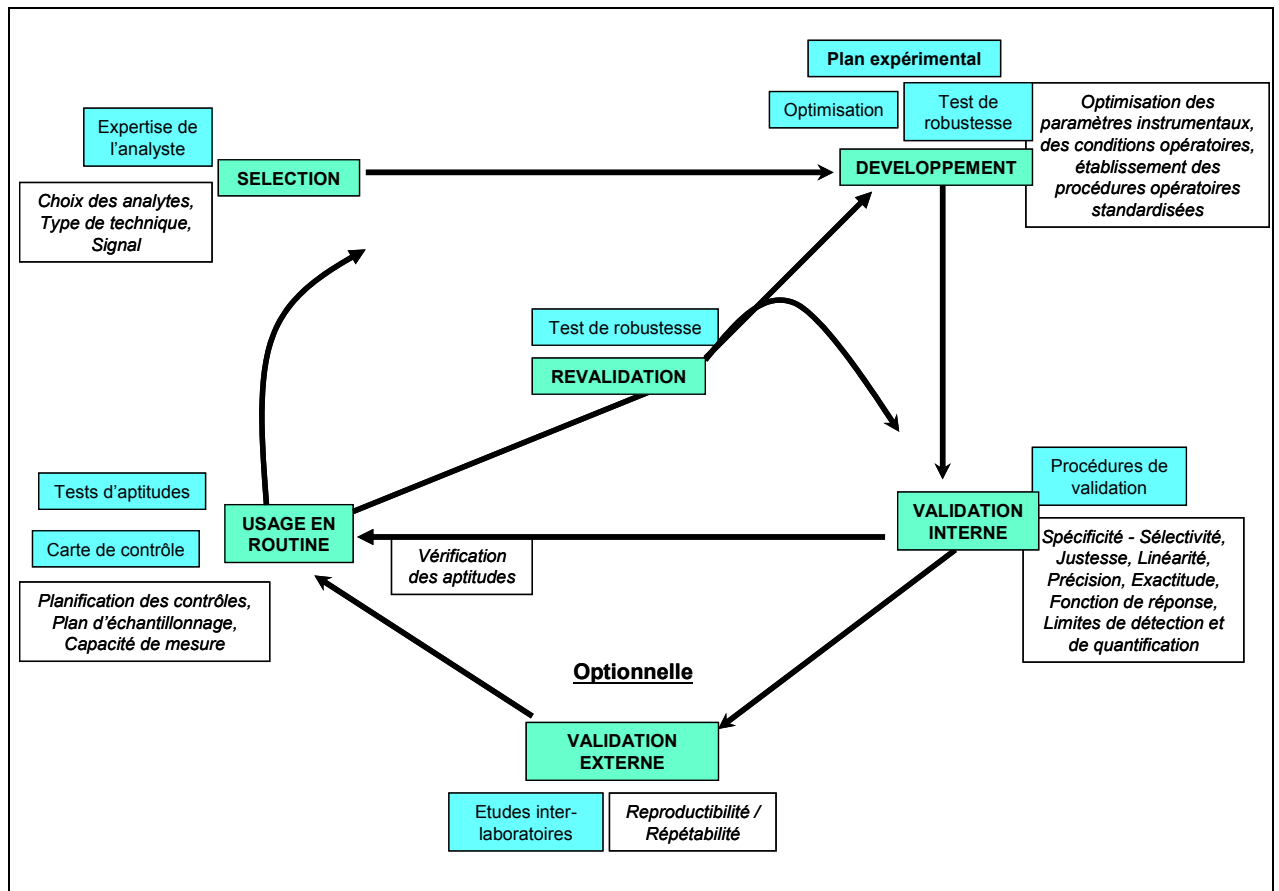


# **I. INTRODUCTION GENERALE**

## **I.1. CYCLE DE VIE D'UNE METHODE ANALYTIQUE**

Une méthode analytique est un moyen visant à exprimer concrètement un besoin bien exprimé, ou encore c'est la réponse matérialisée à un problème donné, comme par exemple dans le cadre de notre travail la présence d'impuretés (chirales) dans un médicament, néfastes pour la santé et dont il faudra déterminer la teneur. Dans le domaine analytique, deux types de méthodes sont mentionnés, les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives. Par rapport à cette dernière, l'objectif d'une méthode analytique peut se résumer en sa capacité à quantifier chacune des quantités inconnues présentes dans un échantillon. La mise en œuvre d'une méthode de dosage peut se décomposer en quatre grandes phases généralement successives telles qu'illustrées dans la figure I.1. [1] :

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



*Figure I.1. – Cycle de vie d'une méthode analytique*

**Légendes** : Les étapes sont reprises dans un rectangle vert (gras), les tests associés dans un rectangle bleu et les critères pour l'évaluation dans un rectangle non colorié (italique).

### I.1.1. SELECTION D'UNE METHODE

L'étape de la sélection est critique pour un analyste. En effet, étant le point de départ d'une méthode, c'est d'elle que dépendent les autres étapes et plus particulièrement les décisions qui seront prises. De ce fait, elle nécessite de bien cerner la problématique en vue de définir clairement les objectifs pour proposer des solutions appropriées, matérialisées en termes de conditions opératoires (output). Un problème mal cerné conduit à des décisions inappropriées, avec comme conséquence la perte de temps, de réactifs et d'argent, d'où la

nécessité d'une bonne expertise de l'analyste qui devra s'appuyer sur un maximum d'*a priori*, d'informations pertinentes (input). La sélection de la méthode étant faite, il est indispensable d'effectuer des expériences complémentaires en vue de s'assurer du bien fondé de la méthode et de la capacité de sa mise en œuvre par le laboratoire par rapport à l'usage requis [1].

### **I.1.2. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE**

La réalisation de cette phase peut se faire au moyen ou non d'un plan d'expériences selon la problématique définie lors de l'étape de la sélection. Toutefois, il s'avère que dans certaines situations, bien que les conditions opératoires analytiques soient optimisées, l'application en routine de méthodes analytiques n'aboutit pas forcément à un résultat satisfaisant. En effet, d'autres objectifs sont parfois ajoutés en phase de routine, par exemple l'adaptation d'une méthode pour le dosage d'une molécule similaire ou d'impuretés découvertes en phase de routine qu'il faudra quantifier impérativement, utilisation de la méthode dans une autre application (bioanalyse). Dans ce cas, il est indispensable d'optimiser à nouveau la méthode et recourir à un plan d'expériences.

#### **I.1.2.1. MÉTHODOLOGIE DES PLANS D'EXPÉRIENCES**

Les plans d'expériences font partie de la chimiométrie [2]. L'objectif poursuivi est de fournir à l'analyste, moyennant un nombre d'expériences restreint, un maximum d'informations pertinentes pouvant expliquer certains effets, informations susceptibles de ne pas être obtenues par la méthodologie classique univariée. Cette dernière ne fournit des informations que pour un seul facteur étudié, les autres facteurs étant maintenus à un niveau constant.

Puisque dans la méthodologie des plans d'expériences, tous les facteurs sont étudiés simultanément, la stratégie consiste à réaliser les expériences de manière programmée et raisonnée en faisant varier les niveaux de tous les facteurs à la fois [3-5]. Le meilleur moyen pour y parvenir, tout en expliquant les phénomènes observés et en exploitant les résultats obtenus, est l'utilisation des outils mathématiques combinés aux outils statistiques ce qui,

paradoxalement, rend complexe leur mise en œuvre. Cependant, grâce à l'apport fondamental de l'informatique, au développement et à la disponibilité de nombreux logiciels développés à cet effet, leur utilisation est maintenant rendue plus accessible et surtout plus rapide.

Plusieurs types de plans sont définis pour réaliser les expériences et sont décrits dans la littérature [6-9]. Retenons que les plans d'expériences sont généralement répartis en plans factoriels complets et fractionnaires. Cependant, pour le choix d'un plan adéquat, il y a un certain nombre de prérequis tels que l'objectif poursuivi par l'analyste, le type et le nombre de facteurs à étudier, les informations à recueillir, et même les exigences de l'expérimentateur.

### **I.1.2.2. MODÉLISATION**

Sans une modélisation, les plans d'expériences n'ont aucune valeur informative ni exploitable. La modélisation permet d'exprimer la relation entre, d'une part, la réponse ( $Y$ ) qui le plus souvent, est un paramètre de performance de la méthode analytique, et, d'autre part, les facteurs à étudier ( $X_1, X_2, X_3 \dots X_p$ ). Le choix du modèle (premier ou second degré) dépendra des objectifs poursuivis, du nombre de facteurs considérés ainsi que du nombre de niveaux à tester par facteurs. L'équation I.1. représente un modèle appliqué sur la base d'une régression linéaire multiple pour  $p$  facteurs :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^p \beta_i X_i + \sum_{j=1}^p \sum_{k=1}^p \beta_{jk} X_j X_k + \varepsilon \quad (\text{I.1.})$$

Dans cette équation, le terme quadratique apparaît dans la double somme «  $\Sigma\Sigma$  » lorsque  $j$  est égal à  $k$ , et lorsque  $j$  n'est pas égal à  $k$ , le terme correspond à une interaction entre le facteur  $j$  et le facteur  $k$ ;  $\varepsilon$  étant quant à elle l'erreur résiduelle. Signalons encore qu'un terme quadratique ne peut être obtenu qu'avec un plan d'expériences dans lequel plus de deux niveaux sont envisagés.

### **I.1.2.3. OPTIMISATION**

L'une des applications des plans d'expériences correspond au criblage dans un domaine expérimental fixé, de tous les facteurs potentiellement influents, y compris ceux qui

ne semblent ne jouer qu'un rôle mineur. Les plans expérimentaux appropriés dans ce cas sont des plans factoriels complets ou fractionnaires à deux niveaux. Les facteurs ayant une influence réellement significative étant identifiés, leur optimisation peut ensuite être envisagée. Elle consiste en la sélection parmi la multiplicité de solutions potentielles, de la meilleure solution par rapport à des critères bien définis et ce, toujours au moyen des plans d'expériences. Cependant, les plans factoriels à deux niveaux ne conviennent pas pour l'examen des situations spécifiques à l'optimisation, par exemple les effets quadratiques qui doivent pouvoir être évalués au même titre que les effets principaux et les interactions ponctuelles entre les différents facteurs. Ainsi, il est nécessaire de recourir à un modèle du second degré. L'équation I.2. illustre un exemple de modèle pour lequel trois facteurs ( $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$ ) sont considérés :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \varepsilon \quad (\text{I.2.})$$

$Y$  étant la réponse,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$  les effets principaux de ces facteurs,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  et  $\beta_{33}$ , leurs effets quadratiques,  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  et  $\beta_{23}$  les effets d'interaction entre deux facteurs et  $\varepsilon$  l'erreur résiduelle. La mise en pratique de tels modèles nécessite l'application de plans d'expériences adéquats, parmi lesquels peuvent être cités le réseau de Doehlert, le plan factoriel complet à 3 niveaux, le plan algorithmique D-optimaux, le plan central composite et le plan de Box-Behnken [10-12].

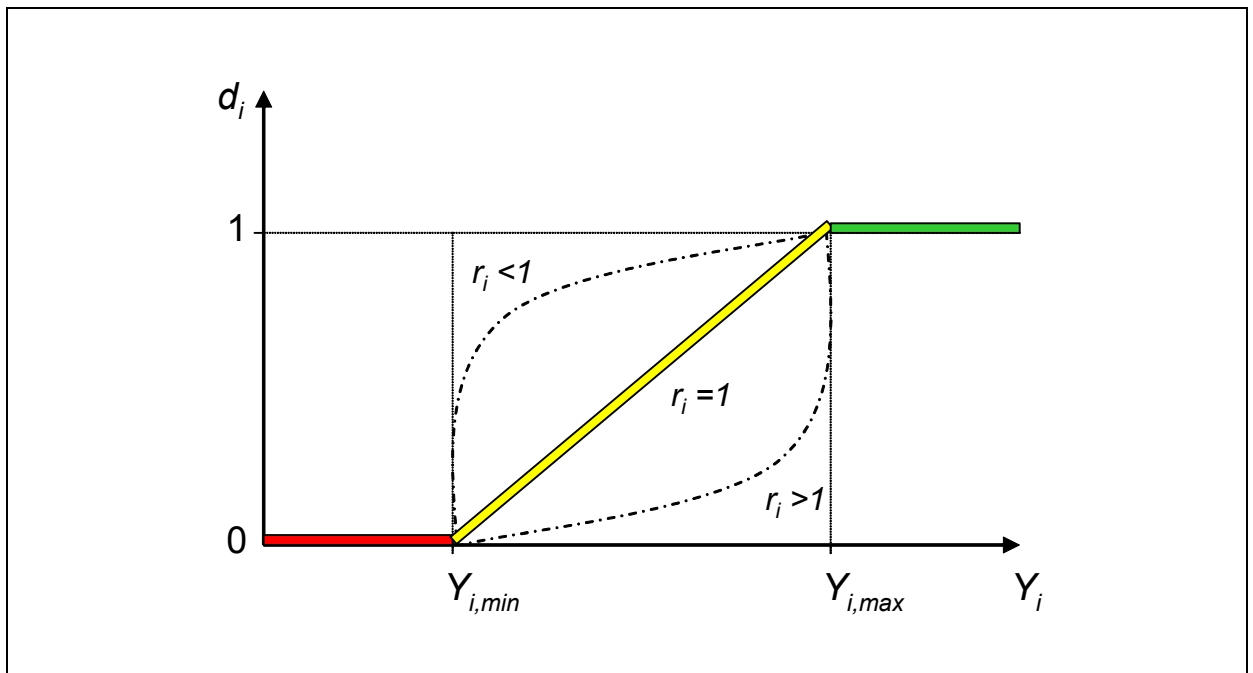
Cependant, il arrive parfois que, lors de l'optimisation, la relation entre la réponse sélectionnée et les facteurs étudiés ne soit pas modélisable par les outils mathématiques usuels. Ce cas de figure est généralement observé lorsque les réponses sont des paramètres intermédiaires, comme par exemple la résolution, fréquemment utilisée comme critère pour qualifier l'optimalité des conditions opératoires d'une méthode séparative [13-17]. En effet, on peut constater que la relation entre la résolution et un facteur donné  $X$  décroît jusqu'à un minimum voire même zéro, puis ensuite croît [18]. Dans ce cas, il est recommandé d'effectuer une modélisation indirecte qui peut se faire en deux étapes [19]: la première consiste à modéliser les différentes réponses directement issues de l'exécution des expériences et aisément modélisables, telles que le temps de rétention, le temps de migration ou les largeurs à mi-hauteur des pics des analytes. Ensuite, les réponses obtenues lors de cette première étape permettent d'estimer les différentes réponses non modélisables telles que la résolution, le facteur de symétrie, le nombre de plateaux théoriques. Celles-ci sont souvent des réponses

d'intérêt puisqu'elles vont permettre de juger la qualité de la performance d'une méthode séparative obtenue pour chaque condition expérimentale relevant des facteurs concernés. Les réponses d'intérêt doivent être fonction des réponses obtenues à la première étape.

#### **I.1.2.4. OPTIMISATION SIMULTANÉE DE PLUSIEURS RÉPONSES**

L'optimisation des valeurs des facteurs peut devenir une situation difficile à résoudre, en particulier lorsqu'il y a plusieurs réponses à rendre optimales. Il est dès lors indiqué de recourir à des approches multiréponses, par exemple celle proposée par Lantéri et Longerey [2], qui considère l'indice global d'une séparation comme facteur de réponse permettant d'apprécier la qualité globale d'une séparation ou encore celle qui utilise le critère d'optimalité de Pareto [20, 21]. Cette dernière approche qui a été introduite dans la chromatographie par Smilde et coll. [21], permet de décider de l'optimalité d'une expérience en considérant le fait qu'il n'y a aucune autre expérience qui ait un meilleur résultat sur un critère sans pour autant avoir un résultat défavorable sur un autre. Citons d'autres approches telles que celles utilisant les fonctions d'objectifs basés sur les rapports des réponses ou sur les fonctions d'utilité des réponses. Cependant, ces approches sont très vite limitées lorsque l'importance des réponses doit être prise en considération de manière individuelle. Une autre limitation non moins importante apparaît lorsque, par exemple, les réponses impliquent aussi des pics non adjacents et plus particulièrement lorsque celles-ci sont des réponses d'intérêt. Il est alors recommandé de s'orienter vers des approches qui considèrent la prise de décision basée sur des critères multiples « Multicriteria decision making » et pondérables [20, 22, 23].

La fonction de désirabilité définie par Harrington [24] et par Derringer et Suich [25] est l'une des approches les plus utilisées. Initialement introduite en chromatographie liquide par Bourguignon et Massart [26], la fonction de désirabilité de Derringer a fini par être largement adoptée par les analystes pour résoudre des situations complexes lors de l'optimisation de méthodes analytiques [19, 27, 28-37]. Elle est basée sur la transformation de toutes les réponses obtenues à partir de différentes échelles de mesure en une échelle identique de désirabilité et sans dimension. Les valeurs des fonctions de désirabilité ( $d_i$ ) sont comprises entre 0 et 1. Comme le montre la figure I.3. la valeur de 0 est attribuée lorsque les facteurs conduisent à une réponse inacceptable (non désirable) et celle de 1 lorsque la réponse représente la performance maximale désirée pour les facteurs considérés [17, 26].



**Figure I.3.** – *Désirabilité ( $d_i$ ) d'une réponse  $Y_i$  pour un facteur considéré  $r_i$*

L'équation permettant de calculer les valeurs de désirabilité individuelles peut être ainsi présentée :

$$d_i = \begin{cases} 0 & \Leftrightarrow Y_i \leq Y_{i,\min} \\ \left[ \frac{Y_i - Y_{i,\min}}{Y_{i,\max} - Y_{i,\min}} \right]^{r_i} & \Leftrightarrow Y_{i,\min} < Y_i < Y_{i,\max} \\ 1 & \Leftrightarrow Y_i \geq Y_{i,\max} \end{cases} \quad (\text{I.3.})$$

avec :  $Y_{i,\min}$ , la valeur en dessous de laquelle la réponse  $Y_i$  ne convient pas ( $d_i = 0$ ) ;

$Y_{i,\max}$ , la valeur cible au dessus de laquelle la réponse  $Y_i$  est très satisfaisante ( $d_i = 1$ ) ;

$r_i$ , le facteur modifiant l'importance d'une augmentation de la réponse  $Y_i$  pour la désirabilité individuelle considérée. Cela correspond à la pondération du facteur dépendant de l'utilisateur en fonction du degré de désirabilité que l'on voudrait avoir pour une réponse donnée entre  $Y_{i,\min}$  et  $Y_{i,\max}$ .

Ensuite, l'ensemble des désirabilités individuelles est rassemblé en une seule désirabilité globale  $D$  qui est leur moyenne géométrique. La valeur de  $D$  la plus élevée est obtenue dans les conditions où la combinaison des différentes réponses est globalement optimale.

### I.1.3. VALIDATION

La validation est l'ensemble des opérations effectuées en vue de prouver qu'une procédure est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis pour l'usage prévu (de la méthode de dosage) [38-43]. Plusieurs procédures ont été élaborées à cet effet [38, 44-49]. 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'acceptation définies *a priori* et du risque relatif à l'usage futur de la méthode.

Récemment, une nouvelle stratégie de validation basée sur le profil d'exactitude a été introduite [50, 51]. Elle est en parfait accord avec l'objectif d'une méthode analytique, à savoir sa capacité de quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues qu'un laboratoire aura à déterminer [43]. A ce stade, il est important de définir certains termes fréquemment rencontrés en validation.

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série homogène de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée. La mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de recouvrement et de biais absolu ou relatif (erreur systématique) [50, 52]. Une valeur conventionnellement vraie peut être par exemple un étalon international, un étalon d'une pharmacopée.

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard [50]. Elle peut être évaluée à trois niveaux, à savoir la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité. La reproductibilité n'est envisagée que dans le cas d'étude inter-laboratoires.

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ». L'étroitesse d'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématiques et aléatoires, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat [50, 52].

La nouvelle stratégie de validation permet d'associer les deux éléments fondamentaux de la validation que sont la justesse et la fidélité au résultat final d'une mesure, et par conséquent de tenir compte de l'erreur totale de mesure (erreur systématique + erreur



aléatoire) [50]. Le principe de cette stratégie de validation peut être traduite par l'équation I.4. qui stipule que la différence entre une mesure ( $x$ ) et sa vraie valeur ( $\mu$ ) doit être inférieure à la limite d'acceptation ( $\lambda$ ) définie *a priori*.

$$-\lambda < x - \mu < \lambda \Leftrightarrow |x - \mu| < \lambda \quad (\text{I.4.})$$

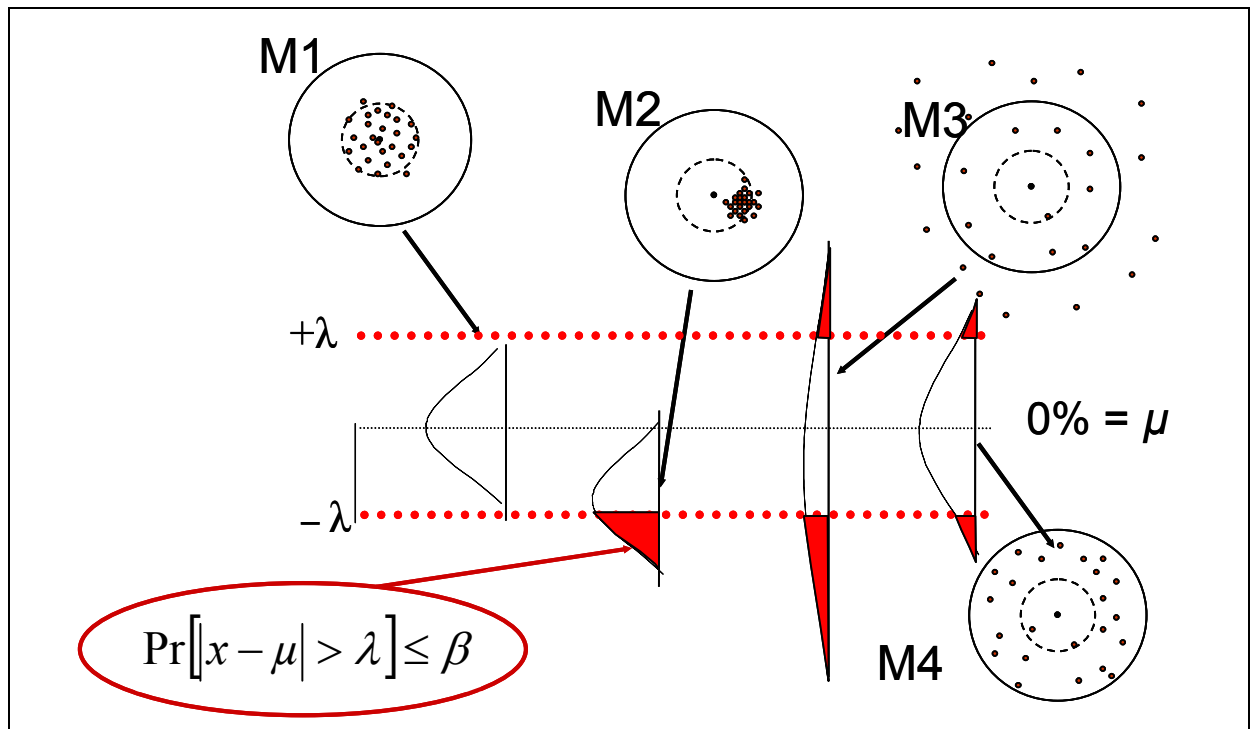
La notion de limite d'acceptation introduit donc un premier critère permettant à l'analyste de prendre des décisions basé sur l'objectif de la méthode analytique. Communément, la limite d'acceptation est de 1% ou 2 % pour le dosage de principes actifs dans une matière première, de 5 % pour les formes pharmaceutiques et de 15 % pour les analyses dans les matrices biologiques ou environnementales [50, 51]. Pour la détermination des impuretés, une limite d'acceptation minimale de 10 % est communément admise [53, 54].

Le profil d'exactitude est construit à partir des estimés de l'intervalle de tolérance d'espérance  $\beta$  de mesures attendues à chaque niveau de concentration.

Une autre notion importante définie est celle de « bonne procédure analytique » avec un risque connu qui peut se traduire par la relation suivante :

$$\Pr[|x - \mu| > \lambda] \leq \beta \quad (\text{I.5.})$$

avec  $\beta$  la proportion de mesures dans les limites d'acceptation, et  $\lambda$  la grandeur définissant les limites d'acceptation fixées *a priori* en fonction des contraintes du secteur d'activité. Le risque associé d'une procédure s'évalue par la proportion attendue de mesures en dehors des limites d'acceptation [50, 55]. Le risque associé dépend des estimés du biais et de la précision de la procédure analytique obtenus en phase de validation comme le montre la figure I.4. Précisons dès à présent que dans le cadre de notre travail nous avons considéré qu'une « estimation » est un moyen par lequel on obtient une valeur qui est l'« estimé ». La formule qui est appliquée pour obtenir cet estimé est quant à elle l'« estimateur ».



**Figure I.4.** – *Profil d'exactitude comme outil de décision pour quatre méthodes M1 (fidèle et juste), M2 (fidèle mais non juste), M3 (non fidèle et non juste) et M4 (non fidèle mais juste)*

Ainsi, le profil d'exactitude est un outil de décision basée sur le risque associé à la méthode. La notion de risque est liée à la garantie concernant la future analyse des échantillons inconnus tout en appliquant la méthode validée. Par conséquent, le profil d'exactitude peut servir à accepter ou rejeter une méthode analytique suivant l'usage attendu. Par ailleurs, le profil peut également être utilisé comme outil de diagnostique. Par exemple, il peut être utilisé pour sélectionner le modèle de régression le plus approprié pour la calibration et pour déterminer les limites de quantification supérieure et inférieure et à sélectionner ainsi que l'intervalle de dosage [54].

Une troisième notion relative à cette nouvelle stratégie de validation importante dans le cadre de notre travail est sa possibilité d'estimer l'incertitude de mesure sur la base des données de validation [1]. Cette notion sera explicitée ultérieurement dans ce travail.

#### I.1.4. ROBUSTESSE

Selon la figure I.1., la robustesse est considérée comme une étude qui se réalise dans les étapes de développement et de validation. Selon ICH, la robustesse fait partie de la validation [56] et est réalisée en complément des expériences de validation. Cependant, dans la pratique courante, les analystes la considèrent très souvent comme étant une étape distincte de la validation. A cause du risque lié à l'obtention d'une méthode non robuste (perte de temps, d'argent et parfois frustration des opérateurs), certains analystes préfèrent tester la robustesse d'une méthode en phase de développement et d'optimisation [56, 57].

La robustesse d'une procédure analytique est la mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des changements faibles mais délibérés des paramètres de la procédure [56, 58-61]. Elle fournit une indication sur la fiabilité d'une procédure lors de son usage normal [56-61]. Suite à l'évaluation de la robustesse, une série de paramètres permettant de vérifier les performances du système peuvent être établis en vue de s'assurer que la validité de la procédure est maintenue à chaque application [62]. La robustesse peut donc servir à fixer les valeurs pour les tests de conformité du système (System Suitability Test) ainsi que leurs limites [59, 62, 63]. Elle est également importante pour l'identification des facteurs expérimentaux n'ayant pas nécessairement été évalués en phase d'optimisation mais qui cependant, pourraient avoir une influence sur les résultats. Il est en effet important de pouvoir anticiper les problèmes susceptibles de survenir lors de l'application de la méthode, par exemple lors de l'analyse en routine ou au cours d'une étude collaborative [59, 63, 64]. Si les mesures sont sensibles aux variations des conditions analytiques, il est alors exigé de maintenir les conditions opératoires aussi constant que possible ou d'introduire une précaution particulière dans la description de la méthode [62].

Ce sont généralement les réponses qualitatives qui sont le plus souvent examinées pour évaluer la robustesse d'une méthode. Cependant, les réponses quantitatives doivent être considérées étant donné l'objectif d'une méthode qui est la détermination quantitative d'une substance dans un échantillon. Il est dès lors envisageable de se servir de la robustesse comme un outil de prédiction du comportement d'une méthode lors de son usage. Particulièrement pour les réponses quantitatives, le test de robustesse peut servir à prédire l'exactitude et la reproductibilité [59, 62, 65-67].

Parfois l'examen des graphiques des surfaces de réponse obtenus en phase d'optimisation peut servir de point de départ pour une évaluation préliminaire de la robustesse

des facteurs étudiés. Cependant, le meilleur moyen reste l'application des plans d'expériences qui, comme énoncé précédemment, offrent l'avantage d'étudier simultanément plusieurs facteurs et d'en tirer les conclusions pertinentes. Bien qu'il existe quelques applications des plans expérimentaux utilisant plusieurs niveaux [64, 65], ce sont surtout ceux à deux niveaux, notamment les plans factoriels fractionnaires [68-70] ou les plans de Plackett-Burman [70, 71] qui sont les plus utilisés. Ils conviennent pour l'évaluation d'un nombre relativement important de facteurs avec un nombre relativement restreint d'expériences. De plus, seuls les effets principaux des facteurs sont évalués, ce qui simplifie l'exploitation des résultats. Du fait de leur mise en œuvre facile par rapport aux plans fractionnaires, les plans de Plackett-Burman sont conseillés pour les analystes peu expérimentés dans ce domaine. Quelques plans recommandés sont présentés dans le tableau I.1.

**Tableau I.1. Plans de Plackett-Burman**

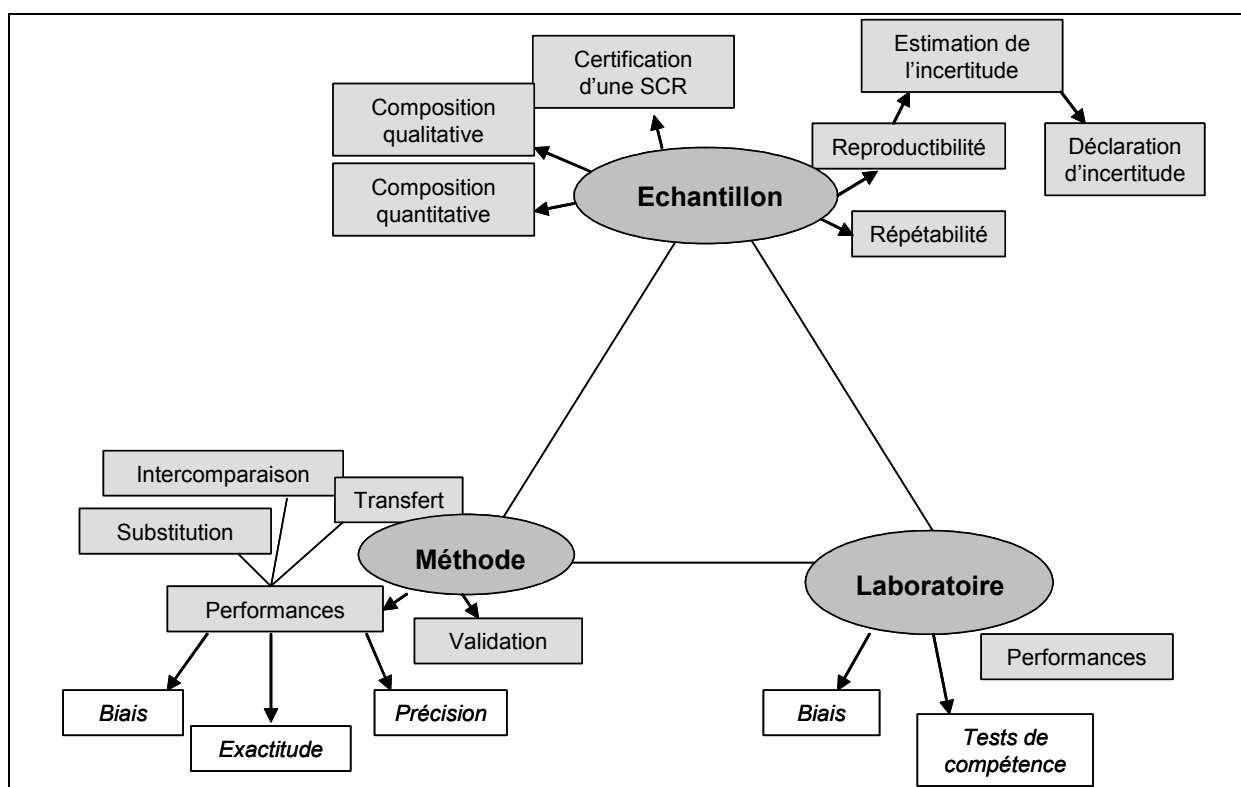
Nombre de facteurs	Plan de Plackett-Burman sélectionné	Nombre de variables fictives (dummy)	Nombre d'expériences
3 – 7	Plan pour 7 facteurs	4 – 0	8
8 – 11	Plan pour 11 facteurs	3 – 0	12
12 – 15	Plan pour 15 facteurs	3 – 0	16
16 – 19	Plan pour 19 facteurs	3 – 0	20
20 – 23	Plan pour 23 facteurs	3 – 0	24

Comme indiqué dans le tableau I.1., il est possible de tester la robustesse d'une méthode avec 7 facteurs opératoires et ce, en appliquant un plan de Plackett-Burman avec 8 expériences. Ainsi que l'a proposé Hund et coll. [115], il est envisageable de simuler une étude inter-laboratoires pour laquelle les normes ISO [52] exigent un minimum de 8 laboratoires.

### I.1.5. ETUDE COLLABORATIVE

Une étude collaborative (ou inter-laboratoires) ne constitue pas au sens strict une étape du cycle de vie d'une méthode. Cependant, elle est reprise au niveau des tests d'aptitude lors de l'utilisation en routine de la méthode (figure I.1.) dont elle est considérée comme précurseur. Selon Lowthian et coll. [72], une méthode est déclarée entièrement valide lorsque ses performances ont été prouvées au moyen d'une étude inter-laboratoires. Une étude inter-laboratoires peut donc être définie comme un ensemble d'essais effectués momentanément dans différents laboratoires représentatifs de la population de laboratoires susceptibles d'utiliser la méthode en routine.

Une étude inter-laboratoires fait intervenir notamment trois entités : « laboratoire », « méthode » et « substance » (Figure I.5.).



*Figure I.5. – Principaux objectifs (rectangles gris) poursuivis lors d'une étude inter-laboratoires pour les trois entités impliquées (cercle gris en caractères gras) en se servant des critères définis (rectangle avec caractères italiques).*

Dès lors, les différents objectifs poursuivis [73] se rapporteront à ces entités d'une manière ou d'une autre, ce qui concorde avec la définition donnée par Horwitz dans le 4<sup>ème</sup> rapport de l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée [74] et par Maier et coll. [75].

Au niveau de l'entité « méthode », l'étude inter-laboratoires permettra d'en évaluer les performances en termes d'exactitude, de biais et de précision (répétabilité et reproductibilité) [52, 73, 75-79] dans un but d'intercomparaison ou de substitution de méthodes. D'autres objectifs consistent à démontrer la capacité de transfert d'une méthode selon des critères bien définis [73, 78], de valider une nouvelle méthode ou une méthode améliorée en la comparant avec une autre dont la validité est avérée ou une méthode de référence [75].

Par rapport à l'entité « laboratoire », une étude permettra d'évaluer ses performances (biais du laboratoire) [73, 77]. Dans ce cas, il sera impliqué dans des tests d'aptitude (Proficiency Testing Schemes) [80-82] dont les résultats seront vérifiés lors d'accréditation (ISO 17025).

Enfin, une étude inter-laboratoires pourrait servir à l'identification des composés [73, 80], à la détermination de la composition quantitative d'un échantillon [79] ou à la certification d'une substance chimique de référence (SCR) [73, 78, 81, 83]. De plus, la reproductibilité des résultats peut être déterminée, ce qui permettra de calculer l'incertitude des résultats et de pouvoir estimer l'incertitude associée aux futurs résultats [84].

L'étude inter-laboratoires constitue certainement une étape pertinente pour une méthode avant son application à une large échelle. Par conséquent, il est important qu'elle soit bien préparée et menée convenablement selon un protocole bien défini, judicieusement élaboré pour permettre d'atteindre la plupart des objectifs fixés. Le protocole doit être bien compris par les différentes parties impliquées et convenu entre elles. L'étude collaborative doit refléter le plus possible l'usage en routine de la méthode dans les conditions du laboratoire d'accueil. Au niveau de la préparation de l'étude, il est indispensable de veiller à différents aspects notamment la compétence des différents opérateurs, le caractère approprié des équipements utilisés, la pertinence des tests statistiques appliqués pour les traitements des données, l'interprétation des résultats et l'établissement des conclusions [52, 73, 78, 85]. Les aspects administratifs doivent aussi être considérés. Un protocole trop chargé, incompris ou mal élaboré peut conduire à des résultats inutiles, scientifiquement inexploitable, et parfois pouvant être la cause des abandons d'études. Dès lors, pour circonscrire ces situations, il est utile d'effectuer préalablement un test préliminaire pour évaluer la mise en œuvre par les laboratoires de la méthode concernée et leur permettre de se familiariser au protocole d'étude.

Il se pourrait qu'une étude inter-laboratoires ne puisse pas aboutir à des résultats attendus ou exploitables pour l'établissement de la reproductibilité. Dans ce cas, elle se limitera à la transcription des résultats obtenus et à un report des problèmes survenus et éventuellement des solutions proposées [86-89]. Une ré-évaluation de la méthode sera dès lors envisagée dans les phases précédentes.

## **I.2. INCERTITUDE**

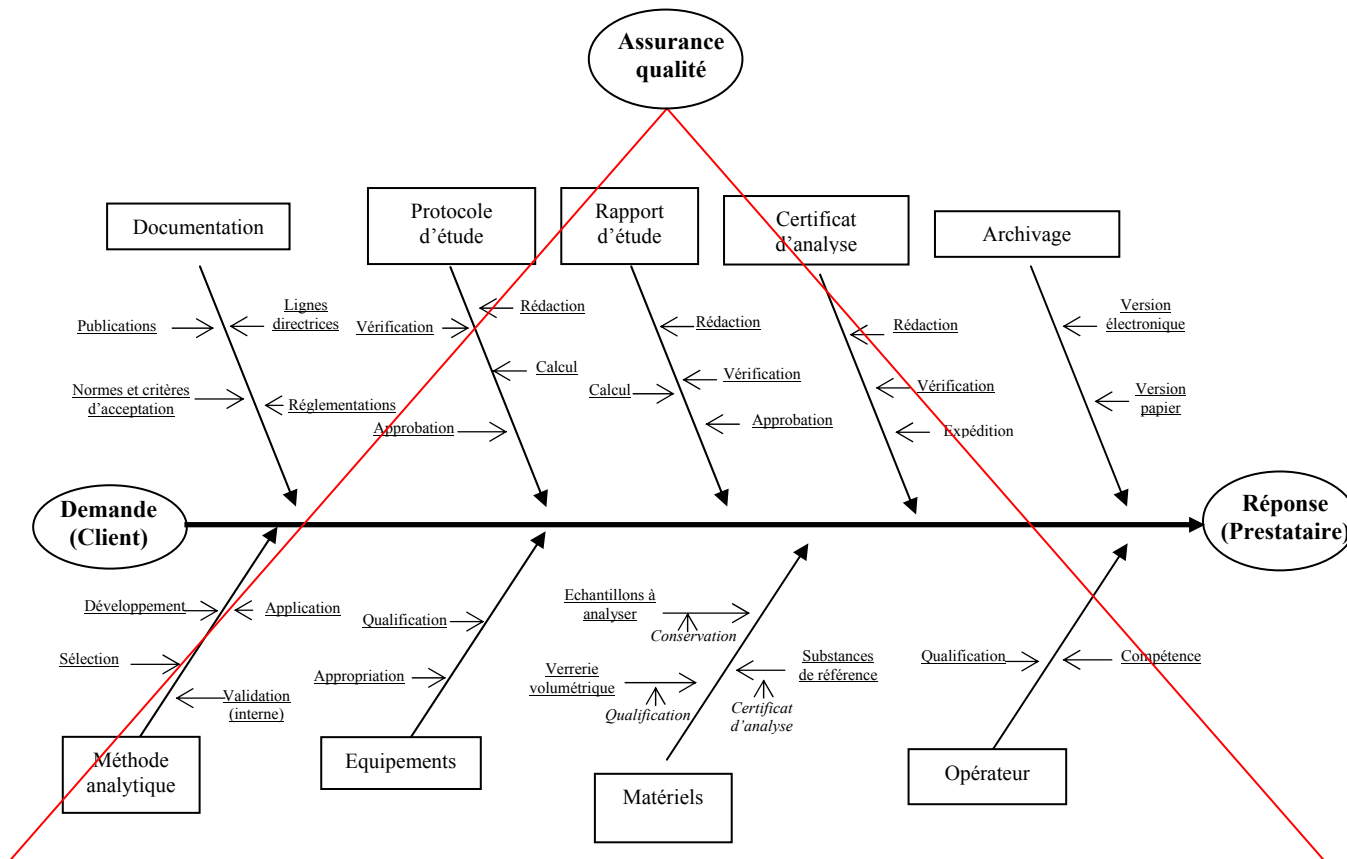
### **I.2.1. GENERALITES**

A l'heure actuelle, dans notre société, le contrôle de qualité devient de plus en plus fréquent et les exigences sur les résultats rendus sont de plus en plus importantes. Il suffit de considérer les domaines où interviennent les résultats des méthodes de dosage pour s'en rendre compte: développement et contrôle de qualité des médicaments, détermination de paramètres de biologie clinique, analyses toxicologiques et médico-légales, contrôles antidopage, analyses de dioxines et de polychlorobiphényles (PCB), d'additifs dans les aliments, etc.

Etant donné l'importance des décisions à prendre, par exemple en conformité avec les réglementations gouvernementales ou les limites à fixer dans les commerces internationaux, il est important de pouvoir démontrer la qualité de ces résultats. Pour ce faire, l'application des méthodes d'analyse validées, des procédures définies de contrôle de qualité interne et la participation aux tests d'aptitude conformément à la norme ISO/CEI 17025 [82] sont des moyens utilisés en vue de satisfaire à ces exigences. Par exemple, en industrie pharmaceutique, comme le montre la figure I.6. les différentes étapes pour l'obtention d'un résultat sont vérifiées par l'assurance qualité.

Afin que les résultats fournis soient valablement interprétés et donc utilisés à bon escient, il faut qu'ils soient fiables c'est-à-dire que leur incertitude soit connue. De plus, il est impossible de déterminer l'adéquation par rapport à l'objectif d'une méthode analytique sans en comparer les estimés de l'incertitude de mesure avec la confiance exigée [91]. Sans la connaissance de l'incertitude de mesure, la déclaration d'un résultat analytique ne peut être considérée complète [92]. C'est pourquoi, la norme ISO 17025 impose depuis 2001 aux laboratoires d'essai et notamment à tous les prestataires de services dans le domaine de la santé humaine d'appliquer des procédures pour l'estimation de l'incertitude de mesure pour leurs résultats d'essais et de mesure et le cas échéant, de rapporter cette incertitude [82, 93].





**Figure I.6.** - *Diagramme d'Ishakawa présentant les différentes interventions vérifiées par l'assurance de qualité en vue de fournir au client de résultats de qualité.*

Cependant, bien que le concept d'incertitude soit clairement établi depuis un certain temps (approches GUM et EURACHEM) [91, 93], il n'en existe pas moins un fossé entre ces exigences normatives et la pratique quotidienne des laboratoires. En effet, les approches « métrologiques » précitées sont complexes, coûteuses et souvent fastidieuses dans le cadre d'analyses impliquant de multiples sources d'erreurs. Elles posent donc un problème économique quasi insoluble pour ces prestataires de services tant et si bien qu'à l'heure actuelle, la plupart d'entre eux sont incapables de répondre valablement à cette exigence.

Sans information sur l'incertitude, l'interprétation des résultats est malaisée et la prise de décision délicate pouvant, par exemple, conduire à la déclaration de conformité d'un produit qui ne l'est pas et inversement à la non-conformité d'un produit qui est conforme. Cette situation peut avoir des conséquences défavorables tant pour la société (santé des consommateurs) que pour les industries (dépenses inutiles et poursuites judiciaires inappropriées).

## I.2.2. DEFINITION DE L'INCERTITUDE

L'incertitude est définie comme étant un paramètre associé au résultat d'une mesure, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourraient raisonnablement être attribuées au mesurande [91, 94, 95].

De nos jours, l'expression de l'incertitude associée aux résultats de mesure devient un paramètre important de performance d'une méthode analytique à considérer à côté des critères de validation [93]. Pour se rendre compte, il suffit de regarder pendant ces cinq dernières années la quantité de directives, normes, recommandations émises et le nombre d'articles publiés en rapport avec l'incertitude.

En fait, lorsqu'une série de résultats de mesures est générée lors de l'application d'une méthode analytique, par exemple lors de la validation d'une méthode de dosage, lors de son étude de robustesse ou lors de son application à large échelle par plusieurs laboratoires, et du fait que ces résultats ne sont jamais identiques, une variabilité de ces résultats est logiquement observée. Celle-ci traduit la dispersion des données dues à ces mesures et est considérée comme une incertitude [94].

Le terme « mesurande » est défini comme étant une quantité particulière sujette à une mesure [94, 96]. Un mesurande peut être la concentration d'un analyte. Ce terme n'est pas très fréquent dans le domaine analytique. Toutefois, il a été repris dans le vocabulaire international de métrologie [95] et adopté dans le domaine de l'incertitude pour le différencier du terme « analyse chimique » employé pour mesurer d'autres grandeurs telles que la couleur, le pH.... Il convient également de le différencier du terme « analyte » préféré en chimie analytique pour définir un élément (ou une substance) recherché ou déterminé dans un échantillon [96].

Parler d'incertitude revient à parler de la qualité de résultats. Celle-ci sous-entend la performance des moyens par lesquels ces résultats sont obtenus, c'est-à-dire une méthode. L'incertitude traduit donc la performance d'une méthode de mesure associée au résultat rendu. Elle est fondamentale pour la comparaison de ces résultats entre eux, et surtout de ceux-ci par rapport à des seuils de toxicité ou de pathologie. La comparaison peut aussi se rapporter à des limites réglementaires (ex: le retrait d'un médicament du marché ou le déclenchement d'une crise alimentaire).

L'incertitude signifie aussi le doute. Dans notre cas, l'incertitude de mesure n'implique pas le doute concernant la validité de la mesure, mais au contraire la connaissance de l'incertitude implique l'augmentation de la confiance sur la validité des résultats de mesure [97].

Bien que la tâche puisse ne pas être facile en terme de temps, l'évaluation de l'incertitude de mesure dans les essais présente plusieurs avantages pour les « laboratoires d'essai » [98] :

- L'incertitude de mesure contribue de façon quantitative à des points importants tels que le contrôle de risques et la crédibilité des résultats d'essai.
- Une déclaration de l'incertitude de mesure peut présenter un avantage concurrentiel direct en ajoutant de la valeur et de la signification au résultat rendu.
- L'évaluation de l'incertitude de mesure apporte des éléments pour optimiser une procédure d'essai au travers de sa meilleure compréhension.
- La connaissance des effets quantitatifs de grandeurs sur les résultats de l'essai améliore la fiabilité de la procédure de l'essai. Des mesures correctives peuvent être mises en œuvre de façon plus efficace.
- Les organismes de certification de produits ont besoin d'informations sur l'incertitude associée aux résultats lorsqu'ils attestent de la conformité aux spécifications.
- Les coûts d'étalonnage peuvent être réduits s'il peut être démontré à partir de l'évaluation que des facteurs d'influence particuliers ne contribuent pas de façon substantielle à l'incertitude.

### **I.2.3. COMPOSANTES DE L'INCERTITUDE**

#### **I.2.3.1. INCERTITUDE TYPE**

L'incertitude type  $u_x$  est l'incertitude d'un résultat  $x$  d'une mesure exprimée à l'aide d'un écart-type. Dans l'estimation de l'incertitude globale, il peut être nécessaire de considérer chaque source d'incertitude et de la traiter séparément pour obtenir la contribution de cette source. Chacune des contributions à l'incertitude prise séparément est appelée composante de l'incertitude. Lorsque les composantes de l'incertitude sont concernées, elles

doivent aussi être exprimées sous la forme d'un écart-type [91, 97]. Pour une distribution donnée, l'écart-type représente la mesure de la dispersion des données autour de la moyenne. Lorsque cette distribution concerne l'ensemble de la population testée, l'expression correcte de l'écart-type de la moyenne est celle de la population et se calcule comme suit :

$$\sigma = \sigma_N = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \mu)^2}{N}} \quad (\text{I.6.})$$

où  $x_i$  est un résultat individuel,  $\mu$  la moyenne de la population et  $N$  la taille de la population. Par contre lorsque cette distribution concerne un échantillon prélevé au sein d'une population, l'expression correcte de l'écart-type de la moyenne est :

$$s = \sigma_{n-1} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{I.7.})$$

où  $\bar{x}$  est la moyenne de l'échantillon,  $n$  la taille de l'échantillon et  $\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}$  la somme des carrés des différences entre chaque valeur  $x_i$  et la moyenne  $\bar{x}$ . L'estimation de l'incertitude de résultat basé sur l'échantillon prélevé au sein de la population de mesure est :

$$u_x = s \quad (\text{I.8.})$$

L'écart-type de la moyenne est la mesure de la variabilité de la moyenne :

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (\text{I.9.})$$

où  $s$  est l'écart-type de l'échantillon et  $n$  la taille de l'échantillon. L'écart-type de la moyenne est aussi connu comme étant l'erreur type de la moyenne.

### **I.2.3.2. INCERTITUDE TYPE COMPOSÉE**

L'incertitude type composée ou incertitude totale est la résultante de toutes les incertitudes types issues des composantes individuelles de l'incertitude. C'est l'écart-type estimé égal à la racine carrée de la variance totale obtenue en combinant toutes les composantes de l'incertitude. La combinaison se fait de deux manières selon que la source d'incertitude est proportionnelle ou non à la concentration de l'analyte [91, 99]. Dans le cas où toutes les sources d'incertitude sont proportionnelles à la concentration de l'analyte, les composantes d'incertitude sont d'abord converties en écart-type relatif puis ensuite combinées. Pour un résultat  $x$  (par exemple la concentration d'une solution stock d'une substance quelconque), affecté par les paramètres  $p$ ,  $q$  et  $r$  (par exemple  $p$  la masse de la substance,  $q$  sa pureté et  $r$  le volume de la solution finale) et les incertitudes correspondantes  $u(p)$ ,  $u(q)$  et  $u(r)$ , l'incertitude type composée  $u_x$  devient :

$$\frac{u_x}{x} = \sqrt{\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(q)}{q}\right)^2 + \left(\frac{u(r)}{r}\right)^2 + \dots} \quad (\text{I.10.})$$

Par contre dans le cas où les sources d'incertitude sont indépendantes de la concentration de l'analyte, les composantes d'incertitude doivent être combinées sous forme d'écart-type. Pour un résultat donné  $x$ , l'incertitude type composée  $u_x$  sera calculée comme suit :

$$u_x = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + u(r)^2 + \dots} \quad (\text{I.11.})$$

### **I.2.3.3. INCERTITUDE ÉLARGIE**

Appelée aussi incertitude globale, l'incertitude élargie  $U_x$  est une grandeur définissant un intervalle autour du résultat d'une mesure, dont on puisse s'attendre à ce qu'il comprenne une fraction élevée de la distribution des valeurs qui pourraient être attribuées raisonnablement au mesurande [91, 99]. L'incertitude élargie est obtenue en multipliant l'incertitude type (composée) par un facteur d'élargissement  $k$ . Le choix de la valeur de ce

facteur dépend du niveau de confiance exigé, de la connaissance de la distribution ainsi que du nombre de degrés de liberté correspondant. Dans la plupart des cas il est recommandé d'utiliser la valeur de  $1,96 \approx 2$  correspondant au quantile à 95 % bilatéral de la distribution gaussienne (normale). Dans chaque cas, le niveau de confiance est de 95 %. Ainsi, l'incertitude élargie est calculée comme étant  $U_x = ku_x = 2u_x$ , et le résultat final écrit comme suit  $x \pm U_x$ . Cependant, la valeur de  $k$  pourrait être insuffisante, par exemple lorsque l'incertitude composée est basée sur les observations statistiques avec un nombre de degrés de liberté relativement faible. Le choix de  $k$  dépendra alors du nombre de degrés de liberté effectif. D'autre part, lorsque l'incertitude type composée est dominée par une seule contribution avec un nombre de degrés de liberté inférieur à 6, il est alors recommandé de prendre la valeur de  $k$  égale au  $t$  de Student bilatéral associé au nombre de degrés de liberté de cette contribution, et un niveau de confiance exigé, souvent 95 % [99]. Le tableau I.2. présente une liste des valeurs de  $t$  de Student bilatéral au niveau de confiance de 95% [99].

**Table I.2. – Quelques valeurs de  $t$  de Student bilatéral à 95 %**

Degrés de liberté	$t$
1	12,7
2	4,3
3	3,2
4	2,8
5	2,6
6	2,5

#### I.2.4. SOURCES D'INCERTITUDE

En pratique l'incertitude affectant un résultat peut provenir de plusieurs sources possibles, ce qui pourrait expliquer la difficulté relative à l'estimation de l'incertitude de mesure, étant donné que toutes les composantes de l'incertitude contribuent à la dispersion de la distribution de l'incertitude [100, 101]. Lors de l'évaluation de l'incertitude, il faut d'abord

identifier les sources majeures d'incertitude avant de les quantifier. A ce stade, l'objectif serait donc d'établir une liste reprenant toutes les sources possibles d'incertitude dans le but de connaître le besoin à considérer lors de l'estimation de l'incertitude [99]. Quelques cas sont présentés ci-après notamment en rapport avec le type d'évaluation de l'incertitude, l'échelle d'erreur et l'analyse pharmaceutique.

#### **I.2.4.1. SOURCES D'INCERTITUDE SELON LE TYPE D'ÉVALUATION DE L'INCERTITUDE**

Il existe deux manières différentes de classer l'évaluation des composantes de l'incertitude à savoir l'évaluation du Type A et l'évaluation du Type B. Cette classification ne signifie toutefois pas qu'il existe une différence quelconque de nature entre les composantes résultant des deux types d'évaluation.

##### **I.2.4.1.1. Evaluation du Type A**

La méthode d'évaluation du Type A concerne l'évaluation de l'incertitude par l'analyse statistique de séries d'observations. L'évaluation se fait à partir d'une fonction de densité de probabilité déduite d'une distribution de l'effectif observé. La variance estimée  $u^2$  qui caractérise une composante de l'incertitude obtenue par ce type d'évaluation est calculée à partir de séries d'observations répétées. La variance habituelle estimée statistiquement est alors  $s^2$  et l'écart-type estimé  $u$  est donc  $u = s$ . Par commodité  $u^2(x_i)$  et  $u(x_i)$  évalués de cette façon sont parfois appelés respectivement variance de Type A et incertitude-type de Type A. Pour que l'évaluation du Type A soit fiable, il faudra qu'elle soit fondée sur un nombre relativement élevé d'observations statistiquement indépendantes [91, 97].

Cependant, les conditions pour l'estimation de la précision ne sont pas définies. Certaines sources d'incertitude ne peuvent pas être statistiquement évaluées ou leur évaluation statistique n'est pratiquement pas possible ou n'est pas nécessaire. Répondant à ce cas de figure, nous pouvons citer comme exemples l'incertitude en rapport avec l'étalonnage d'un équipement et l'incertitude sur le matériel volumétrique ou l'équipement utilisé. Dans ces cas, les estimations d'incertitude sont faites sur la base d'expériences ou selon l'évaluation du Type B.

#### **I.2.4.1.2. Evaluation du Type B**

L'évaluation du Type B est une méthode d'évaluation de l'incertitude qui se fait par des moyens autres que l'analyse statistique de séries d'observations. Elle se fait à partir d'une densité de probabilité supposée, fondée sur le degré de croyance en ce qu'un évènement se produise, souvent appelé probabilité subjective. Pour une estimation  $x_i$  d'une grandeur d'entrée  $X_i$  qui n'a pas été obtenue à partir d'observations répétées, la variance estimée associée  $u^2(x_i)$  ou l'incertitude type est évaluée par un jugement scientifique fondé sur toutes les informations disponibles au sujet de la variabilité possible de  $x_i$ . L'ensemble d'informations accumulées peut comprendre des résultats de mesures antérieures, l'expérience ou la connaissance générale du comportement et des propriétés des matériaux et instruments utilisés, les spécifications du fabricant, les données fournies par des certificats d'étalonnage ou autres certificats, l'incertitude assignée à des valeurs de référence provenant d'ouvrages et de manuels. Par commodité,  $u^2(x_i)$  et  $u(x_i)$  évalués de cette façon sont parfois appelés respectivement variance de Type B et incertitude-type de Type B [91, 97].

L'évaluation du Type B constitue une alternative pour pallier l'insuffisance d'informations telle qu'observée dans l'évaluation du type A. Ces estimations de l'incertitude sont obtenues au moyen des informations autres que statistiques telles que la littérature ou les spécifications du fabricant [90, 97].

#### **I.2.4.2 SOURCES D'INCERTITUDE SELON L'ERREUR**

##### **I.2.4.2.1. Erreur et incertitude**

L'erreur est définie comme étant la différence entre un résultat individuel et la valeur exacte ou vraie valeur du mesurande. En tant que telle, l'erreur est une valeur unique et la connaissance de cette valeur peut être appliquée pour corriger le résultat. Cependant, en pratique la correction n'est pas faisable car la valeur des erreurs n'est pas exactement connue. L'incertitude quant à elle, prend la forme d'un intervalle et, si elle est estimée pour une procédure analytique et un type particulier d'échantillon, elle peut s'appliquer à toutes les



déterminations décrites de cette façon. La valeur de l'incertitude ne peut parfois pas être utilisée pour corriger le résultat d'une mesure et l'incertitude du résultat d'une mesure ne devrait jamais être interprétée comme représentant l'erreur elle-même, ni l'erreur subsistant après correction [91, 99].

L'erreur a deux composantes. La première, l'erreur aléatoire, résulte typiquement des variations imprévisibles des grandeurs ayant une influence sur le résultat. Ces effets donnent lieu à des variations dans les observations répétées du mesurande. L'erreur aléatoire d'un résultat analytique ne peut être compensée, mais il est possible de la réduire en augmentant le nombre d'observations. La seconde, une composante systématique appelée aussi biais systématique, est définie comme une composante de l'erreur qui, au cours d'un ensemble d'analyses du même mesurande, reste constante ou varie de façon prévisible. Elle est indépendante du nombre de mesures réalisées et ne peut donc être réduite par l'augmentation du nombre d'analyses dans des conditions de mesure constantes [91]. Le biais est la différence entre une valeur observée et la vraie valeur alors que l'erreur aléatoire est la différence entre la valeur observée et celle attendue [96].

Le biais peut avoir aussi deux composantes, le biais de la méthode qui est une erreur inhérente à la méthode et le biais du laboratoire qui peut être considéré comme étant le biais introduit spécifiquement par un laboratoire lors de l'application d'une méthode non biaisée [94].

Finalement, pour le résultat d'une mesure  $x$ , l'erreur (équation I.12.) doit être distinguée de l'incertitude (équation I.13.). Les équations suivantes le montrent clairement:

$$x = \tau + e = \underbrace{\tau + \Delta}_{\mu} + \delta = \mu + \delta \quad (\text{I.12.})$$

où  $\tau$  représente la vraie valeur,  $e$  l'erreur associée qui est composée du biais  $\Delta$  et de l'erreur aléatoire  $\delta$ , et  $\mu$  la valeur attendue obtenue suite à une série d'observations infinies,

$$x \pm U_x \quad (\text{I.13.})$$

où  $U_x$  représente l'incertitude élargie du résultat de la mesure  $x$ . L'incertitude, représentée ici par l'incertitude élargie, est donc un intervalle.

#### **I.2.4.2.2. L'échelle d'erreur**

La classification de l'erreur peut aussi être réalisée en considérant l'échelle d'erreur [102, 103]. Comme l'indique l'équation I.12., un résultat dévie de la vraie valeur à cause de l'existence d'un certain nombre d'erreurs, systématiques ou aléatoires, associées à ce résultat. L'erreur associée à un résultat  $x$  peut donc être décomposée comme suit [104] :

$$x = \text{vraie valeur} + \left\{ \begin{array}{l} \text{biais de la méthode} \\ \text{biais du laboratoire} \\ \text{effet de l'analyse} \\ \text{erreur de la mesure} \end{array} \right.$$

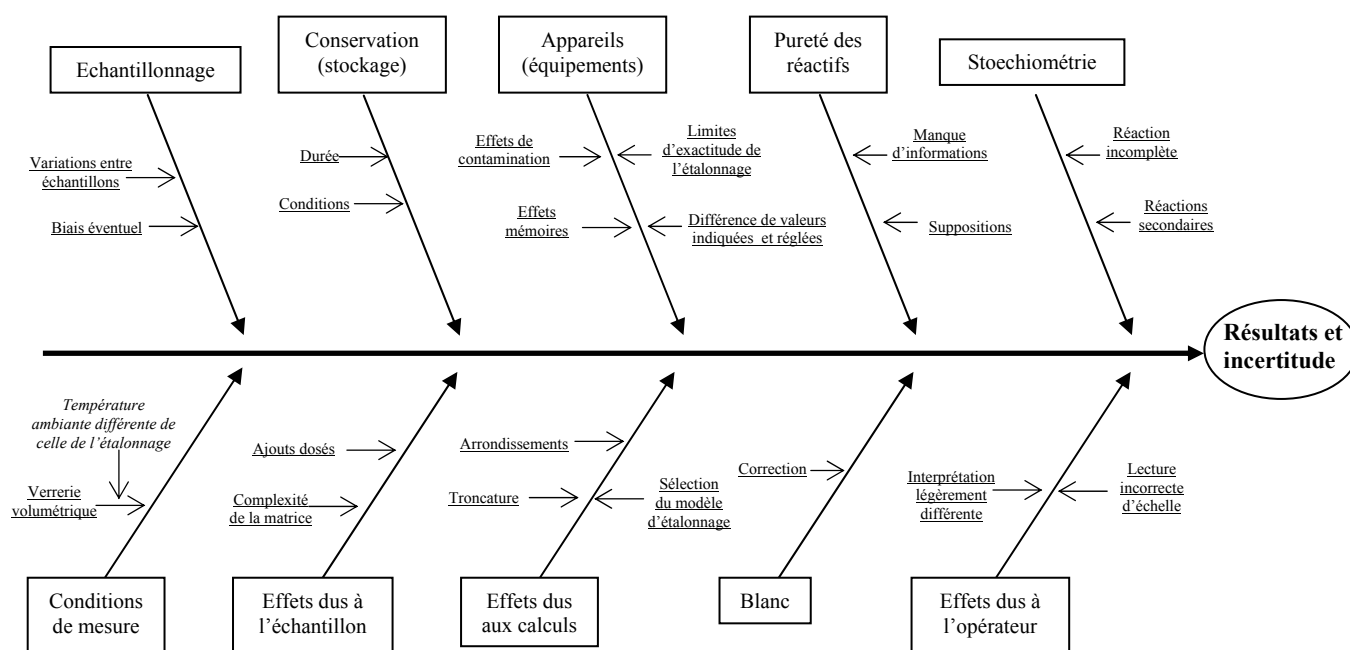
Comme il a été précédemment souligné, le biais de la méthode est une erreur systématique inhérente à la méthode. Le biais du laboratoire peut donc être considéré soit comme une erreur systématique pour un laboratoire individuel, ou soit comme une erreur aléatoire lorsque le laboratoire est considéré comme faisant partie d'une population de laboratoires par exemple dans une étude inter-laboratoires. Dans ce cas, c'est une composante de la reproductibilité de la méthode utilisée. L'erreur due à l'analyse comprend l'estimé de la fidélité intermédiaire qui est une erreur aléatoire résultant des conditions dans lesquelles l'analyse a été faite. Celle-ci peut être faite à des temps différents, par des opérateurs différents ou/et au moyen d'équipements différents. L'erreur due à la répétabilité est une erreur aléatoire qui apparaît lors de l'analyse de plusieurs répétitions d'un échantillon, chaque analyse étant effectuée dans les conditions de répétabilité [104, 105].

#### **I.2.4.3 SOURCES D'INCERTITUDE DANS L'ANALYSE PHARMACEUTIQUE**

Les contrôles de qualité dans le domaine pharmaceutique sont de plus en plus souvent réalisés par des techniques de séparation, en l'occurrence la chromatographie liquide à haute performance (CLHP), dont le domaine d'application s'étend aussi bien au dosage du principe actif qu'à la séparation et détermination des impuretés chirales ou non, en passant par la

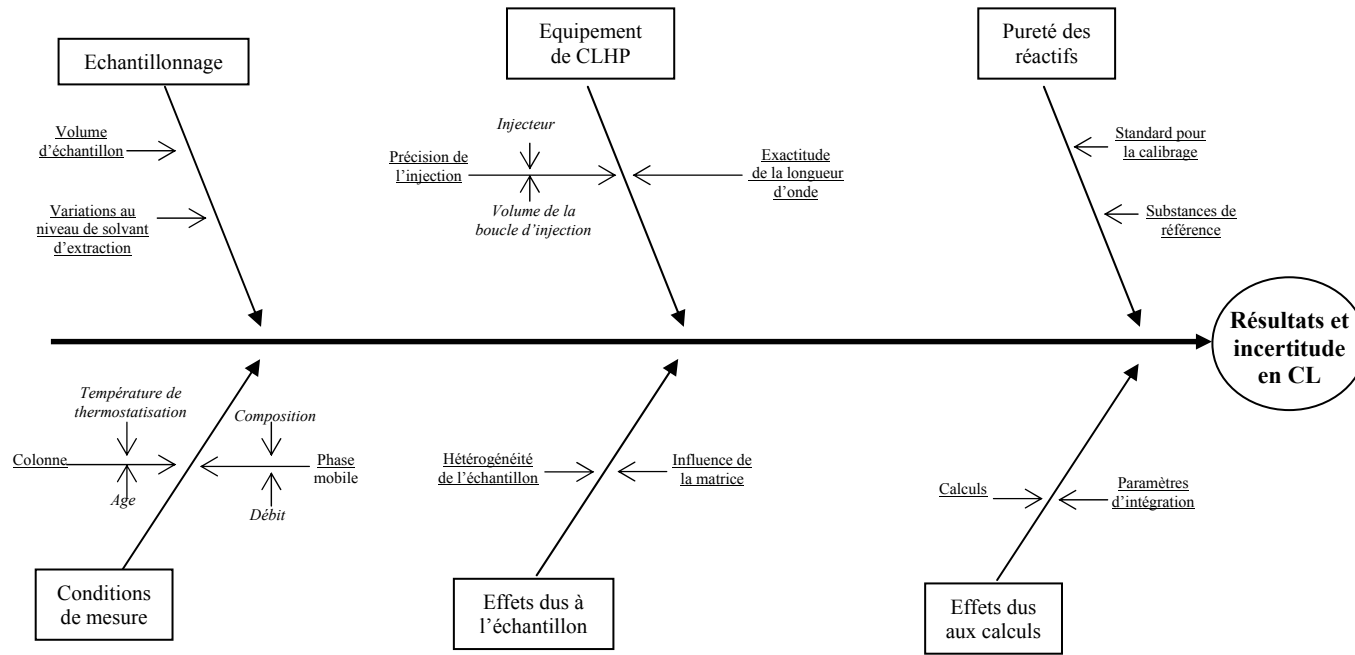
quantification des traces d'ions métalliques et d'anions inorganiques. Cependant, d'autres techniques de séparation sont aussi appliquées pour les analyses dans les domaines précités, telles que l'électrophorèse capillaire (EC) [106]. Bien que présentant encore quelques insuffisances au niveau de la précision des résultats, cette technique se prête bien à la séparation chirale. La rapidité d'obtention des résultats lors du développement des méthodes et surtout l'efficacité de la séparation observée (en terme de nombre de plateaux théoriques) en font une technique très recherchée. Un autre avantage non moins important de cette technique est le coût réduit par analyse. Comme autre technique de séparation, la chromatographie en phase gazeuse est aussi utilisée mais son usage est beaucoup plus limité.

Le grand avantage des techniques de séparation est la possibilité qu'elles offrent d'effectuer une analyse simultanée de plusieurs substances, apportant un gain de temps considérable et une réduction des coûts pour les industriels du secteur pharmaceutique. Néanmoins, un certain nombre d'étapes préalables sont nécessaires en vue de garantir l'obtention de résultats fiables, notamment la vérification des échantillons et des matériels d'analyse, la préparation des solutions d'échantillons et des solutions tampons, la vérification de la performance des équipements. Pourtant, l'accroissement du nombre d'étapes a pour conséquence d'accroître aussi les sources d'incertitude ce qui du reste, demande une maîtrise parfaite de la succession des étapes en vue d'assurer la qualité du résultat final [107]. D'une manière générale, quelques sources sont citées dans le guide Eurachem [91] et sont reprises dans le diagramme de cause à effet ci-après (Figure I.7.):

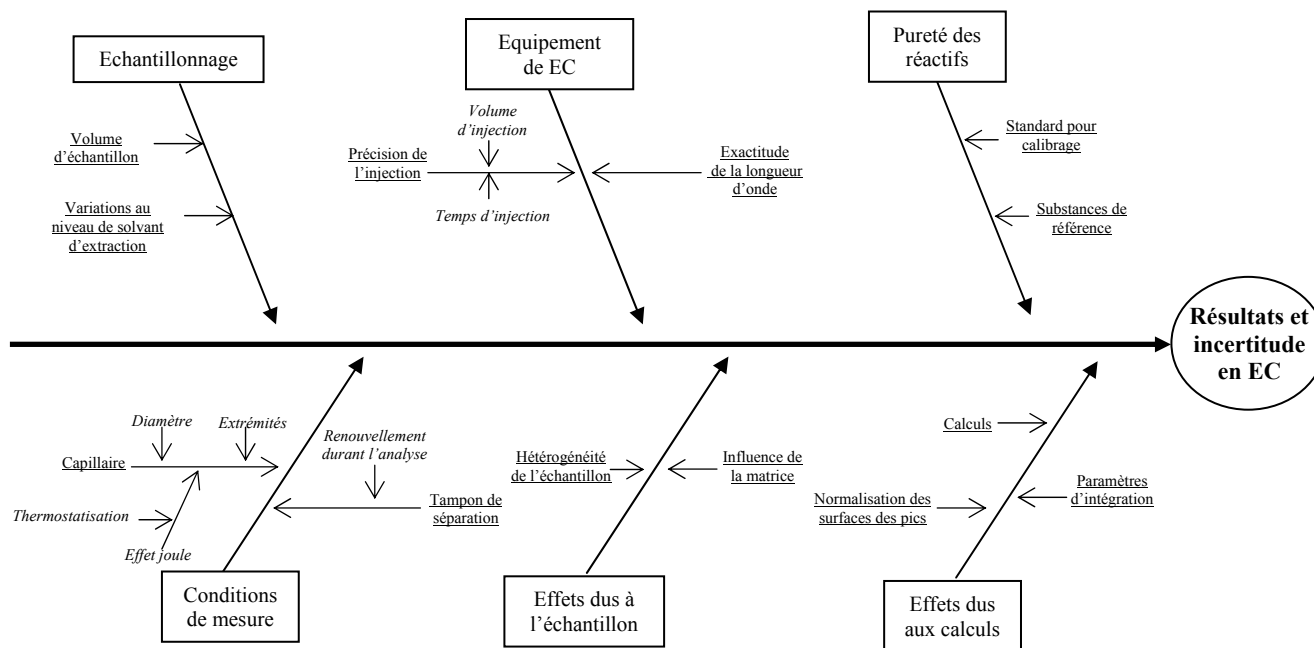


**Figure I.7.** - Diagramme d'Ishakawa présentant les causes et les effets y compris les sources d'incertitudes pour un processus analytique.

A ces sources d'incertitude illustrées ci-avant, il faut encore ajouter les effets aléatoires qui contribuent à l'incertitude dans tout le processus analytique et qui doivent figurer dans le diagramme de cause à effet. Le diagramme peut varier selon la technique analytique utilisée, compte tenu de la complexité et de la diversité des opérations effectuées [107, 108]. D'autres sources propres aux techniques analytiques de CLHP et d'EC sont reprises, respectivement dans les figures I.8. et I.9. [105, 106, 109, 110].



**Figure I.8.** - Diagramme d'Ishakawa présentant les causes et les effets y compris les sources d'incertitude pour une procédure générale d'analyse en chromatographie liquide (CL).



**Figure I.9.** - Diagramme d'Ishakawa présentant les causes et les effets y compris les sources d'incertitudes pour une procédure générale d'analyse en électrophorèse capillaire (EC).

Lorsque les sources d'incertitude sont identifiées, il est important de les maîtriser, de les contrôler et si possible d'évaluer leur contribution à l'incertitude du résultat. Cependant, les moyens permettant d'y arriver ne sont pas toujours bien décrits ou bien assimilés par les analystes. De plus, les estimés d'incertitude ne peuvent être évalués que pour un nombre limité de sources d'incertitude.

### **I.2.5. APPROCHES POUR L'ESTIMATION DE L'INCERTITUDE**

L'examen de la situation existante montre qu'au travers des nombreuses stratégies développées et publiées, un effort considérable a été fourni par les analystes pour parvenir à la détermination de l'incertitude de mesure. Selon la situation en présence, ces stratégies peuvent être classifiées en trois grandes approches: les approches intra-laboratoires n'impliquant qu'un seul laboratoire, l'approche inter-laboratoires impliquant différents laboratoires et les approches mixtes qui combinent d'une manière ou d'une autre les deux premières approches. La quantification de l'incertitude à partir de ces approches est abordée dans la partie I.2.6.

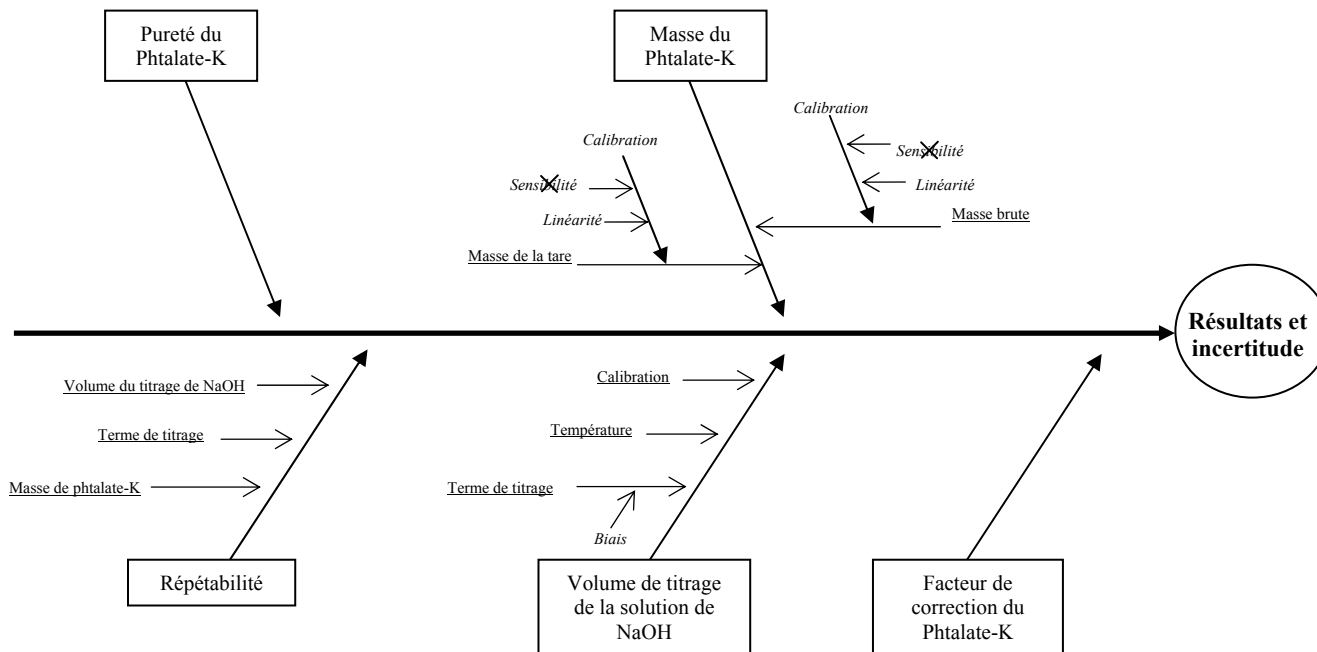
#### **I.2.5.1. APPROCHES INTRA-LABORATOIRES**

##### **I.2.5.1.1. Approche ISO**

Développée par plusieurs organisations internationales oeuvrant dans le domaine de la physique et de la métrologie, l'approche de l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO) connue aussi sous le nom d'approche « bottom-up », approche « error-budget » ou encore approche de propagation d'erreurs a été originalement proposée pour quantifier l'incertitude des mesures physiques [97]. Elle peut être considérée comme une approche intra-laboratoire traditionnelle destinée aux mesures physiques et métrologiques d'où elle tire son nom d'approche physico-métrologique. ISO l'a publiée dans le GUM [97]. En 1990, elle a été adaptée en vue d'estimer l'incertitude des mesures chimiques. A cet effet, elle a été reprise

dans le guide d'EURACHEM [91]. Parallèlement, d'autres lignes directrices comparables pour évaluer et exprimer l'incertitude de mesure ont été publiées par le National Institute of Standards and Technology (NIST) [111].

Du fait que la stratégie de l'approche ISO semble être en parfait accord avec tous les domaines de mesure, elle peut être appliquée pour l'estimation de l'incertitude de n'importe quelle mesure effectuée. L'autre avantage de l'approche ISO est qu'elle permet d'estimer l'incertitude en l'absence d'études inter-laboratoires, celles-ci n'étant pas souvent faciles à réaliser. Plus particulièrement, du fait de l'implication de toutes les sources potentielles d'incertitude (identification des sources et évaluation de leur incertitude et leur ampleur). Cette approche aide à mieux comprendre les techniques analytiques qui ont été appliquées pour effectuer la mesure ainsi que leur principe [112, 113]. Les deux types d'évaluation d'incertitude A et B, peuvent être utilisés. Cependant, pour les mesures chimiques, l'adaptation de cette approche telle que faite par EURACHEM ne retrouve pas des situations similaires. En effet, la tendance des erreurs dans les mesures chimiques diffère de celle rencontrées dans les mesures physiques. Lors de l'estimation de l'incertitude des mesures physiques, ce sont les erreurs aléatoires qui prédominent alors que l'estimation de l'incertitude des mesures chimiques est influencée non seulement par les erreurs aléatoires mais aussi par l'erreur systématique ou biais. A ceci vient s'ajouter la présence de plusieurs sources d'incertitude dans les processus des mesures chimiques comparativement aux processus des mesures physiques [100, 114]. Enfin, cette approche est difficilement applicable pour les méthodes analytiques complexes comprenant plusieurs composantes d'incertitudes. Sa mise en œuvre est dès lors malaisée, ce qui réduit son application à des méthodes analytiques primaires pour lesquelles elle convient parfaitement [115-117]. Un exemple de méthode primaire est présenté dans la figure I.10. avec les sources potentielles d'incertitude inhérentes [99].



**Figure I.10.** – Diagramme d’Ishakawa présentant les sources d’incertitude pour la standardisation d’une solution d’hydroxyde de sodium par titrage à l’aide du phtalate acide de potassium

#### **I.2.5.1.2. Approche par la Validation**

En intra-laboratoire, l’incertitude peut également être évaluée par une seconde approche basée sur l’utilisation des résultats issus de la phase de validation [1, 84, 115-119]. A cette fin, il a été nécessaire de clarifier la relation existante entre la validation et l’incertitude et plus particulièrement de montrer d’un point de vue pratique comment les données de validation peuvent être utilisées en pratique pour estimer l’incertitude de mesure. L’approche introduite par Feinberg et coll. [1] en vue d’estimer l’incertitude de mesure en utilisant les données de validation est considérée comme une avancée pertinente pour les analystes car elle permet de répondre aux difficultés liées à l’estimation pratique de l’incertitude à partir des données de validation. De plus, c’est une approche intra-laboratoire, ce qui permet donc à un laboratoire d’évaluer les performances de ses propres méthodes et éventuellement de les comparer entre elles. Signalons qu’il est important que le choix du protocole de validation puisse être fait avec un maximum de sources de variation en vue



d'obtenir une bonne estimation de l'incertitude. Dans le cas inverse (protocole avec peu de sources de variation), l'estimation de l'incertitude n'est pas bonne.

### **I.2.5.1.3. Approche par la Robustesse**

La particularité de cette approche est qu'elle est réalisée selon l'approche classique inter-laboratoires tout en étant effectuée dans un seul laboratoire. En fait, la stratégie appliquée pour estimer l'incertitude de la reproductibilité dans une étude inter-laboratoires (partie I.2.5.2) est appliquée pour estimer l'incertitude de la reproductibilité à partir des résultats provenant d'un test de robustesse. Partant de sa définition et de ses objectifs [56, 59-62], la robustesse peut être considérée comme une simulation intra-laboratoire d'une étude inter-laboratoires pour autant que les facteurs opératoires soient convenablement sélectionnés et que le plan expérimental pour l'exécution du test comprenne au moins 8 expériences, de manière à simuler le plus possible ce qui pourrait arriver lors d'une étude inter-laboratoires. Ainsi, ces expériences peuvent être assimilées à 8 laboratoires, condition requise par ISO 5725-2 pour mener une étude inter-laboratoires [52].

Cette approche est très avantageuse d'autant plus qu'elle ne requiert pas d'étude inter-laboratoires souvent difficiles à réaliser. Cependant, très peu d'applications sont notées à ce jour. Comme en validation, il est important que le choix du protocole de robustesse puisse être fait avec un maximum de sources de variation en vue d'obtenir une bonne estimation de l'incertitude.

## **I.2.5.2. APPROCHE INTER-LABORATOIRES**

### **I.2.5.2.1 Approche CMA**

Initialement proposée par Wernimont [120] et ensuite reprise par le Comité de Méthodes Analytiques (CMA) de la Société Royale de Chimie, l'approche CMA aussi connue sous l'appellation approche « Top-down » permet de déterminer l'incertitude de mesure à partir d'une étude inter-laboratoires [121]. L'appellation « Top-down » se réfère à la démarche descendante suivie par cette approche à l'opposé de la démarche ascendante utilisée

dans l'approche « Bottom-up » où les effets de chaque grandeur d'entrée sont décomposés pour estimer l'incertitude. En effet, dans l'approche CMA, la fidélité d'une méthode est décomposée en une somme de composantes conformément au modèle de décomposition de la variance, permettant ainsi d'appliquer une analyse de variance. Les estimés d'incertitude sont calculés à partir des estimés de précision obtenus à l'issue d'une étude de performances inter-laboratoires. On utilise donc les résultats d'essais inter-laboratoires. Ainsi, le laboratoire est vu à partir d'un niveau élevé comme faisant partie de la population de laboratoires et par conséquent, les erreurs systématiques et aléatoires d'un laboratoire deviennent des erreurs aléatoires lorsqu'elles sont considérées à partir de ce niveau élevé. L'approche CMA est plus réaliste du fait qu'elle inclut les sources majeures d'incertitude des mesures chimiques non reprises au niveau de l'approche ISO comme les facteurs laboratoire, opérateur, équipement et temps. Comme autre avantage, les estimés d'incertitude obtenus au moyen de cette approche sont issus des mesures réelles des laboratoires et que, toute ou partie, de ces données sont souvent directement disponibles à partir des données de validation.

### **I.2.5.3. APPROCHES MIXTES**

La combinaison d'une part, des informations issues des approches intra-laboratoire et inter-laboratoires ou d'autre part, des stratégies appliquées dans les démarches ascendante et descendante pour l'estimation de l'incertitude, peut donner lieu à des approches mixtes.

#### **I.2.5.3.1. Approche de Barwick et Ellison**

Dans cette approche, trois éléments différents de validation sont combinés en vue d'évaluer l'incertitude de mesure des résultats à savoir la précision, l'exactitude et la robustesse [99, 115]. La validation est prise ici au sens large telle que définie par ICH c'est-à-dire qu'elle comprend le test de robustesse [56]. La précision est évaluée au niveau de la fidélité intermédiaire considérant différents temps. Ensuite lors du test de robustesse différentes conditions expérimentales sont appliquées pour éprouver la méthode, on considère dès lors que les variations observées équivalent à celles susceptibles d'être obtenues par différents laboratoires, par conséquent par différents opérateurs afin que la robustesse simule l'étude inter-laboratoires. De ce fait, la précision peut être aussi évaluée à un second niveau de

la fidélité intermédiaire c'est-à-dire entre opérateurs. Concernant le biais de la méthode, plusieurs possibilités sont décrites en vue d'estimer l'incertitude, à savoir l'analyse de substances de référence certifiées, l'analyse de matrices dopées et la comparaison avec une méthode de référence [99, 115].

#### **I.2.5.3.2. Approche ISO/TS**

Le guide pour l'incertitude de mesure « GUM » publié par ISO [97] constitue une approche normalisée largement adoptée. Néanmoins, son application est limitée à des situations où un modèle complet du processus de mesure est disponible. Pourtant, pour être normalisée [82] et déclarée valide [72], une méthode d'essai doit faire l'objet d'une étude collaborative qui, en appliquant les normes ISO 5725-2 [52], permet de fournir les données de performances, à savoir les estimations de la composante de la variance intra-laboratoire et inter-laboratoires accompagnées d'une estimation de l'incertitude associée à la justesse de la méthode.

C'est ainsi que l'équipe du Comité Technique ISO/TS 69 [122] a récemment élaboré des lignes directrices pour l'évaluation de l'incertitude associée aux résultats des méthodes d'essais normalisées en considérant d'une part, leurs données de performance obtenues au moyen d'une étude collaborative et d'autre part, les principes correspondants du GUM c'est-à-dire en combinant les estimations pertinentes de la variance.

Trois préalables sont requis pour mener correctement cette approche [122] :

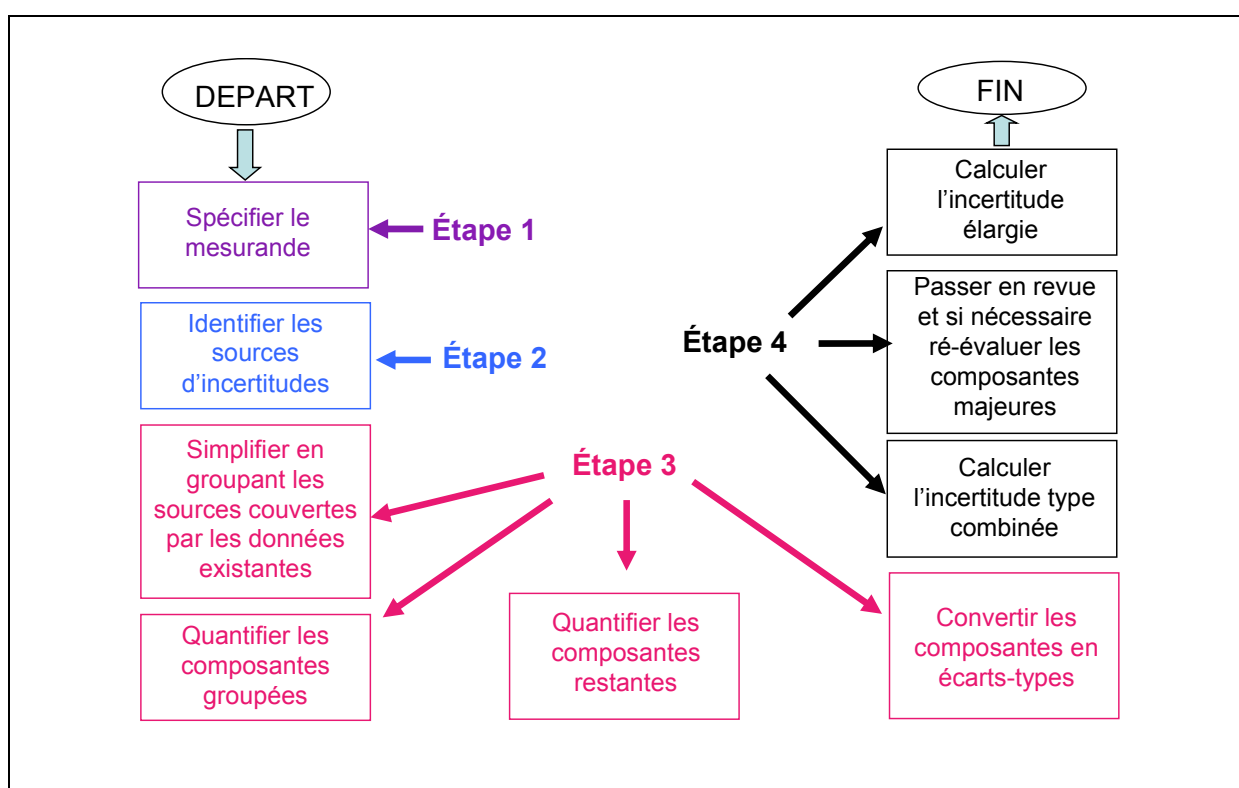
- la disponibilité des estimations obtenues au moyen d'études collaboratives selon ISO 5725-2 [52]. Ces estimations sont celles de la répétabilité, de la reproductibilité et de la justesse de la méthode d'essai utilisée.
- La confirmation par le laboratoire de la cohérence de la mise en œuvre de la méthode d'essai avec les performances définies de la méthode. Ceci se fait notamment en vérifiant le biais et la fidélité de la méthode.
- L'identification de toutes les influences sur les résultats de mesure qui ne sont pas correctement couvertes par l'étude collaborative, et par conséquent la quantification de la variance associée aux résultats qui peut découler de ces effets.

## I.2.6. QUANTIFICATION DE L'INCERTITUDE

### I.2.6.1. APPROCHE INTRA-LABORATOIRE

#### I.2.6.1.1. Approche ISO

La procédure pour quantifier l'incertitude de mesure proposée par cette approche repose sur quatre étapes fondamentales telles qu'illustrées dans la figure I.11. [91, 99].



**Figure I.11.** – *Illustration schématique du processus d'estimation de l'incertitude de la mesure analytique selon l'approche ISO*

La première étape a pour objectif de poser clairement ce qui va être mesuré (mesurande), y compris la relation entre le mesurande et les grandeurs introduites, tandis qu'à la deuxième étape, chaque source potentielle d'incertitude est identifiée. Par la suite, la troisième étape a pour objectif d'estimer la valeur de la composante de l'incertitude associée à

chaque source potentielle d'incertitude telle qu'identifiée lors de la deuxième étape. Enfin, sur la base des informations obtenues à cette troisième étape, la quatrième étape concernera l'estimation de l'incertitude type composée qui est la combinaison de toutes les incertitudes exprimées sous forme d'écart-type. La combinaison se fait selon des règles appropriées, par exemple l'addition des variances selon les algorithmes de propagation d'erreur basée sur les expansions de Taylor [91]. Finalement, le facteur d'élargissement sera appliqué pour donner l'incertitude élargie.

### **I.2.6.1.2. Approche basée sur l'évaluation de la précision**

L'évaluation de la précision en intra-laboratoire se fait habituellement au niveau de la répétabilité et/ou au niveau de la fidélité intermédiaire [103].

#### **- Evaluation de la répétabilité**

La répétabilité est définie comme étant la fidélité dans les conditions de répétabilité c'est-à-dire dans les conditions où des résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps [103, 122]. La répétabilité peut donc être évaluée en estimant l'écart-type des résultats d'essais ( $s_r$ ) obtenus sous des conditions de répétabilité et calculé comme suit :

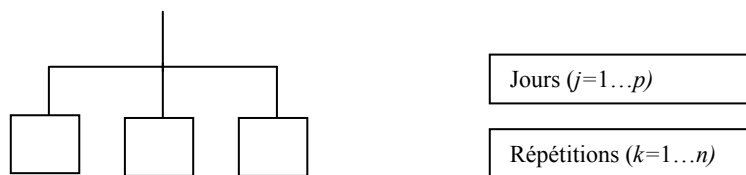
$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{I.13.})$$

avec  $x_i$  le résultat d'une mesure individuelle et  $\bar{x}$  le résultat moyen de  $n$  déterminations. Une indépendance de mesure signifie que chaque résultat d'essai est obtenu de manière à ne pas être influencé par n'importe quel autre essai précédemment effectué sur le même mesurande [103].

- Evaluation de la fidélité intermédiaire

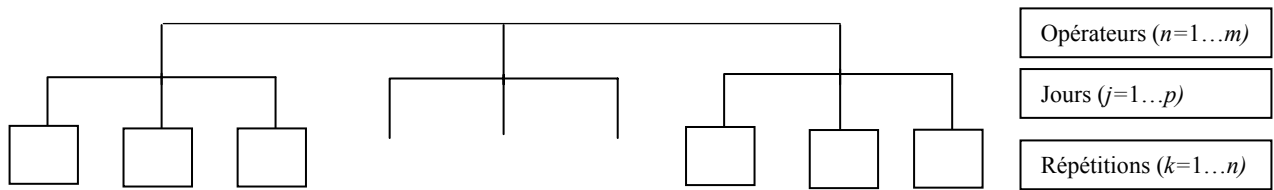
Contrairement à la répétabilité, l'évaluation de la précision au niveau de la fidélité intermédiaire est correctement estimée lorsqu'un plan expérimental est établi à cet effet. Il en est de même de l'évaluation de la reproductibilité. L'application d'un plan expérimental a pour avantage d'obtenir en même temps les estimés de la répétabilité [103]. Usuellement un plan hiérarchisé appelé « nested design » est appliqué. Ce genre de plan est complet d'où leur préférence au plan hiérarchisé incomplet appelé en anglais « staggered-nested design » [123]. En principe, la précision intermédiaire peut être évaluée à partir des études intra-laboratoire et inter-laboratoires. Dans cette dernière situation, la similarité des variances des laboratoires est préalablement vérifiée de manière à pouvoir les rassembler [124], situation qui n'est pas souvent facile à rencontrer en pratique dans le cas des études inter-laboratoires. Par conséquent, il est préférable d'aller vers l'approche intra-laboratoire qui nécessite moins de dépenses en termes d'expériences.

Pour estimer la fidélité intermédiaire jour-dépendant, il est indiqué de recourir à un plan hiérarchisé complet à deux niveaux (Figure I.12.). Dans ce cas, un seul opérateur effectue  $k$  répétitions d'essais dans chacun des  $p$  jours. Moyennant la table d'analyse des variances (ANOVA) [5, 52, 103], les carrés moyens sont calculés, ce qui permet d'estimer la variance de la répétabilité, les composantes de la variance inter-jours et par conséquent la variance de la fidélité intermédiaire jour-dépendant [103].



**Figure I.12.** – Plan expérimental pour l'évaluation de la fidélité intermédiaire dans lequel un seul opérateur effectue  $n$  répétitions d'essais en  $p$  jours d'analyse.

Lorsqu'une situation plus complexe se présente, par exemple la fidélité intermédiaire impliquant deux facteurs tels que le facteur jour ( $j = 1 \dots p$ ) et le facteur opérateur ( $i = 1 \dots m$ ), un plan hiérarchisé complet à trois niveaux (Figure I.13.) convient.



**Figure I.13.** – Plan expérimental pour l'évaluation de la fidélité intermédiaire dans lequel  $m$  opérateurs effectuent chacun  $n$  répétitions d'essais dans chacun des  $p$  jours d'analyse.

Dans cette dernière situation, les carrés moyens inter-opérateur ( $CM_{\text{Opérateur}}$ ), inter-jour ( $CM_{\text{Jour}}$ ) et inter-répétition ( $CM_{\text{Répétition}}$ ) sont estimés au moyen de la table d'ANOVA [5, 52, 103]. A partir de ces carrés moyens, les estimés suivants de la précision sont ainsi calculés :

- la variance de la répétabilité :

$$s_r^2 = CM_{\text{Répétitions}} \quad (\text{I.14.})$$

- les composantes de la variance inter-jour :

$$s_{\text{Jours}}^2 = \frac{CM_{\text{Jours}} - CM_{\text{Répétitions}}}{n} \quad (\text{I.15.})$$

- la variance de la fidélité intermédiaire inter-jour :

$$s_{I(\text{Jours})}^2 = s_{\text{Jours}}^2 + s_r^2 \quad (\text{I.16.})$$

- les composantes de la variance inter-opérateur :

$$s_O^2 = \frac{CM_{\text{Opérateurs}} - CM_{\text{Répétitions}}}{np} \quad (\text{I.17.})$$

- la variance de la fidélité intermédiaire inter-opérateur :

$$s_{I(O)}^2 = s_{Opérateurs}^2 + s_r^2 \quad (\text{I.18.})$$

- la variance de la fidélité intermédiaire inter-(opérateur + jour) (O + J) :

$$s_{I(O+J)}^2 = s_{Opérateurs}^2 + s_{Jours}^2 + s_r^2 \quad (\text{I.19.})$$

Il se pourrait que lors des calculs, des valeurs négatives des composantes de la variance puissent être obtenues. En pratique, elles sont fixées à 0.

Dans le même ordre d'idée, d'autres facteurs tels que les facteurs équipements peuvent être ajoutés au modèle en vue d'obtenir d'autres estimés de la fidélité intermédiaire.

Très souvent il arrive que le nombre d'opérateurs soit insuffisant, ce qui pourrait entraîner une valeur faible de  $s^2_0$ . Dans de telles situations, il serait avantageux d'évaluer la composante de la variance combinée (temps + opérateur) plutôt que les composantes individuelles. Quelques exemples de cette évaluation peuvent être trouvés dans la littérature [125].

### **I.2.6.1.3. Approche basée sur les données de validation**

En considérant la nouvelle stratégie de la validation basée sur le profil d'exactitude, les données issues de la validation peuvent servir pour l'estimation de l'incertitude de mesure [1]. L'incertitude est dérivée à partir de la variance utilisée pour construire les limites de l'intervalle de tolérance  $\beta$  des mesures attendues et est calculée comme suit :

$$\sigma_{Tol}^2 = \left[ \sqrt{1 + \frac{1}{pnB^2}} \hat{\sigma}_M \right]^2 \quad (\text{I.20.})$$

avec  $B = \sqrt{\frac{A+1}{nA+1}}$ ,  $A = \frac{\hat{\sigma}_B^2}{\hat{\sigma}_W^2}$ .



Le terme  $\hat{\sigma}_M^2$  est la variance totale estimée ou la fidélité intermédiaire,  $\sigma_B^2$  la variance inter-série et  $\sigma_W^2$  la variance intra-série,  $n$  le nombre de répétitions et  $p$  le nombre de séries. Feinberg et coll. [1] ont démontré que  $\sigma_{Tot}^2$  est égal à l'incertitude des mesures.

Une série représente les conditions dans lesquelles les répétitions des essais sont effectuées. Dans un sens large, les « conditions » sont définies pour indiquer les conditions expérimentales standardisées ou le plan d'exécution pour réaliser les essais en répétitions. Elles dépendent du plan expérimental et de l'intention de l'étude envisagée ou, si une validation est concernée, des étapes de celle-ci. Dans cette dernière situation, les conditions (séries) peuvent être des jours, par conséquent l'analyse des composantes des variances permettra d'estimer les variances inter-jour et intra-jour, et plus particulièrement la variance de la fidélité intermédiaire. Par contre, dans le cas où les conditions sont des laboratoires, la variance de la reproductibilité sera aussi estimée. Dans ce même contexte, les conditions peuvent s'étendre vers les lots d'échantillon, les équipements. Il est important de mentionner que ces variances ne peuvent être obtenues que lorsque les conditions sont variées, c'est-à-dire que les mesures des essais sont faites en variant au moins une des conditions (par exemple plusieurs laboratoires, plusieurs jours, ou plusieurs opérateurs).

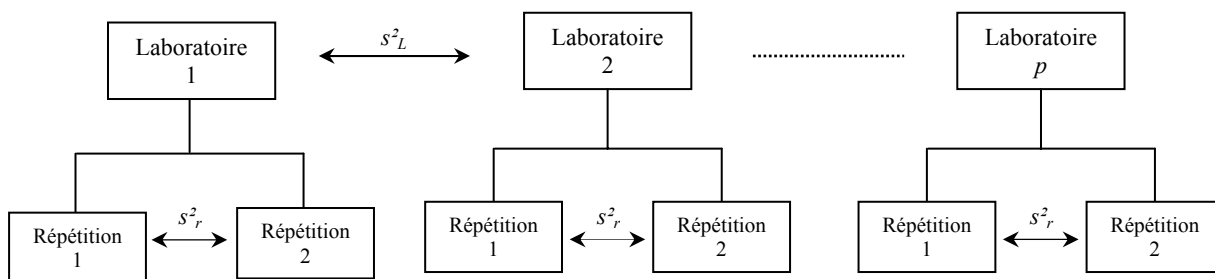
#### **I.2.6.1.4. Approche basée sur les données de robustesse**

Puisque le test de robustesse peut être utilisé pour simuler de manière exagérée les modifications susceptibles de survenir lors d'un transfert d'une méthode vers d'autres laboratoires, d'autres instruments et/ou d'autres opérateurs, et que chaque expérience du plan peut être considérée comme étant un laboratoire individuel, il est dès lors possible d'évaluer l'incertitude en se servant des données du test de robustesse [64, 65] et en utilisant un plan expérimental similaire à celui utilisé pour l'étude inter-laboratoires. Le guide ISO 5725-2 [52] destinés aux études inter-laboratoires peut être adapté pour estimer l'incertitude dans le test de robustesse. En assimilant chaque « expérience » du plan à des « laboratoires » et au moyen de la table d'ANOVA [5, 52, 103], les carrés moyens inter-expérience ( $CM_{Expérience}$ ) et inter-répétition ( $CM_{Répétition}$ ) peuvent être calculés, ce qui permet par la suite d'obtenir différents estimés de la variance, notamment la variance intra-expérience calculée à partir de la répétabilité et la variance inter-expériences équivalent à la variance inter-laboratoires. Ainsi

l'incertitude de la reproductibilité est calculée de la même façon que dans l'approche inter-laboratoires.

### **I.2.6.2. APPROCHE INTER-LABORATOIRES**

L'étude inter-laboratoires demeure le moyen classique pour examiner la reproductibilité des résultats. Les essais sont effectués selon un plan expérimental similaire à celui appliqué pour évaluer la fidélité intermédiaire (Figure I.14.) :



**Figure I.14.** – Plan expérimental pour une étude inter-laboratoires classique en vue de l'évaluation de la reproductibilité et de l'incertitude d'un échantillon (à un niveau de concentration). Les essais sont effectués en deux répétitions dans les conditions de répétabilité par p laboratoires différents

En utilisant la table d'ANOVA, les estimés de la variance de la répétabilité ( $s_r^2$ ) et de la de variance inter-laboratoires ( $s_L^2$ ), qui sont respectivement  $\sigma_r^2$  et  $\sigma_L^2$ , sont calculés. La combinaison des deux variances donne la variance de la reproductibilité ( $s_R^2$ ) :

$$s_R^2 = s_r^2 + s_L^2 \quad (\text{I.21.})$$

L'incertitude d'un résultat individuel peut donc être calculée comme suit :

$$u_x = \sqrt{s_r^2 + s_L^2} \quad (\text{I.22.})$$

Lorsque  $n$  mesures de répétitions sont effectuées, l'incertitude de la moyenne est calculée comme suit :

$$u_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{s_r^2}{n} + s_L^2} \quad (\text{I.23.})$$

Et si  $p$  laboratoires effectuent  $n$  mesures de répétitions, l'incertitude standard de la moyenne est calculée comme suit :

$$u_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{s_r^2}{pn} + \frac{s_L^2}{p}} \quad (\text{I.24.})$$

Le plan expérimental pourrait aussi être adapté selon l'étude envisagée, par exemple lorsqu'on voudrait évaluer l'effet du facteur jour dans une étude inter-laboratoires.

### **I.2.6.3. APPROCHES MIXTES**

#### **I.2.6.3.1. Approche proposée par Barwick et Ellison**

Cette approche tient compte de trois éléments différents de la validation, à savoir la précision, la justesse et la robustesse. L'exemple illustré par Hund et coll., [115] montre que l'incertitude  $u(x)$  d'un résultat  $x$  est la combinaison de ces trois éléments selon une approche comparable du budget d'erreur exprimée par l'équation suivante :

$$\frac{u(x)}{x} = \sqrt{\left(\frac{u(\bar{R}_m)}{\bar{R}_m}\right)^2 + \left(\frac{s_{I(x)}}{\bar{x}}\right)^2 + \left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(q)}{q}\right)^2 + \left(\frac{u(r)}{r}\right)^2 + \dots} \quad (\text{I.25.})$$

où  $\left(\frac{u(\bar{R}_m)}{\bar{R}_m}\right)^2$  est la contribution de la composante justesse à l'incertitude de la mesure et qui dans le cas présent est évaluée en terme d'incertitude du rendement moyen de la méthode,

$\left(\frac{s_{I(T)}}{\bar{x}}\right)^2$  la contribution de la composante de précision à l'incertitude de la mesure,

évaluée en terme de fidélité intermédiaire dépendant du temps,

$\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2$ ,  $\left(\frac{u(q)}{q}\right)^2$  et  $\left(\frac{u(r)}{r}\right)^2$  la contribution de la robustesse évaluée en termes

d'estimés d'incertitude des différents facteurs  $p$ ,  $q$  et  $r$  de la robustesse.

### **I.2.6.3.2. Approche proposée par ISO/TS [122]**

La procédure proposée comporte 5 étapes (cf. partie 1.2.5.3.2.), à savoir :

- a) obtenir des estimations de la répétabilité, de la reproductibilité et de la justesse de la méthode utilisée, à partir des informations publiées sur cette méthode ;
- b) déterminer si le biais de laboratoire relatif aux mesures se situe dans les limites de celui attendu selon les informations obtenues au point a ;
- c) déterminer si la fidélité obtenue par des mesures actuelles se situe dans les limites de celle attendue selon les estimations de répétabilité et de reproductibilité obtenues au point a ;
- d) identifier toute influence sur la mesure qui n'a pas été couverte de manière adéquate dans les études dont il est fait référence au point a et quantifier la variance qui pourrait découler de ces effets, en tenant compte des coefficients de sensibilité et des incertitudes dans les grandeurs d'influence ;
- e) lorsque le biais et la fidélité sont sous contrôle comme démontré aux étapes du point b et c, combiner l'estimation de la reproductibilité au point a avec l'incertitude associée à la justesse donnée aux points a et b, et les effets d'influences supplémentaires du point d pour former une estimation de l'incertitude composée.

L'équation fondamentale qui présente le modèle statistique se rapportant à cette évaluation de l'incertitude  $u(y)$  associée à une observation peut être écrite comme suit :

$$u^2(y) = u^2(\hat{\delta}) + s_L^2 + \sum c_i^2 u^2(x_i) + s_r^2 \quad (\text{I.26.})$$

où  $s_L^2$  est la variance estimée de la composante laboratoire du biais ;  
 $s_r^2$  est la variance estimée de la répétabilité ou l'erreur résiduelle ;  
 $u(\hat{\delta})$  est l'incertitude associée à  $\delta$ , due à l'incertitude de l'estimation de  $\delta$  en mesurant un étalon de mesure de référence ou un matériau de référence de valeur certifiée  $\hat{\mu}$ ,  $\delta$  étant le terme représentant le biais intrinsèque de la méthode de mesure utilisée ;  
 $u(x_i)$  est l'incertitude associée à  $x_i$  qui est l'écart par rapport à la valeur nominale de  $x_i$  ;  
 $c_i$  le coefficient de sensibilité, égale à  $\delta y / \delta x_i$ .

Puisque dans une étude inter-laboratoires, l'écart-type de la reproductibilité ( $s_R$ ) est exprimé par  $s_R^2 = s_L^2 + s_r^2$ ,  $s_R^2$  peut remplacer  $s_L^2 + s_r^2$ . Ainsi l'équation I.26. devient :

$$u^2(y) = u^2(\hat{\delta}) + s_R^2 + \sum c_i^2 u^2(x_i) \quad (\text{I.27.})$$