	0.182	-0.198	0.112
			3.230	0.089	0.178	-0.138	0.165
			4.176	0.093	0.186	-0.112	0.206
		Monte Carlo	2.267	0.094	0.188	-0.203	0.117
			3.230	0.091	0.182	-0.142	0.169
			4.176	0.095	0.190	-0.115	0.209
		MLS	2.267	0.092	0.184	-0.199	0.114
			3.230	0.089	0.178	-0.139	0.166
			4.176	0.093	0.186	-0.112	0.206
0.80	0.90	Satterthwaite	2.267	0.107	0.214	-0.263	0.177
			3.230	0.105	0.210	-0.203	0.230
			4.176	0.110	0.220	-0.181	0.275
		Monte Carlo	2.267	0.110	0.220	-0.268	0.183
			3.230	0.107	0.214	-0.207	0.234
			4.176	0.111	0.222	-0.182	0.276
		MLS	2.267	0.109	0.218	-0.266	0.180
			3.230	0.106	0.212	-0.204	0.231
			4.176	0.110	0.220	-0.181	0.275
0.80	0.95	Satterthwaite	2.267	0.120	0.240	-0.248	0.162
			3.230	0.118	0.236	-0.187	0.214
			4.176	0.123	0.246	-0.164	0.258
		Monte Carlo	2.267	0.124	0.248	-0.254	0.169
			3.230	0.121	0.242	-0.192	0.219
			4.176	0.126	0.252	-0.168	0.262
		MLS	2.267	0.122	0.244	-0.250	0.165
			3.230	0.118	0.236	-0.188	0.215
			4.176	0.123	0.246	-0.164	0.258

Tableau IV.6 : Résultats de validation de la méthode Petrifilm EB en utilisant le profil d'incertitude.
(Limite d'acceptabilité λ est de ± 0.3 log CFU/g).

Les profils d'incertitude sont construits à partir des résultats du Tableau IV.6. Les limites d'incertitude supérieure et inférieure exprimées en valeur absolue sont présentées en fonction des valeurs cibles générées par la méthode de référence dans la Figure IV.4. Comme le montrent les résultats, la méthode a été considérée comme valide puisque les intervalles d'incertitude sont inclus dans les limites d'acceptabilité de $\pm 0.3 \log \text{CFU/g}$ pour tous les niveaux de contamination testés.

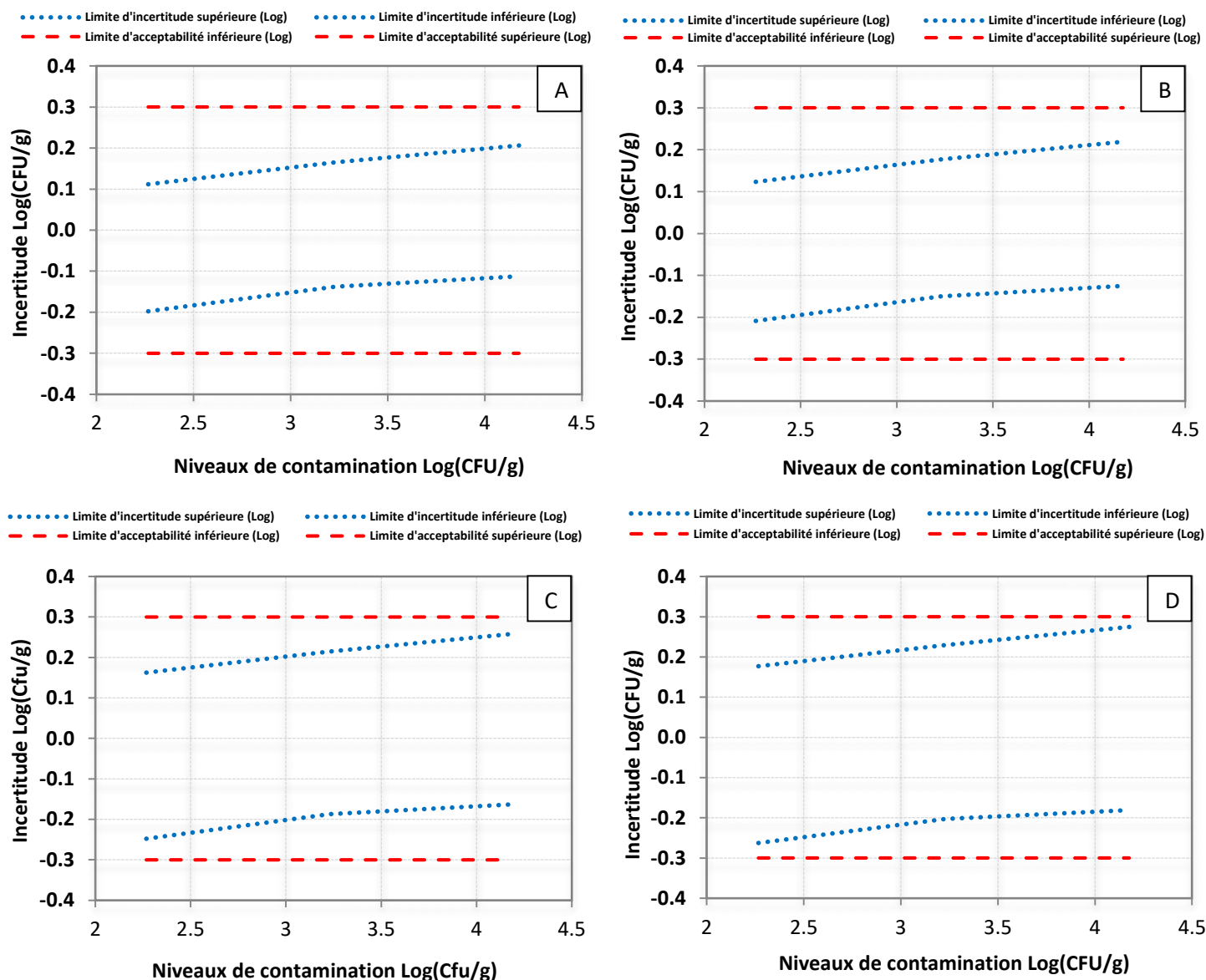


Figure IV.4 : Profils d'incertitude de la méthode Petrifilm EB (A : $\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$, B : $\beta = 66.7\%$, $\gamma = 95\%$, C : $\beta = 80\%$, $\gamma = 90\%$ et D : $\beta = 80\%$, $\gamma = 95\%$). (λ de $\pm 0.3 \log \text{CFU/g}$)

Quelle que soit la technique de calcul utilisée, les différentes valeurs de β -CTI donnent des résultats comparables, comme illustré au Tableaux IV.6. Il faut rappeler que l'intervalle de l'approximation de Satterthwaite est calculé en supposant que les données sont normalement distribuées. Par contre, les intervalles de la simulation de Monte Carlo et la procédure MLS sont non paramétriques et aucune distribution normale supposée des données n'est nécessaire. En

revanche, l'intervalle de Mee est plus simple à calculer car il ne nécessite pas d'algorithme itératif. D'un point de vue pratique, ce résultat est intéressant car cela signifie que, bien que les colonies de microorganismes dans les aliments ne se conforment pas à une distribution normale, la transformation logarithmique simple du comptage en logarithmes décimaux peut être appliquée avec succès. Cet état de fait, devrait ne pas être vérifié avec des niveaux de contamination plus faibles, tels que ceux observés dans les eaux.

Toutes les étapes nécessaires pour la construction du profil d'incertitude ont été appliquées avec succès pour évaluer la performance de la méthode alternative Petrifilm EB. D'autre part, la stratégie proposée permet l'estimation de l'incertitude de mesure à travers les données de validation, et sans avoir recours à d'autres expériences complémentaires, en se basant sur la β -content, γ -confiance tolérance intervalle calculée par trois méthodes différentes : l'approximation de Satterthwaite, la simulation de Monte Carlo et la procédure MLS.

D'après la Figure IV.4, on constate que les limites d'incertitude sont incluses dans les limites d'acceptabilité et ce pour les différents valeurs β et γ testés dans cette étude. Ainsi, on peut conclure que la méthode alternative pour le dénombrement des Entérobactéries dans les aliments est entièrement valide tout au long du domaine d'application étudié.

La comparaison de différents résultats statistiques dérivés de l'application du profil d'incertitude a démontré que cette méthode numérique simple peut être appliquée malgré la distribution non-normale des comptes de colonies bactériennes. En effet, plusieurs tentatives ont été faites pour proposer une transformation logarithmique du nombre de colonies afin de mieux approcher la distribution normale. Or, le nombre de données étant trop petit empêche de vérifier correctement si leurs distributions suivent une loi log-normale donnent des résultats satisfaisant. Cette étude démontre empiriquement que la transformation logarithmique du nombre de colonies est satisfaisante d'un point de vue pratique.

Le profil d'incertitude vise à obtenir une compréhension globale de la manière dont les résultats se développent à moyen et à long terme. De plus, la revalidation des méthodes due à de petites modifications du mode opératoire peut être considérée comme une extension de cette stratégie.

IV. CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons montré que l'utilisation du profil d'incertitude ouvre la possibilité d'associer la validation analytique avec l'incertitude de mesure pour évaluer la performance des méthodes microbiologiques alternatives. La construction du profil d'incertitude au terme de la validation permet au microbiologiste de définir sans ambiguïté un domaine de validité pour lequel l'incertitude répond à des exigences spécifiques, et cela pour un problème analytique donné. Le profil d'incertitude élargi est un outil de diagnostic qui rend possible de localiser le(s) point(s) crucial(s) d'une méthode. Si la méthode alternative s'avère biaisée, l'intervalle d'incertitude offre la possibilité d'utiliser un facteur de correction pour surmonter ce problème.

D'autre part, l'utilisation de l'intervalle de tolérance de type (β, γ -content) estimé par trois approches chimiométriques : approximation de Satterthwaite, la simulation de Monte Carlo et l'approche MLS, confère au profil d'incertitude la capacité de contrôler plusieurs paramètres reflétant une grande flexibilité le rendant applicable dans divers domaines et dans différentes situations.

Tout aussi important, notre approche permet de déterminer les limites de quantification supérieures et inférieures et peut être utilisée comme aide à la prise de décision et à l'évaluation de l'aptitude à l'emploi d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence normalisée. De plus, cette stratégie innovante est facilement appliquée pour évaluer une méthode microbiologique, bien que les données statistiques de dénombrement des bactéries suivent une distribution log-normale.

Tous les résultats obtenus dans le cadre de cette étude démontrent clairement que la stratégie du profil d'incertitude proposée permet d'interpréter les résultats issus d'études interlaboratoires en considérant l'incertitude des résultats futurs obtenus avec la méthode alternative dans le domaine de validation complet, et contourne l'interprétation délicate de plusieurs tests statistiques distincts, qui peuvent conduire à des déductions paradoxales.

Conclusion Générale

Au terme de ce mémoire de thèse, nous voulons affirmer que derrière ce projet se cache une ambition bien concrète, celle d'offrir aux analystes des outils chimiométriques appropriés afin de juger et de jauger de la qualité des résultats de mesure. De ce point de vue, nous avons porté une attention toute particulière à deux concepts habiles à statuer sur la qualité et la qualimétrie des procédures analytiques à savoir : la validation analytique et l'incertitude de mesure.

En s'inspirant des travaux antérieurs notamment leurs faiblesses et leurs limitations, nous avons donné naissance à une stratégie globale, unique en son genre, bâtie de part en part en exploitant le concept d'incertitude à travers une méthodologie statistique de type « β, γ -content tolérance intervalle ». Nous avons, dès lors, fait d'une pierre deux coups : la validation analytique et l'estimation de l'incertitude, sans avoir recours à des expériences supplémentaires. Cette stratégie a été convertie en un dispositif décisionnel graphique baptisé profil d'incertitude. Trois voies de calcul ont été investies pour prédire l'intervalle de tolérance et approcher l'incertitude de mesure : (i) l'approximation de Satterthwaite, (ii) la simulation de Monte Carlo et (iii) la procédure MLS (Modified Large Simple). En tenant compte de ces différents approches statistiques, notre objectif était, en effet, de contrecarrer le problème de manque de normalité des mesures souvent rencontré dans le domaine Bioanalytique et Microbiologique. Aussi étrange que cela puisse paraître, les trois méthodes de calcul aboutissent à des estimés d'incertitude comparables.

Néanmoins, pour confronter les questions controversées de la fiabilité des mesures que soulève le domaine de la Bioanalyse, nous avons testé les algorithmes de notre profil de décision pour percevoir la performance d'une méthode Bioanalytique. Il s'agissait d'une étude détaillée des données de validation d'une méthode de dosage de la vitamine B3 dans le lait par HPLC. Les premiers résultats de nos calculs ont affiché que le profil d'incertitude peut supporter toutes les fonctions d'étalonnages à condition que ces fonctions aient des sens de variation constant (fonction monotone). Il en va de même pour le problème des méthodes biaisées. Notre approche offre l'éventualité d'utiliser un facteur de correction pour surmonter ce type de contrainte liée à l'effet de matrice.

Afin de consolider ces affirmations, la stratégie du profil d'incertitude a été également appliquée pour valider d'autres procédures Bioanalytiques de séparation et ce dans le cadre d'une étude comparative avec le profil d'exactitude. A la lumière de cette comparaison, nous avons enregistré que les décisions parvenues au travers de notre méthodologie, sont significativement très proches de celles prises par le profil d'exactitude. A contrario, nous avons démontré que notre

démarche donne accès à l'incertitude routinière sans parcourir nécessairement les normes métrologiques coutumières, chose que la stratégie SFSTP ne peut nullement fournir.

Par ailleurs, nous avons attesté l'universalité du profil d'incertitude en le déployant à la validation des méthodes Microbiologiques. A cet effet, nous avons incontestablement confirmé que cet outil peut être efficacement appliqué pour décider conformément aux instructions de la norme ISO 16140 dans le cadre d'une étude interlaboratoire collaborative, nonobstant le problème de manque de normalité des données générées lors des dénombrements microbiologiques. Nos calculs laissent croire que la distribution log normale de recensements bactériens, l'instabilité de l'échantillon biologique ainsi que l'effet de matrice, sont des contraintes déjouées par notre démarche dans la quasi-totalité des cas. Par voie de conséquence, notre profil de décision permettra d'interpréter les résultats issus d'études interlaboratoires avec une aisance inouïe, en considérant l'incertitude des mesures futurs obtenus avec la méthode microbiologique alternative, et contourne ainsi l'interprétation délicate de plusieurs tests statistiques distincts, qui peuvent conduire à des conclusions paradoxales. Ainsi, avons-nous parvenu à mettre à la portée des microbiologistes une stratégie prometteuse qui servira de base pour évaluer si les dénombrements bactériens sont fiables.

En perspective, nous voulons mener des recherches à l'entour des indicateurs de qualité, pour mettre à la disposition des analystes d'autres outils chimiométriques plus simples et plus appropriés destinés à démontrer la fiabilité des résultats de mesure. En vue de cela, nous souhaiterons introduire d'autres critères de performances, entre autres, le profil de risque et l'indice de capacité pour compléter la démarche proposée dans le cadre de cette thèse. Dans l'ensemble, ces critères ne surviendront guère du jour au lendemain, mais nous croyons que nos investigations vont bon train.

Références Bibliographiques

- [1] B. Magnusson and U. Örnemark, *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2nd edn. Eurachem. <http://www.eurachem.org>, 2014, pp. 1-70.
- [2] FDA, "Guidance for Industry: Bioanalytical method validation," *Guidance for Industry: Bioanalytical method validation*, p. Food and Drug Administration, 2001.
- [3] P. Feldsine, C. Abeyta, and W. H. Andrews, "AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis," *Journal of AOAC International*, vol. 85, no. 5, pp. 1187-1200, 2002.
- [4] ICH, "ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology," *ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology*, no. November 1996, p. International Conference on Harmonization, 2005.
- [5] ISO/IEC 17025:2005, "General requirements for the competence of testing and calibration laboratories," pp. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2005.
- [6] P. Hubert *et al.*, "Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches," *STP Pharma Pratiques*, vol. 13, no. 3, pp. 101-138, 2003.
- [7] M. Feinberg, "Approche globale et harmonisée de la validation," *Spectra analyse*, vol. 35, no. 249, p. 16, 2006.
- [8] T. WHITE, "CURRENT CONCEPTS FOR THE VALIDATION OF COMPENDIAL ASSAYS," in *PHARMACOPEIAL FORUM*, 1986, vol. 12, no. 2, pp. 1241-1245: US PHARMACOPEIAL CONVENTION 12601 TWINBROOK PKWY, ROCKVILLE, MD 20852.
- [9] G. d. t. d. C. d. s. p. Commission des Communautés Européennes, "Notes explicative III/844/87-FR," ed, 1989.
- [10] USP, "Validation of compendial assays," *Pharmacopoeial forum, the united states pharmacopeia inc., rockville*, 1989.
- [11] J. Caporal-Gautier, J. Nivet, and P. Algranti, "Guide to analytical validation. Report of an SFSTP commission. I. Methodology," *STP Pharma pratiques*, vol. 2, no. 4, pp. 205-26, 1992.
- [12] J. Caporal-Gautier *et al.*, "Guide to analytical validation. Report of an SFSTP commission. II. Examples of application," *STP pharma pratiques*, vol. 2, no. 4), pp. 227-39, 1992.
- [13] I. H. T. Guideline, "Text on Validation of Analytical Procedures. ICH-Q2A," in *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva*, 1994.
- [14] H. T. G. ICH, "Validation of Analytical Procedure: Methodology (Q2B)," in *International Conference on Harmonization*, 1997.
- [15] FDA, "Validation of chromatographic methods," *Pharmaceutical Technology*, vol. 22, no. 3, pp. 104-119, 1994.
- [16] Food and D. Administration, "International conference on harmonisation. Guideline on validation of analytical procedures: definitions and terminology," *Federal Register*, vol. 60, no. 40, pp. 11259-11262, 1995.
- [17] Food and D. Administration, "International conference on Harmonization: Guideline on validation of analytical procedures: Methodology " *Fed registry*, vol. 62, pp. 27463-27467, 1997.
- [18] E. Chapuzet *et al.*, "Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques: stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP," *STP pharma sciences*, vol. 7, no. 3, pp. 169-194, 1997.
- [19] Food and D. Administration, "Guidance for industry, bioanalytical methods validation for human studies," *Food and Drug Administration Web site. Available at: <http://www.fda.gov/cder/guidance/>, 1998b*, 1998.
- [20] E. Guide, "The fitness for purpose of analytical methods," *A laboratory guide to method validation and related topics*, LGC, Teddington, Middlesex, UK, 1998.
- [21] FDA, "Guidance for industry - Analytical procedure and Methods validation: chemistry, manufacturing and controls documentation availability," *Federal Regist (Notices)*, vol. 65, no. 169, pp. 52776-52777, 2000.
- [22] E. Commission, "Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results," *Official Journal of the European Union*, vol. L221, no. 23 May 1996, pp. 8-36, 2002.

- [23] U. Pharmacopoeia and U. XXII, "Validation of compendial methods," USP-26-NF212003.
- [24] P. Hubert *et al.*, "Validation des procédures analytiques quantitatives: Harmonisation des démarches Partie II-Statistiques," *STP pharma pratiques*, vol. 16, no. 1, pp. 30-60, 2006.
- [25] P. Hubert *et al.*, "Validation des procédures analytiques quantitatives: harmonisation des démarches. Partie III. Exemples d'application," *STP pharma pratiques*, vol. 16, no. 2, pp. 87-121, 2006.
- [26] E. Rozet, "Improvement of the Predictive Character of Test Results Issued from Analytical Methods Life Cycle," Université de Liège, Liège, Belgique, 2008.
- [27] ISO 5725, "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Parts1–4, Part 6," *International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland*, 1994.
- [28] P. Hubert *et al.*, "The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory," *Analytica Chimica Acta*, vol. 391, no. 2, pp. 135-148, 1999.
- [29] M. Feinberg and N. Raguènes, "Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories," *Analytica chimica acta*, vol. 391, no. 2, pp. 239-252, 1999.
- [30] J. Ermer, "Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 24, no. 5, pp. 755-767, 2001.
- [31] B. Boulanger, P. Chiap, W. Dewé, J. Crommen, and P. Hubert, "An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progresses and limitations," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 32, no. 4, pp. 753-765, 2003.
- [32] A. Bouabidi *et al.*, "Critical analysis of several analytical method validation strategies in the framework of the fit for purpose concept," *Journal of Chromatography A*, vol. 1217, no. 19, pp. 3180-3192, 2010.
- [33] C. Hartmann, J. Smeyers-Verbeke, D. Massart, and R. McDowall, "Validation of bioanalytical chromatographic methods," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 17, no. 2, pp. 193-218, 1998.
- [34] C. Hartmann, J. Smeyers-Verbeke, W. Penninckx, Y. Vander Heyden, P. Vankeerberghen, and D. L. Massart, "Reappraisal of hypothesis testing for method validation: detection of systematic error by comparing the means of two methods or of two laboratories," *Analytical Chemistry*, vol. 67, no. 24, pp. 4491-4499, 1995.
- [35] D. J. Schuirmann, "A comparison of the two one-sided tests procedure and the power approach for assessing the equivalence of average bioavailability," *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, vol. 15, no. 6, pp. 657-680, 1987.
- [36] EDQM, "Guide technique pour l'élaboration des monographies," *7e Edition*, 2015.
- [37] Eudralex, "Specifications and Control Tests on the Finished Product " 3AQ11a, 1993.
- [38] R. W. Mee, " β -expectation and β -content tolerance limits for balanced one-way ANOVA random model," *Technometrics*, vol. 26, no. 3, pp. 251-254, 1984.
- [39] C.-T. Liao, T.-Y. Lin, and H. Iyer, "One-and two-sided tolerance intervals for general balanced mixed models and unbalanced one-way random models," *Technometrics*, vol. 47, no. 3, pp. 323-335, 2005.
- [40] ISO 15189:2003, "15189 (2003) Medical laboratories—particular requirements for quality and competence," *Medical laboratories—particular requirements for quality and competence*, pp. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2003.
- [41] G. ISO, "ISO/IEC GUIDE 98-3: 2008, Guide to the expression of uncertainty in measurement," *International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland*, 2008.
- [42] A. M. Committee, "Uncertainty of measurement: implications of its use in analytical science," *Analyst*, vol. 120, no. 9, pp. 2303-2308, 1995.
- [43] S. Ellison, W. Wegscheider, and A. Williams, "Peer Reviewed: Measurement Uncertainty," *Analytical Chemistry*, vol. 69, no. 19, pp. 607A-613A, 1997.
- [44] ISO, "Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM)," *International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland*, 1995.
- [45] S. L. Ellison, M. Rosslein, and A. Williams, "Quantifying uncertainty in analytical measurement," in *Quantifying uncertainty in analytical measurement*: Eurachem, 2000.
- [46] W. Horwitz and R. Albert, "Quality IssuesThe Concept of Uncertainty as Applied to ChemicalMeasurements," *Analyst*, vol. 122, no. 6, pp. 615-617, 1997.

- [47] B. Jülicher, P. Gowik, and S. Uhlig, "A top-down in-house validation based approach for the investigation of the measurement uncertainty using fractional factorial experiments," *Analyst*, vol. 124, no. 4, pp. 537-545, 1999.
- [48] V. J. Barwick and S. L. Ellison, "Development and harmonisation of measurement uncertainty principles—Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data," *VAM Project (version 5.1, January 2000)*, <http://www.vam.org.uk/publications>, 2000.
- [49] A. Maroto, J. Riu, R. Boqué, and F. X. Rius, "Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process," *Analytica Chimica Acta*, vol. 391, no. 2, pp. 173-185, 1999.
- [50] M. Feinberg, B. Boulanger, W. Dewé, and P. Hubert, "New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 380, no. 3 SPEC.ISS., pp. 502-514, 2004.
- [51] A. G. González, M. Á. Herrador, and A. G. Asuero, "Practical digest for evaluating the uncertainty of analytical assays from validation data according to the LGC/VAM protocol," *Talanta*, vol. 65, no. 4, pp. 1022-1030, 2005.
- [52] T. Saffaj and B. Ihssane, "Uncertainty profiles for the validation of analytical methods," *Talanta*, vol. 85, no. 3, pp. 1535-1542, 2011.
- [53] E. Hund, D. L. Massart, and J. Smeyers-Verbeke, "Comparison of different approaches to estimate the uncertainty of a liquid chromatographic assay," *Analytica Chimica Acta*, vol. 480, no. 1, pp. 39-52, 2003.
- [54] A. Maroto, R. Boqué, J. Riu, and F. X. Rius, "Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays," *Analytica chimica acta*, vol. 440, no. 2, pp. 171-184, 2001.
- [55] R. Marini, B. Boulanger, Y. Vander Heyden, P. Chiap, J. Crommen, and P. Hubert, "Uncertainty assessment from robustness testing applied on an LC assay for R-timolol and other related substances in S-timolol maleate," *Analytica chimica acta*, vol. 531, no. 1, pp. 131-140, 2005.
- [56] R. Marini *et al.*, "LC method for the determination of R-timolol in S-timolol maleate: validation of its ability to quantify and uncertainty assessment," *Talanta*, vol. 68, no. 4, pp. 1166-1175, 2006.
- [57] E. Rozet *et al.*, "Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation," *Journal of Chromatography A*, vol. 1158, no. 1, pp. 111-125, 2007.
- [58] D. Hoffman and R. Kringel, "A total error approach for the validation of quantitative analytical methods," *Pharmaceutical research*, vol. 24, no. 6, pp. 1157-1164, 2007.
- [59] P. Hubert *et al.*, "Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal—part I," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 36, no. 3, pp. 579-586, 2004.
- [60] E. Rozet *et al.*, "Using tolerance intervals in pre-study validation of analytical methods to predict in-study results: The fit-for-future-purpose concept," *Journal of Chromatography A*, vol. 1158, no. 1, pp. 126-137, 2007.
- [61] B. Boulanger, E. Rozet, F. Moonen, S. Rudaz, and P. Hubert, "A risk-based analysis of the AAPS conference report on quantitative bioanalytical methods validation and implementation," *Journal of Chromatography B*, vol. 877, no. 23, pp. 2235-2243, 2009.
- [62] E. Hund, D. L. Massart, and J. Smeyers-Verbeke, "Operational definitions of uncertainty," *Trac trends in analytical chemistry*, vol. 20, no. 8, pp. 394-406, 2001.
- [63] S. D. Phillips, K. R. Eberhardt, and B. Parry, "Guidelines for expressing the uncertainty of measurement results containing uncorrected bias," *Journal of research of the National Institute of Standards and Technology*, vol. 102, no. 5, p. 577, 1997.
- [64] M. Patriarca, M. Castelli, F. Corsetti, and A. Menditto, "Calculation of measurement uncertainty in clinical chemistry—Reply," *CLINICAL CHEMISTRY*, vol. 51, no. 1, pp. 277-277, 2005.
- [65] V. Synek, "Attempts to include uncorrected bias in the measurement uncertainty," *Talanta*, vol. 65, no. 4, pp. 829-837, 2005.
- [66] P. H. Petersen, D. Stöckl, J. O. Westgard, S. Sandberg, K. Linnet, and L. Thienpont, "Models for combining random and systematic errors. Assumptions and consequences for different models," *Clinical chemistry and laboratory medicine*, vol. 39, no. 7, pp. 589-595, 2001.
- [67] I. Taverniers, M. De Loose, and E. Van Bockstaele, "Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results," *Trac Trends in Analytical Chemistry*, vol. 23, no. 7, pp. 480-490, 2004.

- [68] M. Thompson, S. L. Ellison, and R. Wood, "Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 74, no. 5, pp. 835-855, 2002.
- [69] CITAC/EURACHEM, "International guide to quality in analytical chemistry: an aid to accreditation," *Teddington, UK*, 2002.
- [70] D. Hoffman and R. Kringle, "Two-sided tolerance intervals for balanced and unbalanced random effects models," *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, vol. 15, no. 2, pp. 283-293, 2005.
- [71] ISO/DTS 21748, "Guide to the Use of Repeatability, Reproducibility and Trueness Estimates in Measurement Uncertainty Estimation," pp. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2003.
- [72] M. Feinberg, *Labo-Stat: Guide de validation des méthodes d'analyse*. Tec et Doc, 2009.
- [73] M. Feinberg, "Validation of analytical methods based on accuracy profiles," *Journal of Chromatography A*, vol. 1158, no. 1, pp. 174-183, 2007.
- [74] S. Lahély, M. Bergaentzlé, and C. Hasselmann, "Fluorimetric determination of niacin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization," *Food Chemistry*, vol. 65, no. 1, pp. 129-133, 1999.
- [75] D. Hoffman, "Statistical considerations for assessment of bioanalytical incurred sample reproducibility," *The AAPS journal*, vol. 11, no. 3, p. 570, 2009.
- [76] V. Varlet, E. L. De Croutte, M. Augsburg, and P. Mangin, "Accuracy profile validation of a new method for carbon monoxide measurement in the human blood using headspace-gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS)," *Journal of Chromatography B*, vol. 880, pp. 125-131, 2012.
- [77] A.-C. Servais *et al.*, "Nonaqueous capillary electrophoresis method for the enantiomeric purity determination of S-timolol using heptakis (2, 3-di-O-methyl-6-O-sulfo)- β -cyclodextrin: Validation using the accuracy profile strategy and estimation of uncertainty," *Journal of Chromatography A*, vol. 1120, no. 1, pp. 102-111, 2006.
- [78] J. Schappler, D. Guilleme, J. Prat, J. L. Veuthey, and S. Rudaz, "Validation of chiral capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry methods for ecstasy and methadone in plasma," *Electrophoresis*, vol. 29, no. 10, pp. 2193-2202, 2008.
- [79] F. Lecomte *et al.*, "Comparison of the quantitative performances and measurement uncertainty estimates obtained during method validation versus routine applications of a novel hydrophilic interaction chromatography method for the determination of cidofovir in human plasma," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 57, pp. 153-165, 2012.
- [80] ISO 16140:2003, "16140: Microbiology of food and animal feeding stuffs—Protocol for the validation of alternative methods," *Microbiology of food and animal feeding stuffs—Protocol for the validation of alternative methods*, pp. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2003.
- [81] ISO, "ISO/TR 13843:2000 Qualite de l'eau. Lignes directrices pour la validation des methodes microbiologiques," *Geneva, Switzerland*, 2000.
- [82] ISO, "ISO 5725. Precision of test methods: determination of repeatability and reproducibility by inter-laboratory tests: application in development and assessment of dairy methodology, 2nd ed," *ISO, Geneva, Switzerland*, 1986.
- [83] J.-C. Augustin and V. Carlier, "Lessons from the organization of a proficiency testing program in food microbiology by interlaboratory comparison: analytical methods in use, impact of methods on bacterial counts and measurement uncertainty of bacterial counts," *Food microbiology*, vol. 23, no. 1, pp. 1-38, 2006.
- [84] K. F. Eckner, "Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the Colilert and Enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, *Escherichia coli*, and enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in southern Sweden," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, no. 8, pp. 3079-3083, 1998.
- [85] ISO 9308-1:2000, "ISO 9308-1:2000 Water quality -- Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria -- Part 1: Membrane filtration method," *Water quality -- Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria -- Part 1: Membrane filtration method*, pp. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2000.

- [86] A. Boubetra, F. Le Nestour, C. Allaert, and M. Feinberg, "Validation of alternative methods for the analysis of drinking water and their application to *Escherichia coli*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 10, pp. 3360-3367, 2011.
- [87] I. ISO, "21528-2: 2004, Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal methods for detection and enumeration of Enterobacteriaceae," *International Organization for Standardization*, 2004.
- [88] M. Feinberg, D. Sohier, and J.-F. David, "Validation of an alternative method for counting Enterobacteriaceae in foods based on accuracy profile," *Journal of AOAC International*, vol. 92, no. 2, pp. 527-537, 2009.
- [89] Arrêté du 21 Décembre "Arrêté Relatif aux Critères Microbiologiques Auxquels Doivent Satisfaire Certaines Denrées Animales ou d'Origine Animale, Annexe I, Interpretation des Résultats," *J. Officiel du 19/01/1980*, 1979.

**Annexe :
Profils d'Incertitude
du Nicotinamide
et de l'Acide Nicotinique**

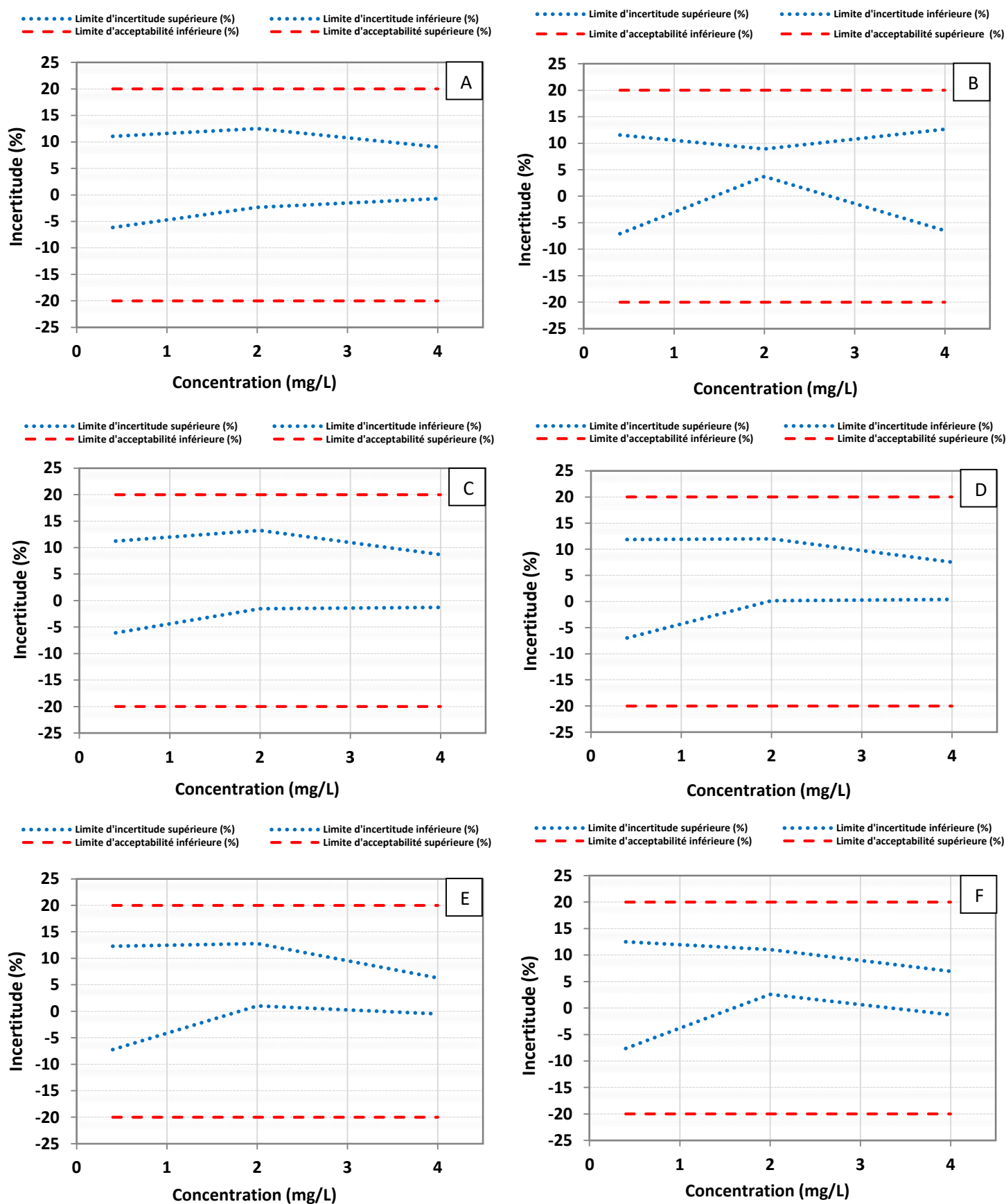


Figure V.1 : Profils d'incertitude du nicotinamide (Pour $\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : Linéaire pondéré $1/X^2$, B : Quadratique pondéré $1/X$ et $1/X^2$, C : Racine carré pondéré $1/X$, D : Racine carré pondéré $1/X^2$, E : Logarithmique pondéré $1/X$, F : Logarithmique pondéré $1/X^2$).

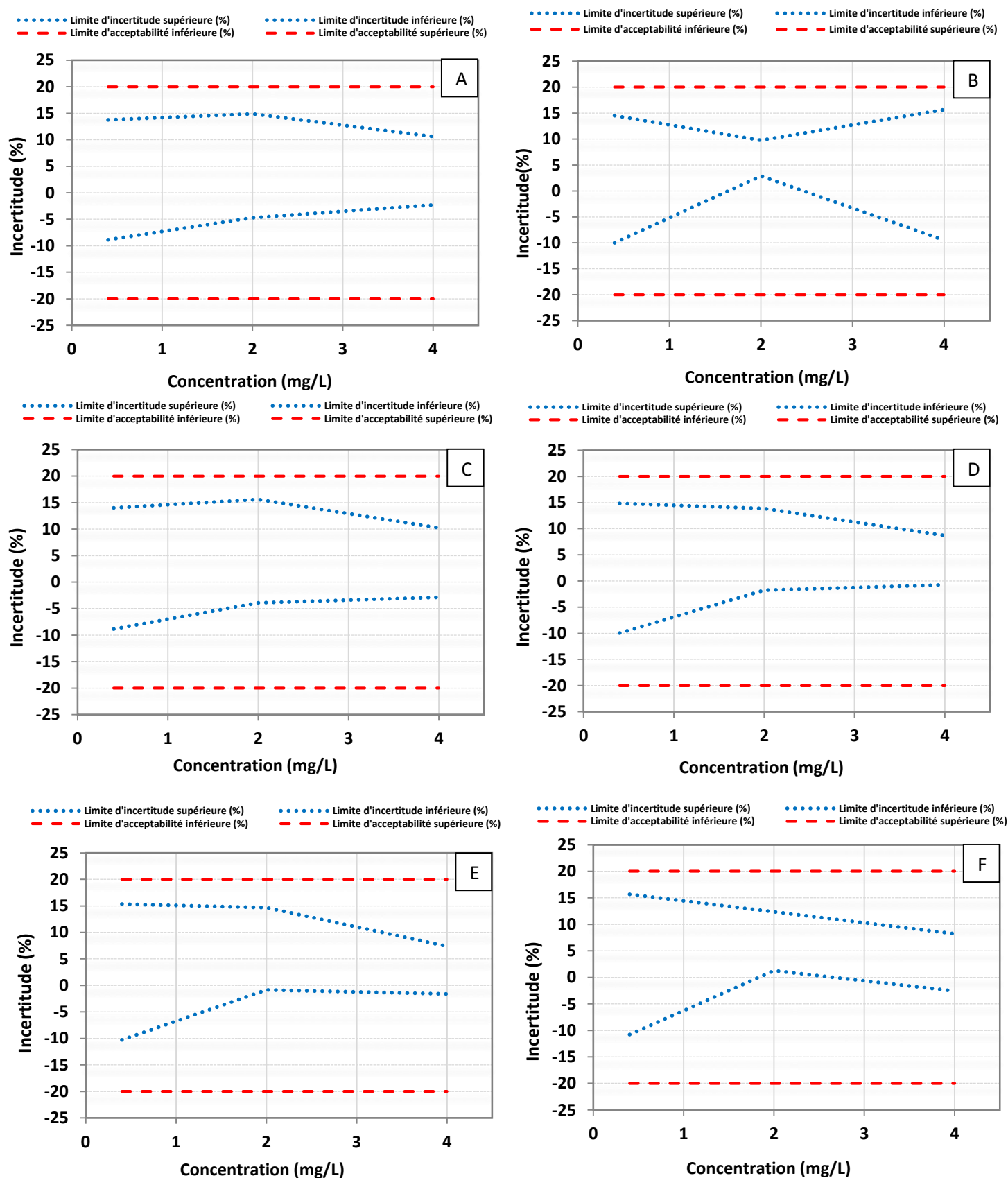


Figure V.2 : Profils d'incertitude du nicotinamide (Pour $\beta = 80\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : Linéaire pondéré $1/X^2$, B : Quadratique pondéré $1/X$ et $1/X^2$, C : Racine carré pondéré $1/X$, D : Racine carré pondéré $1/X^2$, E : Logarithmique pondéré $1/X$, F : Logarithmique pondéré $1/X^2$).

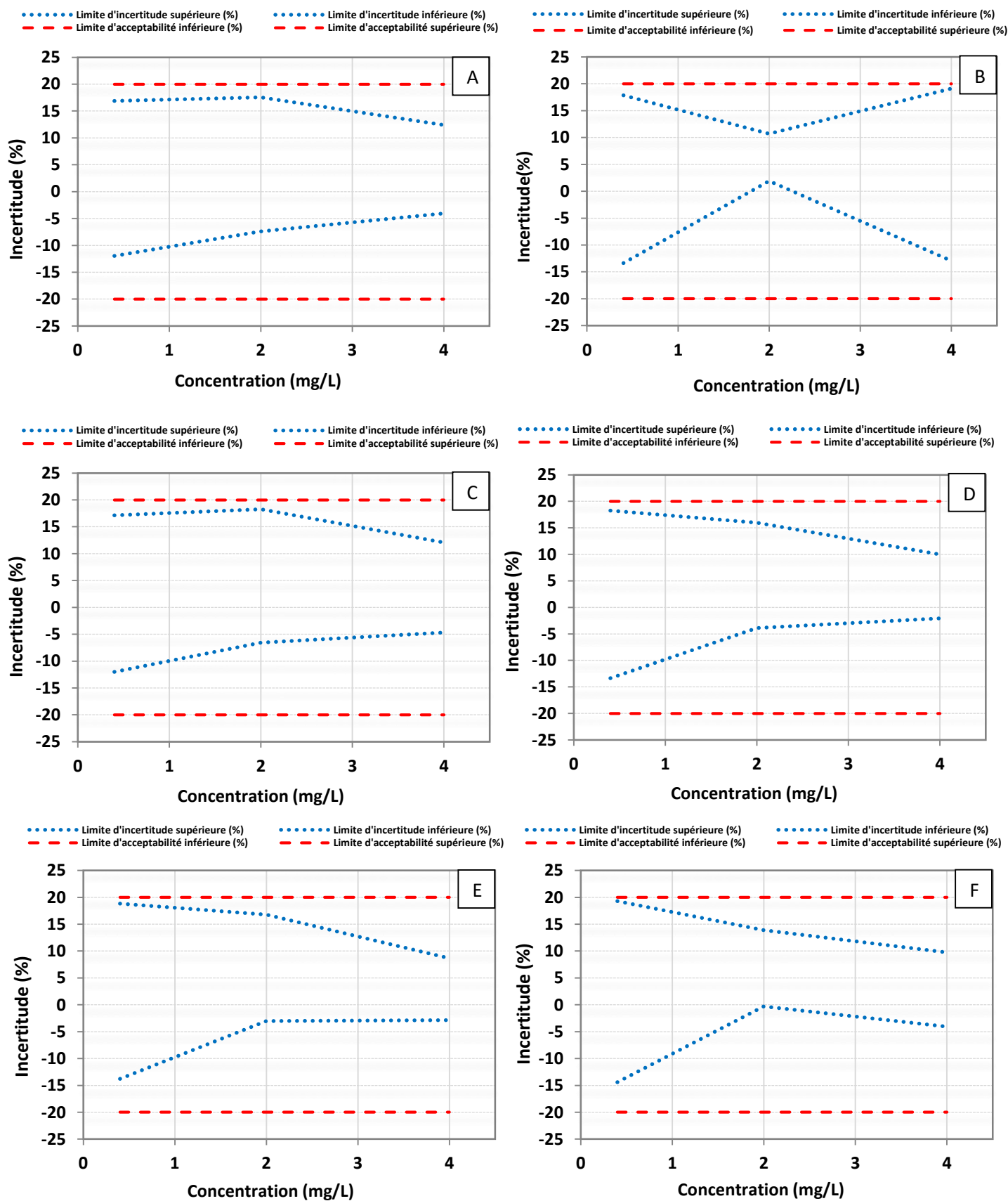


Figure V.3 : Profils d'incertitude du nicotinamide (Pour $\beta = 90\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : Linéaire pondéré $1/X^2$, B : Quadratique pondéré $1/X$ et $1/X^2$, C : Racine carré pondéré $1/X$, D : Racine carré pondéré $1/X^2$, E : Logarithmique pondéré $1/X$, F : Logarithmique pondéré $1/X^2$).

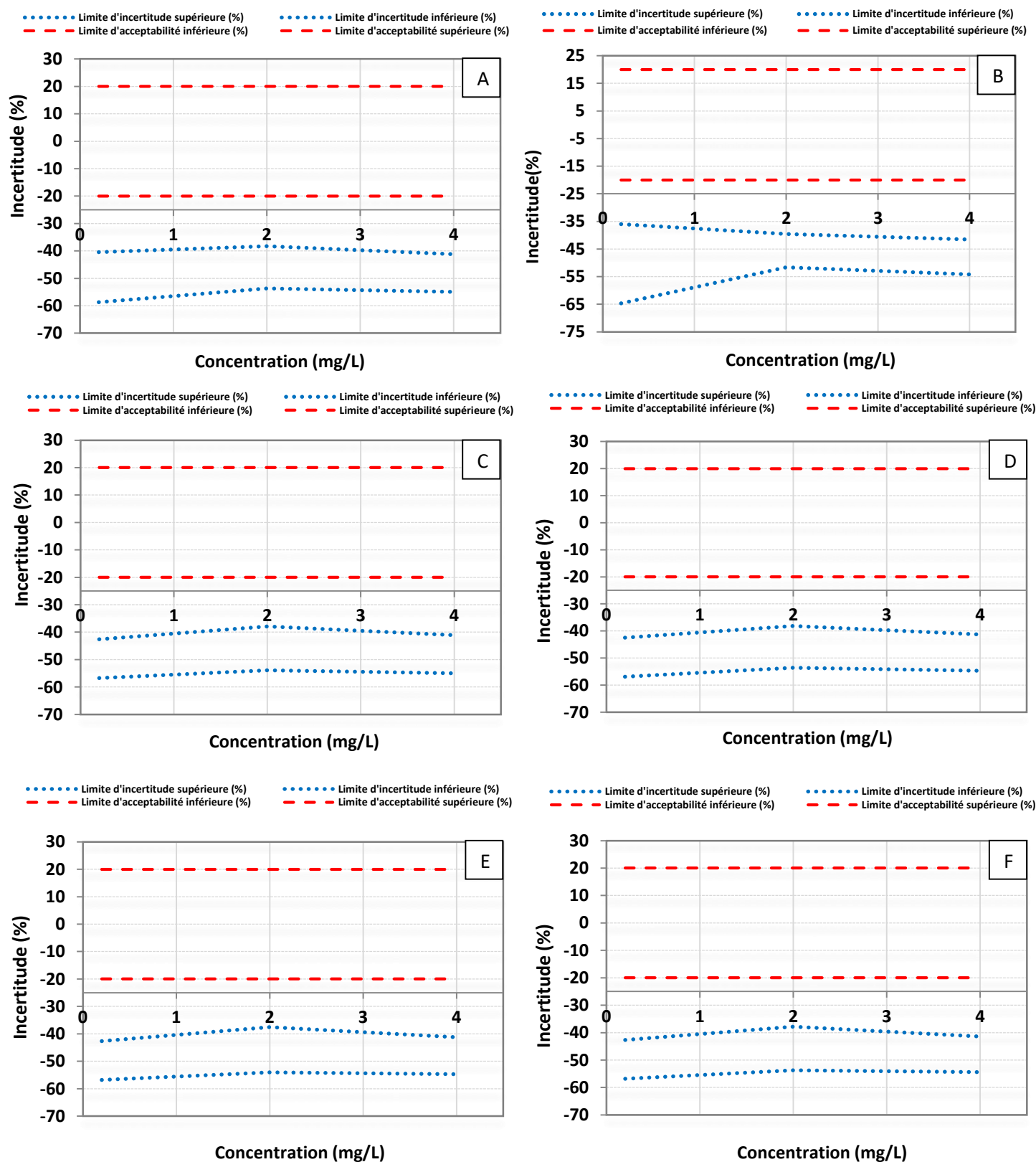


Figure V.4 : Profils d'incertitude de l'acide nicotinique (Pour $\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : Linéaire pondéré $1/X^2$, B : Quadratique pondéré $1/X$ et $1/X^2$, C : Racine carré pondéré $1/X$, D : Racine carré pondéré $1/X^2$, E : Logarithmique pondéré $1/X$, F : Logarithmique pondéré $1/X^2$).

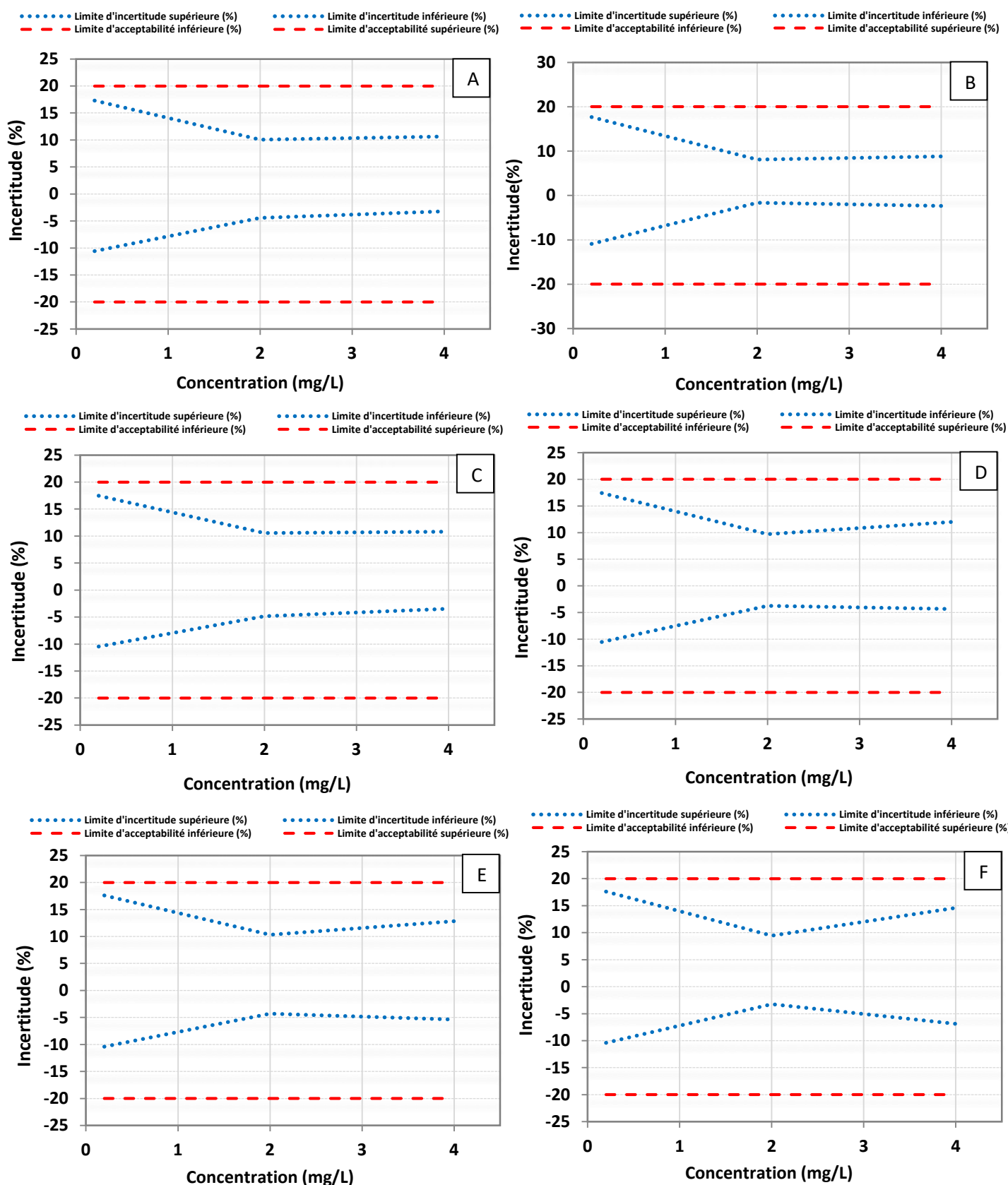


Figure V.5 : Profils d'incertitude de l'acide nicotinique après correction (Pour $\beta = 66.7\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$). (A : Linéaire pondéré $1/X^2$, B : Quadratique pondéré $1/X$ et $1/X^2$, C : Racine carré pondéré $1/X$, D : Racine carré pondéré $1/X^2$, E : Logarithmique pondéré $1/X$, F : Logarithmique pondéré $1/X^2$).

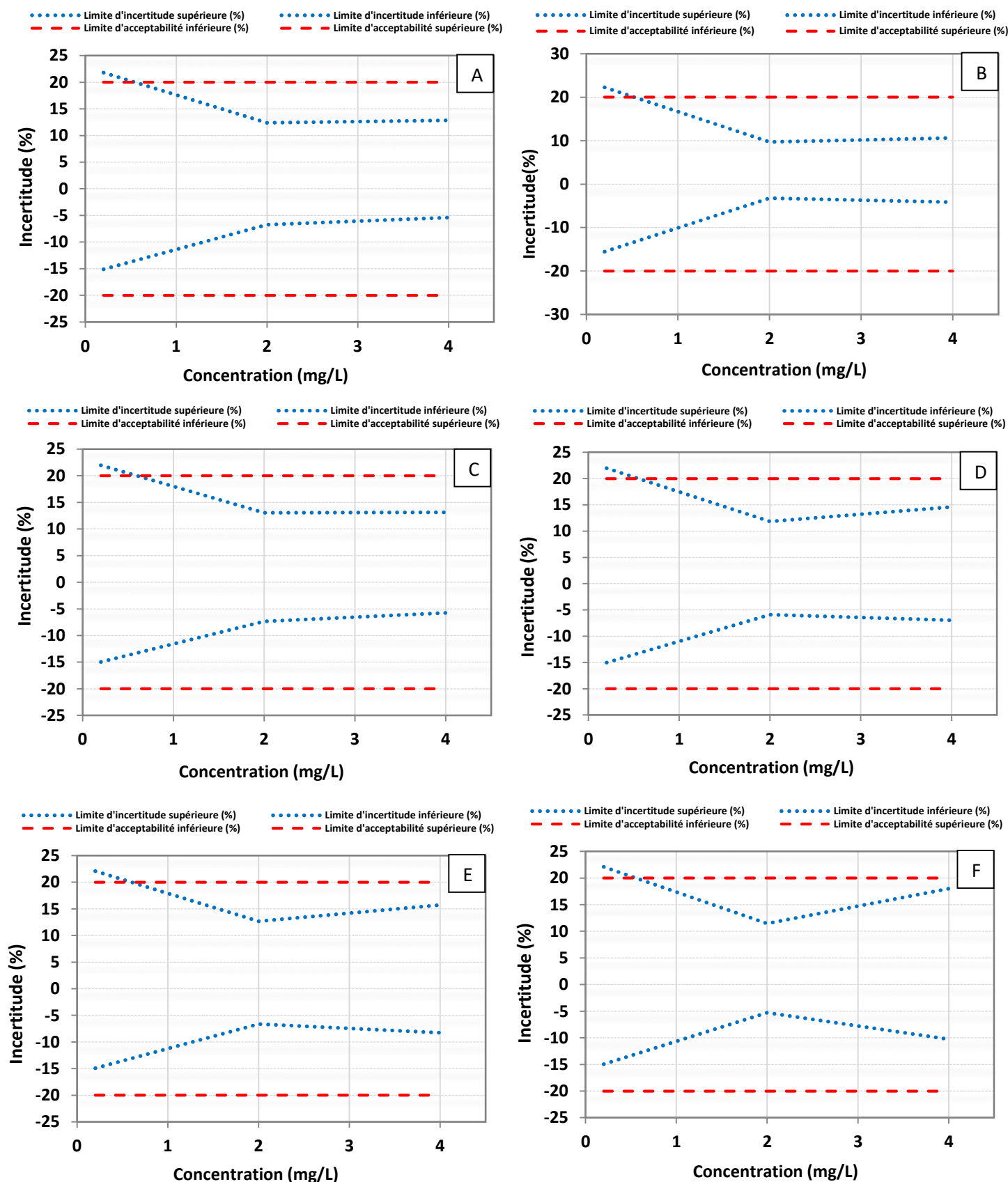


Figure V.6 : Profils d'incertitude de l'acide nicotinique après correction (Pour $\beta = 80\%$, $\gamma = 90\%$ et $\lambda \pm 20\%$).
 (A : Linéaire pondéré $1/X^2$, B : Quadratique pondéré $1/X$ et $1/X^2$, C : Racine carré pondéré $1/X$, D : Racine carré pondéré $1/X^2$, E : Logarithmique pondéré $1/X$, F : Logarithmique pondéré $1/X^2$).