



FICHE TECHNIQUE D'APPLICATION

VALIDATION / VERIFICATION DE METHODES

Outils statistiques pour vérifier / valider une méthode.

Adapter et/ou développer une méthode nécessite de définir des critères de performances pour répondre aux besoins du laboratoire et/ou du client (limite de détection, limite de quantification, linéarité, fidélité, justesse...). Plusieurs étapes sont nécessaires : définir les objectifs, établir le plan d'expériences, prévoir les échantillons nécessaires, réaliser les analyses et interpréter les résultats.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	3
LES TERMES USUELS ET LEUR DEFINITION	4
Validation.....	4
Vérification	4
Linéarité.....	4
Intervalle d'acceptabilité.....	4
Fidélité	4
Justesse	4
Limite de détection.....	4
Limite de quantification	4
Domaine de validité	4
Répétabilité	4
Reproductibilité.....	4
COMMENT ORGANISER LA VERIFICATION OU LA VALIDATION D'UNE METHODE ?.....	5
Cas de l'adoption d'une méthode publiée	5
Cas du développement ou de l'adaptation d'une méthode.	5
Opérations à réaliser	5
REFERENCES NORMATIVES ET BIBLIOGRAPHIQUES	6

INTRODUCTION

Pour le laboratoire plusieurs situations l'obligent à se prononcer soit sur une validation d'une méthode, soit sur une vérification d'une méthode.

La vérification est requise pour **adopter** une méthode reconnue, c'est-à-dire la mettre en œuvre sans la modifier. Le laboratoire devra confirmer qu'il atteint les performances de la méthode.

La validation est requise pour :

- **Adapter** une méthode, c'est-à-dire modifier une méthode reconnue pour l'ajuster aux besoins du laboratoire ou du client (étendre son domaine d'application à une matrice non testée ou à une plage de mesure, à l'utilisation d'un équipement différent...),
- **Développer** une méthode, c'est-à-dire la concevoir et lui attribuer des performances.

La complexité de la validation va dépendre du stade de la méthode. Les plans d'expériences vont être différents selon qu'il s'agisse de conception et développement de méthode qui peut demander un étalonnage ou une modification / amplification d'une méthode normalisée pour décider de son aptitude à l'emploi.

Diverses normes développent différentes approches de la validation. Cette fiche ne décrit que les étapes de mise en œuvre et renvoie aux références normatives ayant trait à cette thématique comme citées dans le paragraphe « références normatives et bibliographiques ». Elle explique les outils statistiques pour évaluer les critères choisis pour mener la validation de la méthode ce qui ne dispensera pas le responsable de cette validation de porter un jugement d'ordre technique et analytique sur l'évaluation des différents critères.

LES TERMES USUELS ET LEUR DEFINITION

Validation

Démonstration que les exigences spécifiées de la méthode sont en adéquation pour un usage défini.

Vérification

Confirmation par examen et établissement de preuves que les exigences spécifiées de la méthode reconnue ont été satisfaites.

Linéarité

C'est la capacité d'établir qu'il existe une relation linéaire entre les quantités retrouvées (ou quantifiées) dans des échantillons et leurs valeurs de référence.

Intervalle d'acceptabilité

Spécification de la performance exigée pour la méthode, exprimée comme un écart acceptable autour de la valeur cible.

Fidélité

Exprimée en termes d'écart-types, elle représente l'amplitude de la dispersion des répétitions lors de l'application de la méthode dans des conditions de répétabilité, de reproductibilité ou de fidélité intermédiaire.

Justesse

Mesurée en termes d'écart à une valeur vraie (assignée), elle est estimée par la quantification d'un biais

Limite de détection

Elle correspond à la plus petite quantité d'une substance à analyser dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte.

Limite de quantification

Elle correspond à la limite à partir de laquelle la méthode est suffisamment précise pour donner une estimation quantitative satisfaisante d'une concentration inconnue de la substance à doser.

Domaine de validité

C'est l'ensemble des types de matrice auquel s'appliquent la méthode et la gamme de concentrations sur laquelle a porté la validation et pour lequel les futurs résultats fournis par la méthode sont jugés valides.

Répétabilité

Calculée à partir d'un écart-type de répétabilité (S_r), elle caractérise la dispersion minimale observée sur les résultats obtenus dans les conditions de mise en œuvre les plus similaires possibles. Sous conditions de répétabilité, tous les facteurs susceptibles d'influer sur le résultat sont maîtrisés.

Reproductibilité

Calculée à partir d'un écart-type caractérisant la variabilité inter laboratoires (cas des normes), elle définit l'aptitude à donner des résultats d'essai admissibles, obtenus dans différents laboratoires mettant en œuvre la même méthode sur des échantillons identiques. Sous conditions de reproductibilité, tous les facteurs susceptibles d'influer sur le résultat sont libres.

COMMENT ORGANISER LA VERIFICATION OU LA VALIDATION D'UNE METHODE ?

L'organisation pratique de la vérification ou de la validation va dépendre du besoin de l'application et des réponses attendues en vue de l'usage défini (cf. les cas cités en introduction de la fiche).

Cas de l'adoption d'une méthode publiée

Cas le plus simple, Il s'agit de démontrer que la mise en œuvre de la méthode conduit à des résultats acceptables, autrement dit conformes aux performances attendues.

Les critères de performances à tester vont dépendre de la nature de la méthode, à titre indicatif mais non exhaustif, on citera des estimations :

- De la justesse par l'utilisation de MRC, de MRE ou d'ajouts dosés,
 - De la fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire),
- et, si applicable,
- Des limites de détection et de quantification (exemple des analyses de contaminants,....).

Points à vérifier avant la construction du plan d'expériences :

- Pour la justesse : prendre en compte la plage de mesure et les matrices du domaine d'application du laboratoire. Il conviendra de réaliser la vérification avec un minimum de 3 déterminations.
- Pour la répétabilité et fidélité intermédiaire: \leq à celle de la norme.
- Pour les limites de détection et de quantification : vérifier que les valeurs atteintes sont conformes à celles de la norme.

Cas du développement ou de l'adaptation d'une méthode

Adapter et/ou développer une méthode nécessite de définir des critères de performances pour répondre aux besoins du laboratoire et du client. Ces critères sont : la limite de détection, la limite de quantification, la linéarité, la fidélité, la justesse...

Lignes directrices pour la mise en œuvre

- Définir les objectifs à atteindre : on définira le domaine de validité, les matrices à tester et les niveaux de concentration souhaités.
- Prévoir le nombre, la quantité et la qualité des échantillons représentatifs du domaine à valider. Pour estimer la justesse de la méthode, il faut disposer d'échantillons aux valeurs de référence établies tels que les MRE aux valeurs assignées connues qui facilitent l'interprétation des performances. Il est également possible d'utiliser des étalons de pureté connue, de procéder à des ajouts dosés.
- Construire le plan d'expériences qui décrira les essais à réaliser, fixera le calendrier, et nommera les personnes en charge des essais et le responsable de la validation. Les essais doivent être effectués conformément à la méthode qui précise les dispositions en matière du nombre de répétition exigé.
- Interpréter les résultats. Des tests de comparaison peuvent être appliqués (comparaisons des moyennes, des variances, ...). Les résultats obtenus doivent être en concordance avec les performances attendues pour autoriser l'emploi de la méthode au laboratoire.

Opérations à réaliser :

- Rédiger la version préliminaire du mode opératoire de la méthode en suivant le plan d'un mode opératoire normalisé,
- Construire un plan d'expériences suivant le type de méthode (directe ou indirecte). Le plan d'expérience d'une méthode indirecte va obligatoirement requérir un étalonnage externe nécessaire à la quantification du résultat,
- Prévoir la logistique, en termes de volumes d'échantillons, de réactifs et de disponibilité du personnel,
- Suivre le processus de validation,
- Exploiter les données, interpréter les résultats au regard des critères d'acceptabilité définis,
- Valider la version finale du mode opératoire de la méthode avec ses critères de performance.

REFERENCES NORMATIVES ET BIBLIOGRAPHIQUES

ISO 16140 Microbiologie des aliments, Protocole pour la validation des méthodes alternatives (2003) ISO, Genève

ISO 17994 Qualité de l'eau, Critères pour établir l'équivalence entre les méthodes microbiologiques (2004) ISO, Genève

ISO 11352 Qualité de l'eau - Estimation de l'incertitude de mesure basée sur des données de validation et de contrôle qualité (2013) ISO, Genève

ISO 21748 Lignes directrices relatives à l'utilisation d'estimations de la répétabilité, de la reproductibilité et de la justesse dans l'évaluation de l'incertitude de mesure (2017) ISO, Genève

NF V 03-110 : 2010 Analyse des produits agricoles et alimentaires - Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude (2010) Afnor, Paris

NF T 90-210 Qualité de l'eau - Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire (2009) Afnor, Paris

FD ENV ISO 13843 Qualité de l'eau, Lignes directrices pour la validation des méthodes microbiologiques (2001) ISO, Genève

EURACHEM, The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (2014) 2nd Edition

EURACHEM/CITAC Guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (2012) Third Edition

International Conference on Harmonization (ICH) Q2(R1) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (2005) <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (2002) *Pure Appl. Chem.* 74(5) 835-855

Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) Validation (Proc. 4) <http://www.nmkl.org>

Organisation internationale de la vigne et vin (OIV) OENO 10-2005 Guide pratique pour la validation, le contrôle qualité, et l'estimation de l'incertitude d'une méthode d'analyse œnologique alternative (2005) OIV, Paris <http://www.oiv.int>

Vassault A., alt. Protocole de Validation des Techniques. Commission SFBC (1986) *Annales de Biologie Clinique* 44, 679-745

Feinberg M. Guide de validation des méthodes d'analyses (2009) – Labo-stat. Lavoisier, Edition Tec et Doc. Paris.