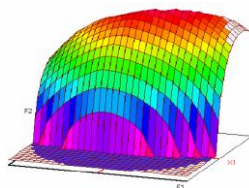


Année Universitaire : 2015-2016



**Master Sciences et Techniques CAC Agiq**

**Chimiométrie et Analyse Chimique : Application à la gestion industrielle  
de la qualité**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

**Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques**

**Validation et estimation de l'incertitude de la méthode  
LERKE et BELL de dosage de l'histamine par une  
nouvelle approche statistique basée sur le concept  
d'erreur totale**

**Présenté par:**

**EL MOUNTASSIR Hassan**

**Encadré par:**

**- Pr. BOULAHNA Ahmed                      FST Fès**

**- Mr. CHAIRA Jamal                              CSVTPM INRH AGADIR**

**Soutenu le 13 Juin 2016 devant le jury composé de:**

**- Pr. T. SAFFAJ                                      FST Fès**

**- Pr. Y.KANDRI RODI                              FST Fès**

**- Pr. A.BOULAHNA                                  FST Fès**

**Stage effectué au : Centre spécialisé de valorisation et technologie des produits  
de la mer INRH Agadir**



## *Dédicaces*

*Par la grâce d'ALLAH le tout puissant, le clément, le  
Miséricordieux et son prophète MOUHAMED (PSL) paix  
sur lui,*

*Je dédie ce travail:*

*A ceux qui ont consacré leur vie pour que nous soyons  
heureux: nos chers parents.*

*A ceux qui ne cessent de nous encourager pour arriver à ce  
niveau: nos familles.*

*A ceux qui ne cessent de nous orienter et de nous encourager  
tout le temps: nos professeurs.*

*A ceux qui nous sont toujours fidèles: nos chers(ères) amis (es).*

## Remerciements

De cette occasion Je tiens à remercier et exprimer ma gratitude respectueuse à :  
**Mr. CHAIRA JAMAL**, Ingénieur et responsable du Laboratoire de chimie biochimie du CSVTPM pour m'avoir encadré tout au long du projet, pour sa disponibilité, pour ses conseils précieux, pour la confiance qu'il m'a témoigné, pour son aide et de son savoir-faire qui m'a donné la possibilité de mieux réaliser ce Mémoire.

Un remerciement particulier à **Mr. A. BOULAHNA** professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès pour son encadrement et son aide durant ce travail.  
Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements aux membres de jury de m'avoir honoré en acceptant de juger ce travail.

Mes remerciements vont également :

À **Mr. M. EL HADRAMI** Responsable du Master CAC Agiq.

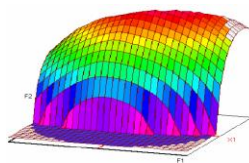
À Tous nos enseignants du département de chimie particulièrement à **Mr. B. IHSSANE** et **Mr. T. SAFFAJ** pour leurs efforts et leur soutien amical et pour nous avoir donné les bases et connaissances nécessaires à la réalisation de ce travail.

Au Chef de la SVTPM **Mme. NAIMA** et son responsable des ressources humaines **Mme HALIMA**, pour nous avoir accordé ce stage qui nous a permis de réaliser ce travail.

À l'ensemble du personnel du CVTPM, particulièrement à **Mr A. AKSBI** et **Mr. S. HANOUNE**, Techniciens Spécialisés au CSVTPM/INRH ... pour l'accueil et l'environnement de travail que vous avez su créer.

And last but not least, Je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de Mon travail.

*Merci infiniment...*



Master ST CAC Agiq

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et prénom: EL MOUNTASSIR Hassan

Année Universitaire : 2015/2016

Titre:

# Validation et l'estimation de l'incertitude de la méthode LERKE et BELL de dosage de l'histamine par une nouvelle approche statistique basée sur le concept d'erreur totale

## Résumé

Dans ce travail, nous proposons à une nouvelle validation analytique (basée sur le concept de l'erreur totale) appliquée à une méthode alternative simple, fiable et moins coûteuse qui se fonde sur une détection fluorimétrique de l'élément à doser à savoir l'histamine en formant en milieu alcalin un dérivé fluorescent entre l'histamine de l'échantillon à analyser et l'orthophthalaldéhyde.

La représentation graphique suivant la méthode du « profil d'exactitude » aide à visualiser les performances de la méthode. La méthode des ajouts dosés permet de vérifier la non spécificité de la méthode, d'établir le pourcentage de recouvrement, et de calculer les intervalles de tolérance à une attente de 95% des résultats futurs soient inclus dans les limites d'acceptabilités de  $\pm 15\%$  dans l'intervalle de concentration entre 5 et 20 ppm.

Au cours du processus de validation, on a pris comme décision de corriger les données en les multipliant par un facteur égal à 1,2. Cette opération doit maintenant faire partie de la méthode et être intégrée au mode opératoire standardisé qui servira en routine.

Les résultats obtenus montrent que la méthode de LERK et BELL est validée dans un intervalle de concentration de 6,326 à 20 mg/l. Par ailleurs, l'incertitude de mesure a été également estimée à chaque niveau de concentration. Les valeurs trouvées montrent l'exactitude et la fiabilité de la méthode.

**Mots clés:** histamine, fluorescence, validation analytique, poissons, Incertitude de mesure,  $\beta$ -expectation tolérance intervalle.



## *Liste des abréviations*

|                                                                                             |                                                                            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>AFNOR:</b> Association française de normalisation                                        | <b>INRH:</b> Institut Nationale des recherches halieutiques                |
| <b>AOAC:</b> Association of official Analytical chemists                                    |                                                                            |
| <b>AW:</b> Activity Water                                                                   | <b>ISPM:</b> Institue Spécialisé de la Pêche Maritime                      |
| <b>CCM:</b> Chromatographie sur Couches Minces                                              | <b>ISO/IEC:</b> international standard organisation                        |
| <b>CPG:</b> Chromatographie en phase gazeuse                                                | <b>IUPAC:</b> International Union of Pure and Applied Chemistry            |
| <b>CSVTPM:</b> centre spécialisé de valorisation et des technologies des produits de la mer | <b>JICA:</b> Agence Japonaise de Coopération Internationale                |
| <b>DLC:</b> Date Limite de Consommation                                                     | <b>LD:</b> Limite de détection                                             |
| <b>DPM:</b> Département de la Pêche Marocaine                                               | <b>LQ:</b> Limite de quantification                                        |
| <b>EMA:</b> European Medicines Agency                                                       | <b>ONP:</b> Office National de la Pêche                                    |
| <b>FAO:</b> Food and Agriculture Organization                                               | <b>PA:</b> Principe Actif                                                  |
| <b>FC:</b> Facteur de Correction                                                            | <b>PE :</b> Plan d'étalonnage                                              |
| <b>FDA:</b> Food and Drug Administration                                                    | <b>pH :</b> Potentiel d'hydrogène                                          |
| <b>FENIP:</b> Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la mer                  | <b>PV :</b> Plan de Validation                                             |
| <b>HPLC:</b> chromatographie liquide à haute performance                                    | <b>Pr :</b> Probabilité                                                    |
| <b>H.R:</b> Humidité Relative                                                               | <b>SFSTP :</b> Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutique |
| <b>ICH:</b> International Conférence on Harmonisation                                       | <b>TA :</b> Tampon Acétate                                                 |
| <b>IFREMER:</b> Institue Français de Recherche pour l'Exploitation de la mer                | <b>TCA :</b> Acide trichloroacétique                                       |



# Sommaire

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCTION GENERALE.....                              | 1  |
| PARTIE 1 : PRESENTATION DU CSVTPM (LIEU DE STAGE) ..... | 2  |
| I. MISSIONS ASSIGNEES .....                             | 3  |
| II. OBJECTIF DE LA RECHERCHE ET VALORISATION .....      | 4  |
| III. STRUCTURES DE L'INRH .....                         | 4  |
| III.1 NIVEAU CENTRAL .....                              | 5  |
| III.2 NIVEAU REGIONAL .....                             | 5  |
| IV. GESTION DU CSVTPM .....                             | 6  |
| IV.1 COMITE DE DIRECTION .....                          | 6  |
| IV.2 COMITE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE .....             | 6  |
| IV.3 COMITE CONJOINT DE COORDINATION.....               | 6  |
| IV.4 COMITE MIXTE DE COORDINATION INRH/JICA.....        | 6  |
| V. ORGANISATION DU CSVTPM.....                          | 6  |
| V.1 POLE D'INGENIEUR.....                               | 6  |
| V.2 POLE RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT .....               | 7  |
| V.3 POLE CONTROLE DE LA QUALITE.....                    | 7  |
| VI. COOPERATION DE CSVTPM.....                          | 9  |
| VI.1 SUR LE PLAN NATIONAL .....                         | 9  |
| VI.2 SUR LE PLAN INTERNATIONAL.....                     | 9  |
| PARTIE 2 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....                | 10 |
| I. HISTAMINE.....                                       | 11 |
| I.1 LA GENESE DE L'HISTAMINE DANS LES POISSONS .....    | 11 |
| I.2 LES EFFETS DE L'HISTAMINE .....                     | 12 |
| I.3 LES FACTEURS DE DEVELOPPEMENT DES BACTERIES .....   | 13 |
| I.3.1 LA TEMPERATURE.....                               | 13 |



|                                                                                                  |                                                                                        |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| I.3.2                                                                                            | L'HUMIDITE RELATIVE .....                                                              | 13        |
| I.3.3                                                                                            | L'ACTIVITE DE L'EAU .....                                                              | 13        |
| I.3.4                                                                                            | LE POTENTIEL D'HYDROGENE (pH) .....                                                    | 13        |
| <b>I.4</b>                                                                                       | <b>ASPECTS REGLEMENTAIRES ET NORMATIFS.....</b>                                        | <b>13</b> |
| I.4.1                                                                                            | METHODES DE DOSAGE.....                                                                | 13        |
| I.4.2                                                                                            | METHODES D'INTERPRETATION .....                                                        | 14        |
| <b>II.</b>                                                                                       | <b>PROBLEMATIQUE .....</b>                                                             | <b>15</b> |
| <b>III.</b>                                                                                      | <b>LA VALIDATION ANALYTIQUE.....</b>                                                   | <b>16</b> |
| <b>III.1</b>                                                                                     | <b>DEFINITIONS.....</b>                                                                | <b>16</b> |
| <b>III.2</b>                                                                                     | <b>OBJECTIF DE LA VALIDATION ANALYTIQUE .....</b>                                      | <b>16</b> |
| <b>III.3</b>                                                                                     | <b>TEXTES DE REFERENCES POUR LA VALIDATION ANALYTIQUE .....</b>                        | <b>17</b> |
| <b>III.4</b>                                                                                     | <b>CRITERES DE VALIDATION .....</b>                                                    | <b>17</b> |
| III.4.1                                                                                          | SPECIFICITE .....                                                                      | 18        |
| III.4.2                                                                                          | LINEARITE .....                                                                        | 19        |
| III.4.3                                                                                          | EXACTITUDE .....                                                                       | 19        |
| III.4.4                                                                                          | FIDELITE .....                                                                         | 19        |
| III.4.5                                                                                          | LIMITE DE QUANTIFICATION .....                                                         | 20        |
| III.4.6                                                                                          | INTERVALLE DE DOSAGE.....                                                              | 20        |
| III.4.7                                                                                          | FONCTION DE REPONSE .....                                                              | 20        |
| <b>IV.</b>                                                                                       | <b>PRINCIPE DE LA METHODE DU PROFIL D'EXACTITUDE .....</b>                             | <b>20</b> |
| <b>IV.1</b>                                                                                      | <b>GENERALITEE.....</b>                                                                | <b>20</b> |
| <b>IV.2</b>                                                                                      | <b>DOMAINE D'APPLICATION.....</b>                                                      | <b>22</b> |
| <b>IV.3</b>                                                                                      | <b>ETAPE DE LA VALIDATION ANALYTIQUE BASEE SUR LE CONCEPT DE L'ERREUR TOTALE .....</b> | <b>24</b> |
| <b>IV.4</b>                                                                                      | <b>AVANTAGES DE L'APPROCHE DE L'ERREUR TOTALE .....</b>                                | <b>24</b> |
| <b>IV.5</b>                                                                                      | <b>PLANS D'EXPERIENCES .....</b>                                                       | <b>25</b> |
| <b>IV.6</b>                                                                                      | <b>CALCULER LES CRITERES DE VALIDATION .....</b>                                       | <b>25</b> |
| IV.6.1                                                                                           | ANALYSE DE LA FONCTION DE REPONSE ET PREDICTION INVERSE : .....                        | 25        |
| IV.6.2                                                                                           | CALCUL DE LA JUSTESSE ET DE LA FIDELITE .....                                          | 26        |
| IV.6.3                                                                                           | CALCUL DES INTERVALLES DE TOLERANCE .....                                              | 28        |
| IV.6.4                                                                                           | CONSTRUCTION DU PROFIL D'EXACTITUDE ET DECISION .....                                  | 29        |
| IV.6.5                                                                                           | CALCUL DE LA LIMITE DE QUANTIFICATION .....                                            | 30        |
| <b>IV.7</b>                                                                                      | <b>ESTIMATION DE L'INCERTITUDE DE MESURE.....</b>                                      | <b>31</b> |
| IV.7.1                                                                                           | CONCEPT D'INCERTITUDE .....                                                            | 31        |
| IV.7.2                                                                                           | INCERTITUDE ET ERREUR : .....                                                          | 31        |
| IV.7.3                                                                                           | CALCUL D'INCERTITUDE : .....                                                           | 32        |
| <b>PARTIE III : VALIDATION DE LA METHODE DE DOSAGE D'HISTAMINE PAR PROFIL D'EXACTITUDE .....</b> | <b>33</b>                                                                              |           |
| <b>I.</b>                                                                                        | <b>MATERIELS ET METHODE .....</b>                                                      | <b>34</b> |
| <b>I.1</b>                                                                                       | <b>METHODE DE LERKE ET BELL.....</b>                                                   | <b>34</b> |



|       |                                                 |    |
|-------|-------------------------------------------------|----|
| I.1.1 | OBJET DE DOMAINE D'APPLICATION .....            | 34 |
| I.1.2 | PRINCIPE .....                                  | 34 |
| I.1.3 | REACTIFS ET LEURS PREPARATION.....              | 34 |
| I.2   | MATERIELS DU LABORATOIRE .....                  | 35 |
| I.3   | MODE OPERATOIRE .....                           | 37 |
| I.4   | EXPRESSION DES RESULTATS .....                  | 37 |
| II.   | VALIDATION AU MOYEN DU PROFIL D'EXACTITUDE..... | 38 |
| II.1  | PREVALIDATION .....                             | 38 |
| II.2  | PLAN D'EXPERIENCES .....                        | 39 |
| II.3  | FONCTION DE REPONSE .....                       | 41 |
| II.4  | PREDICTION INVERSE.....                         | 44 |
| II.5  | CALCUL DE LA JUSTESSE .....                     | 45 |
| II.6  | CALCUL DE LA FIDELITE .....                     | 45 |
| II.7  | CALCUL DES INTERVALLES DE TOLERANCE.....        | 46 |
| II.8  | CALCUL DE LA LIMITE DE QUANTIFICATION.....      | 47 |
| III.  | ESTIMATION DE L'INCERTITUDE .....               | 48 |
|       | CONCLUSION GENERALE.....                        | 50 |
|       | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....               | 51 |
|       | ANNEXE N°1.....                                 | 52 |

# Liste des figures

|                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1 :</b> Centre spécialisé de valorisation et des technologies des produits de la mer (CSVTPM) .....                                                                                                  | 3  |
| <b>Figure 2 :</b> Représentation de L'INRH au Maroc .....                                                                                                                                                      | 4  |
| <b>Figure 4 :</b> Organisation de l'INRH au niveau régional .....                                                                                                                                              | 5  |
| <b>Figure 3 :</b> Organisation de l'INRH au niveau central.....                                                                                                                                                | 5  |
| <b>Figure 5 :</b> Unité pilote de valorisation .....                                                                                                                                                           | 6  |
| <b>Figure 6 :</b> Laboratoire de chimie-biochimie alimentaire .....                                                                                                                                            | 7  |
| <b>Figure 7 :</b> Laboratoire de biotechnologie marin .....                                                                                                                                                    | 8  |
| <b>Figure 8:</b> Mécanisme intime de la formation de l'histamine .....                                                                                                                                         | 11 |
| <b>Figure 9 :</b> Illustration du profil d'exactitude comme outil de décision. ....                                                                                                                            | 21 |
| <b>Figure 10 :</b> Domaine de linéarité .....                                                                                                                                                                  | 22 |
| <b>Figure 11 :</b> Exemple de profil d'exactitude construit avec 3 niveaux de concentration (0,4 ; 2 et 4 mg/L) qui délimitent le domaine de validation (ou d'application) de la méthode à valider .....       | 29 |
| <b>Figure 12 :</b> Calcul de la limite de quantification par interpolation [14].....                                                                                                                           | 30 |
| <b>Figure 13 :</b> pH Mètre (HM – 20 J).....                                                                                                                                                                   | 36 |
| <b>Figure 14 :</b> Colonnes d'échangeuses d'ions.....                                                                                                                                                          | 36 |
| <b>Figure 15 :</b> Spectrofluorimètre RF-5301PC SHIMADZU.....                                                                                                                                                  | 36 |
| <b>Figure 16 :</b> données d'étalonnage et validation reportées sur le même graphique.....                                                                                                                     | 39 |
| <b>Figure 17 :</b> Profil d'exactitude de la méthode de dosage d'histamine dans la chair de poisson, obtenu par un modèle linéaire sans correction à $\beta=95\%$ $\lambda=\pm 15\%$ . ....                    | 42 |
| <b>Figure 18 :</b> Droite de régression entre les concentrations introduites et les concentrations en retour pour le modèle retenu (Linéaire Simple). ....                                                     | 43 |
| <b>Figure 19 :</b> Profil d'exactitude obtenu par un modèle linéaire réalisé avec les données corrigées à partir des valeurs relatives par niveau ( $\beta=95\%$ $\lambda=\pm 15\%$ ). ....                    | 43 |
| <b>Figure 20 :</b> Profil d'exactitude établi après l'introduction du facteur de correction sur les résultats de mesures, avec un intervalle de tolérance à 95 % et un intervalle d'acceptabilité à 15 %. .... | 47 |
| <b>Figure 21 :</b> Profil d'incertitude illustrant l'incertitude élargie de la méthode en fonction de la concentration.....                                                                                    | 49 |

# Liste des tableaux

|                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tableau 1 :</b> Bactéries incriminées dans la formation d’histamine [3] .....                                                                   | 12 |
| <b>Tableau 2 :</b> Les critères à évaluer en fonction du type de procédure analytique à valider .....                                              | 18 |
| <b>Tableau 3 :</b> Les différents modèles sélectionné .....                                                                                        | 25 |
| <b>Tableau 4 :</b> Les fonctions inverses des fonctions de réponse choisies.....                                                                   | 26 |
| <b>Tableau 5 :</b> Instructions de préparation des réactifs chimiques pour le dosage de l’histamine .....                                          | 34 |
| <b>Tableau 6 :</b> Matériel du laboratoire .....                                                                                                   | 36 |
| <b>Tableau 7 :</b> Coefficients de détermination de deux intervalles de linéarité .....                                                            | 38 |
| <b>Tableau 9 :</b> Standard d’étalonnage .....                                                                                                     | 40 |
| <b>Tableau 10 :</b> Standard de validation .....                                                                                                   | 40 |
| <b>Tableau 11 :</b> Résultats statistiques des modèles générés .....                                                                               | 41 |
| <b>Tableau 12 :</b> Valeurs de la pente et du facteur de correction FC. ....                                                                       | 43 |
| <b>Tableau 13 :</b> Concentrations prédites ou calculé, en utilisant le modèle linéaire ,sans et avec l’introduction du facteur de correction..... | 44 |
| <b>Tableau 14 :</b> Critères de la justesse .....                                                                                                  | 45 |
| <b>Tableau 15 :</b> Tableau récapitulatif des critères de fidélité pour les quatre niveaux de concentration.....                                   | 45 |
| <b>Tableau 16 :</b> Récapitulatif des critères d’exactitude pour les quatre niveaux de concentration .....                                         | 46 |
| <b>Tableau 17 :</b> Indices en ppm de la droite d’intervalle de tolérance et limite d’acceptation par niveau .....                                 | 47 |
| <b>Tableau 18 :</b> Droite d’intervalle de tolérance et de limite d’acceptation .....                                                              | 48 |
| <b>Tableau 19 :</b> Calcul de l’incertitude type et de l’incertitude élargie pour chaque niveau de concentration .....                             | 48 |

## Introduction générale

L'histamine à très faible dose joue un rôle de régulation important dans le système immunitaire de l'organisme. A teneur relativement élevée, cette substance est très toxique. Elle est à l'origine de certaines allergies (allergies à effets immédiats) qui provoquent chez l'homme des troubles respiratoires, des démangeaisons, des troubles de la vigilance, des crampes, des vomissements et de la diarrhée.

Trouver une nouvelle méthode efficace qui permettra de donner une réponse à toutes les insuffisances observées dans les méthodes actuelles (instabilité, interférences, longue durée et coût très élevé) de dosage de l'histamine dans les produits alimentaires (produits halieutiques et dérivés, fromages, etc.) présente un enjeu sanitaire et économique très important. D'où la nécessité de valider la méthode de dosage de ce composé chimique.

C'est dans ce cadre que s'inscrivent les travaux d'expériences présentées dans cette étude. Pour ce faire, nous avons, en un premier temps, donné une simple présentation de lieu de notre stage(CSVPM), en suite quelques connaissances bibliographiques concernant la production d'histamine, sa genèse et ces effets, tout en mettant l'accent sur les normes et les méthodes de son dosage.

La deuxième partie de ce travail concerne une étude bibliographique qui portera sur la méthodologie de la validation analytique basé sur la notion de l'erreur totale. En suite une généralité sur la méthode de dosage de l'histamine et le matériel utilisé.

La partie expérimentale a pour objet l'étude de la prévalidation de la méthode pour mettre en évidence les conditions de travail à savoir le domaine de linéarité, la nature de la matrice et la spécificité de la méthode. Puis, nous élaborons les plans d'étalonnage et de validation sur lesquelles en se basant pour choisir le modèle d'étalonnage adéquat après la génération de plusieurs modèles, et en fin pour pouvoir calculer les différentes critères de validation et de déterminer le domaine de validité de la méthode, aussi l'incertitude de mesure a été également estimée à chaque niveau de concentration.

## **PARTIE 1 : PRESENTATION DU CSVTPM (LIEU DE STAGE)**

## Introduction

Le centre spécialisé de valorisation et des technologies des produits de la mer (CSVTPM), construit et équipé grâce à la coopération Maroc japonaise a pour mission de mener des études et recherches dans le domaine de transformation et valorisation des produits de la mer.

Ce Centre a été inauguré par Sa **Majesté le Roi Mohammed VI**, que Dieu l'Assiste, le 23 février 2004.



**Figure 1 : Centre spécialisé de valorisation et des technologies des produits de la mer (CSVTPM)**

## I. Missions assignées

- Contribution à l'augmentation de la valeur ajoutée des produits halieutiques.
- Contribution à l'amélioration de la gestion de la qualité et de l'hygiène.
- Amélioration des systèmes d'analyses des produits de la mer.
- Optimisation des activités de l'industrie de transformation.
- Appui à la profession et aux investisseurs.
- Veille et anticipation sur les innovations technologiques.
- Développement des technologies de transformation et élaboration de produits diversifiés.
- Amélioration de la gestion de la qualité et des systèmes d'analyses.
- Veilles et anticipation sur les innovations technologiques.

## II. Objectif de la recherche et valorisation

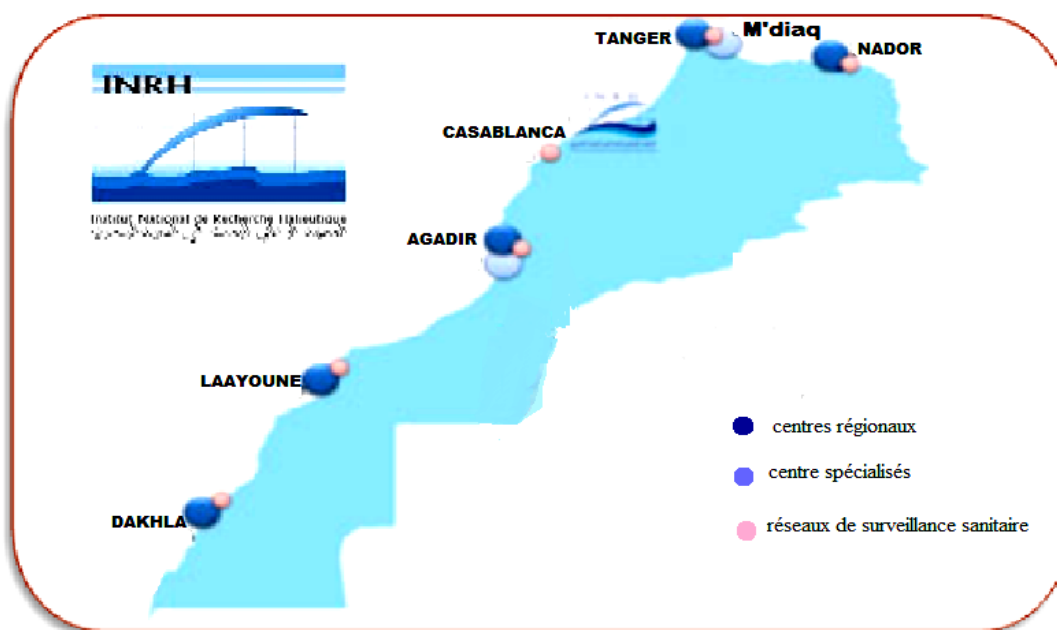
La valorisation des produits de la mer est un atout majeur pour avenir meilleur conciliant la qualité requise des produits finis et l'exploitation rationnelle des ressources.

Les objectifs de la recherche en matière de valorisation visent à :

- Entreprendre des travaux pour valoriser les espèces qui peuvent générer une plus value.
- Répondre aux priorités des industriels dans le domaine de développement de nouveaux produits et d'extraction des molécules a haute valeur ajoutée.
- Contribuer à la valorisation des produits qui suscitent l'intérêt des opérateurs dans des secteurs porteurs tel que la chimie fine, l'industrie pharmaceutique et biomédicale.
- Les recherches de formulation, de nouveaux produits peuvent être accompagnées par :
  - Des études de faisabilité technico-commerciale.
  - Des études de la réglementation et de la définition des normes [1].

## III. Structures de l'INRH

L'INRH dispose actuellement d'une entité centrale à Casablanca et de cinq centres régionaux, deux centre spécialisés (à Agadir et M'diaq) implantés au cœur des régions productrices des ressources halieutiques du Royaume. En outre, il est également doté de 6 réseaux de surveillance sanitaire [1].



**Figure 2 : Représentation de L'INRH au Maroc**

### III.1 Niveau central

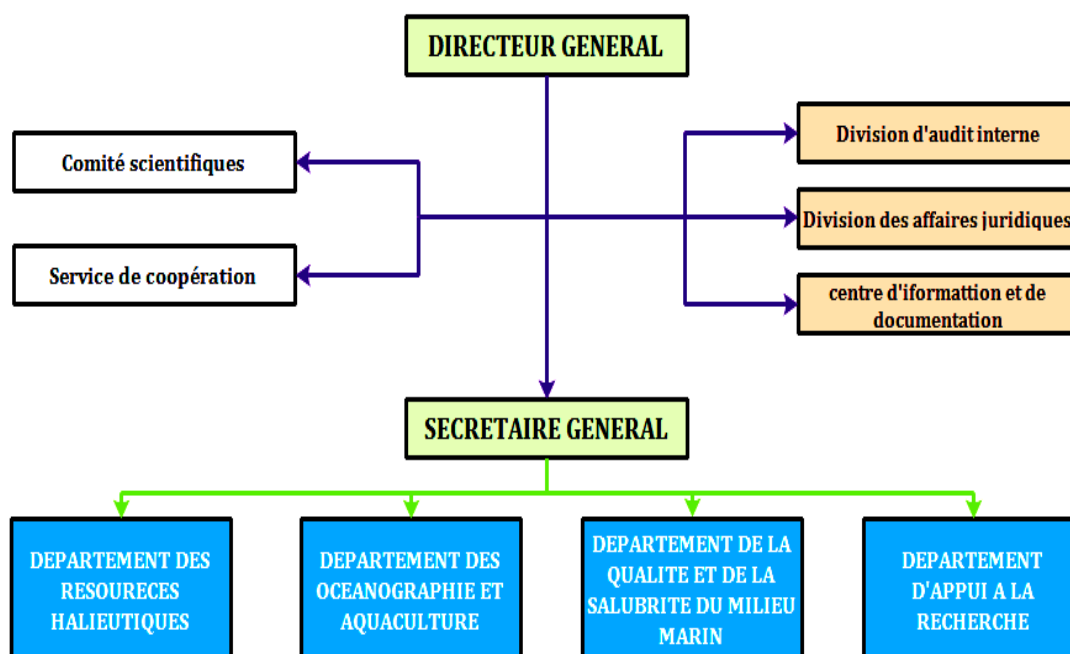


Figure 3 : Organisation de l'INRH au niveau central

### III.2 Niveau régional

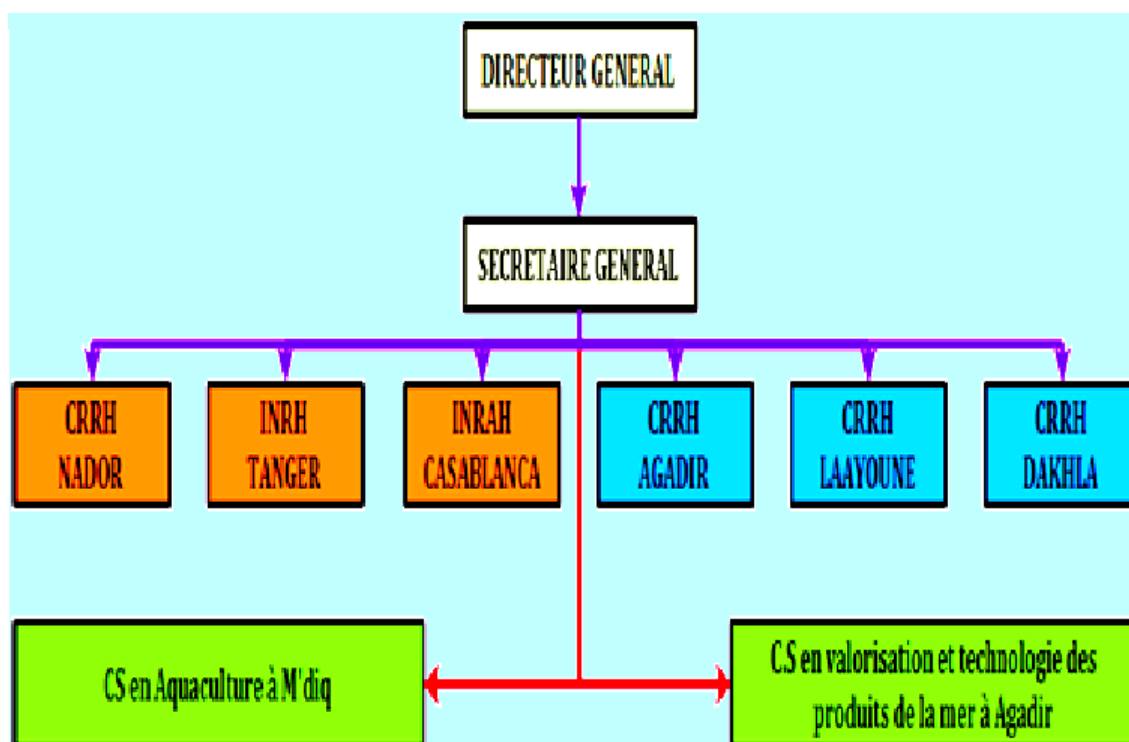


Figure 4 : Organisation de l'INRH au niveau régional

## IV. Gestion du CSVTPM

### IV.1 Comité de Direction

Chargé de tracer les grandes orientations du Centre, de valider ses programmes, d'activité et d'identifier les moyens et les ressources nécessaires afin de renforcer son fonctionnement.

### IV.2 Comité Scientifique et Technique

Chargé d'accompagner le Centre sur le plan scientifique et technique, d'évaluer périodiquement ses travaux et de lui prodiguer les avis et les conseils afin d'améliorer son efficacité dans l'accomplissement de ses missions.

### IV.3 Comité Conjoint de Coordination

Chargé d'assurer le suivi du déroulement des projets retenus dans le cadre de la coopération technique.

### IV.4 Comité mixte de coordination INRH/JICA

Chargé d'assurer le suivi du déroulement des projets retenus dans la cadre de la coopération technique Maroc-japonaise.

## V. Organisation du CSVTPM

Le centre spécialisé de l'INRH(CSVTPM), construit à Agadir est composé d'un bloc administratif et d'un bloc scientifique comprenant trois pôles.

### V.1 Pôle d'ingénieur



**Figure 5 : Unité pilote de valorisation**

Muni d'équipement pouvant assurer différents types de procédés, l'atelier permettra de développer avec les professionnels des idées produits, de tester de nouveaux procédés et d'optimiser les existants.

Ce Pôle est un atelier de transformation et de valorisation qui à pour objectif de:

- Développer avec les professionnels des idées produites.
- Tester des nouveaux procédés et optimiser les existants.
- Réaliser des préséries industrielles qui permettront de valider les paramètres technico-économiques des procédés, de budgétiser les éventuels investissements nécessaires et de tester le marché en toute sécurité avant d'engager des décisions d'investissements.

### V.2 Pôle recherche et développement

Contient un Laboratoire de microbiologie alimentaire qui à comme mission de :

- Contrôler les produits au cours du processus de fabrication de la matière première au produit fini.
- Améliorer les techniques de fabrication par la surveillance des points critiques sur la chaîne d'élaboration et évaluation des procédures de nettoyage et de désinfection.
- Déterminer la "Date Limite de Consommation (DLC)" des produits de la pêche.
- Etudier la stabilité des produits appertisés.

### V.3 Pôle contrôle de la qualité

Ce pôle constitué des laboratoires scientifiques qui ont pour rôle le suivi de la qualité grâce aux disciplines de microbiologie, de physico-chimie et d'analyses spécifiques et sensoriels.

#### ✓ Laboratoire de chimie-biochimie alimentaire



**Figure 6 : Laboratoire de chimie-biochimie alimentaire**

Ce laboratoire vise à:

- Développer des recherches qui visent à comprendre les facteurs intrinsèques et extrinsèques des matières premières déterminants leur acceptabilité par le consommateur et l'industrie de transformation.
- Evaluer les paramètres de qualité de conservation et de nutrition du poisson lors des opérations de transformation et de stockage.
- Définir les valeurs nutritives et les dates limites de conservation du poisson selon les technologies de transformation utilisées.
- Identifier et doser les différentes formes chimiques des traces de métaux lourds dans les produits de la mer.

✓ **Laboratoire de biotechnologie marin :**



**Figure 7 : Laboratoire de biotechnologie marin**

De par l'appareillage disponible, ce laboratoire a pour missions principales :

- L'extraction des molécules à haute valeur ajoutée à partir de peaux, carapaces déchets de filetage viscéres et d'autres.
- L'extraction des substances et principes actifs à usage alimentaire, cosmétique et pharmaceutique.
- Mettre au point des procédés de fractionnement et de stabilisation de la biomasse.
- Caractériser les différents composés d'espèces marines et de leurs coproduits particulièrement sur les plans enzymatique et lipidique (oméga 3)
- Evaluer le potentiel des ingrédients actifs.
- Adapter les méthodes analytiques spécifiques pour l'identification des biomolécules marines.

## VI. Coopération de CSVTPM

### VI.1 Sur le plan national

La coopération nationale est mise à contribution pour la promotion des activités de recherche de centre. Cette collaboration est diversifiée :

- Un partenariat institutionnel (Département de la Pêche Marocaine (DPM), l'Office National de la Pêche (ONP) etc.)
- Un partenariat professionnel qui englobe les associations des industries de la pêche et leur fédération (Institut Française de Recherche pour d'Exploitation de la mer (FENIP) etc.)
- Des échanges scientifiques et académiques avec les structures des recherches scientifiques et de formation (Institut Spécialisé de la Pêche Maritime (ISPM) etc.)<sup>[1]</sup>.

### VI.2 Sur le plan international



JICA-japon : Agence Japonaise de Coopération International (JICA) signature en avril 2005 d'un projet de coopération pour le CSVTPM d'Agadir. Ce projet a pour objectif le développement de la commercialisation de nouvelles gammes de produits de la mer ainsi que l'introduction et l'élaboration de nouvelle technologie afin d'améliorer la qualité et l'état sanitaire dans les différents étapes du processus de fabrication et de distribution. L'assistance technique japonaise au CSVTPM est assurée par l'affectation d'experts japonais, par la fourniture d'équipements et par la formation technique au Japon au profit de chercheurs marocains associés au projet.



IFREMER, France : cette collaboration est établie dans le cadre des accords de coopération entre l'INRH et l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la mer (IFERE). Les axes de collaboration identifiés dans ce cadre portent sur un soutien général des actions de recherches et développement (RED) développées par le centre. L'Ifremer contribue également à la formation de cadre du CSVTPM en vue d'acquérir de nouvelles techniques analytiques et des nouvelles technologies de transformation du poisson.



INSTITUT PASTEUR

INSTITUT PASTEUR PARIS- France : cette collaboration est établie pour la conduite des programmes d'évaluation de l'incidence de contamination des produits de la pêche par les germes pathogènes de type *Listeria* et *Vibrions* pathogènes pour l'Homme.

## ***PARTIE 2 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE***

## I. Histamine

### I.1 La genèse de l'histamine dans les poissons

L'histamine est une amine biogène provenant de la décarboxylation de l'histidine, après la mort du poisson, sous l'effet de l'histidine-décarboxylase qui est une enzyme en grande partie d'origine bactérienne. Mais, elle peut aussi être d'origine tissulaire.

Le taux d'histamine dans les poissons dépend de la teneur en histidine ou de l'importance de l'enzyme histidine-décarboxylase.

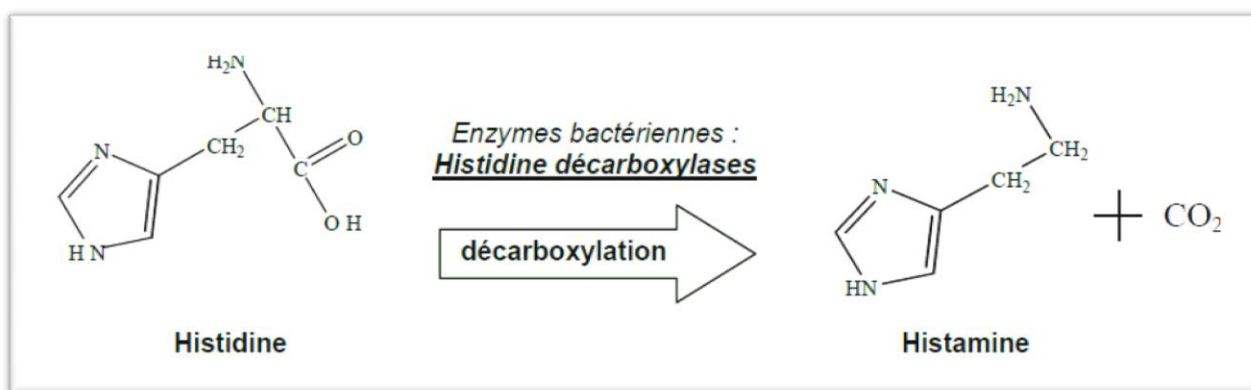
Il faut noter que l'importance des bactéries ou des enzymes bactériennes est en fonction :

- du degré de contamination avant le stockage
- des conditions de stockage
- de l'influence technologique

Les microorganismes responsables de la formation de l'histamine se développent principalement à des températures supérieures à 7-10°C dans les ouïes et les viscères des poissons. Parmi elles, il y a ***Morganella morganii***, ***Klebsiella pneumoniae*** et ***Hafnia alvei***...

Cependant de récentes recherches ont montré que certaines bactéries productrices d'histamine étaient actives entre 0 et 5°C.

La figure 8 ci-dessous représente le mécanisme de formation de l'histamine.



**Figure 8: Mécanisme intime de la formation de l'histamine**

Pour éviter la formation de l'histamine, il est recommandé de :

- Faire saigner et rincer le poisson soigneusement car le sang contient l'histidine
- Fait de la présence de nombreuses bactéries dans les viscères, effectuer impérativement les opérations d'éviscération, de rinçage et de réfrigération ou de congélation le plus rapidement possible.

-Ne rompre pas la chaîne de froid à aucun moment aussi bien lors de la capture que lors de transformation, du conditionnement et de commercialisation.

-Respecter les bonnes conditions d'hygiène pour éviter toute croissance des germes naturellement présents dans le poisson et toute contamination extérieure.

- Décongeler le poisson rapidement et l'utiliser aussitôt(en cas de congélation).

**Tableau 1 : Bactéries incriminées dans la formation d'histamine [3]**

| Type respiratoire                      | Famille            | Genres                                                                         | Principales Espèces                                                                                                                                                      |
|----------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aéro-anaérobies                        | Entérobactériaceae | -Salmonella<br>-Shigella<br>-Escherichia<br>-Klebsiella<br>-Proteus<br>-Hafnia | -Bacilles Gram<br>- <b>Morganella morganii</b><br>-Morganella psychrotolerants<br>-Photobacterium phosphoreum<br>- <b>Hafnia alvei</b><br>- <b>Klebsiella pneumoniae</b> |
| Anaérobies stricts<br>Gram(+) sporulés | vibrionaceae       | -Vibrio                                                                        | -Vibrio alginolyticus                                                                                                                                                    |
|                                        | Bacillaceae        | -Clostridium                                                                   | -Clostridium perfringens                                                                                                                                                 |

### I.2 Les effets de l'histamine

L'histamine est à l'origine d'une intoxication dite histaminique. Celle-ci survient lorsque le consommateur mange un poisson contenant de fortes teneurs en histamine.

Les symptômes de l'intoxication histaminique se manifestent comme suit [4] :

-Premiers symptômes : rougeur de visage et de la nuque, œdèmes du visage, sensation de brûlure dans la gorge et la bouche, et picotements de la peau

-Symptômes intervenant ensuite : maux de tête, étourdissement, palpitations cardiaques

-Symptômes secondaires de type gastro-intestinal : nausées, vomissements, diarrhée.

Les espèces de poissons riches en histamine appartiennent en grande partie à la famille des :

- Scombridés : thon (toutes espèces), maquereau...

- Clupéidés : sardinelles, hareng...

### **I.3 Les facteurs de développement des bactéries**

#### **I.3.1 La température**

Dans les conditions naturelles, chaque micro-organisme a une température et une humidité optimales de développement. Exposés à des températures trop différentes de celles-ci pendant un temps suffisamment long, beaucoup de microorganismes meurent.

#### **I.3.2 L'humidité relative**

L'humidité relative du lieu d'entreposage influe à la fois sur l'activité de l'eau de l'aliment (équilibre dynamique) et sur la croissance des microorganismes à la surface de cet aliment.

#### **I.3.3 L'activité d'eau**

Selon WATERMAN en 1977, l'activité de l'eau est la quantité d'eau libre disponible dans un aliment pour le développement des microorganismes et les réactions chimiques [5].

#### **I.3.4 Le potentiel d'hydrogène (pH)**

La plupart des microorganismes se développent mieux à un pH voisin de 7.

La diminution du pH affecte la thermorésistance des spores ; On considère qu'en dessous de pH 4,5, la thermorésistance des spores bactériennes est nulle. Par ailleurs, étant donné que les bactéries pathogènes et la majorité des bactéries d'altération ne se développent pas à des pH < 4,5, on divise les produits alimentaires en deux catégories :

- produits faiblement acides pH > 4,5.
- produits fortement acides pH < 4,5 [5].

### **I.4 Aspects réglementaires et normatifs**

#### **I.4.1 Méthodes de dosage**

De nombreuses méthodes sont utilisées au laboratoire pour déterminer la teneur en histamine dans les poissons.

Selon le règlement européen n°2073/2005 du 15 novembre 2005, on peut utiliser une des méthodes suivantes [4]:

### ***I.4.1.1 Méthodes chromatographiques***

-Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) : c'est une méthode sensible et très précise. Son inconvénient est qu'elle nécessite un équipement sophistiqué et du personnel spécifiquement formé à ce matériel.

-Chromatographie en phase gazeuse (CPG) : c'est une méthode également sensible et rapide. Mais elle présente comme inconvénient : équipement cher.

-Chromatographie sur couche mince (CCM) : elle permet de tester plusieurs échantillons en même temps. Mais le seuil de détection de la présence d'histamine par cette méthode est relativement haut (50mg/kg) et certains des réactifs employés sont toxiques.

### ***I.4.1.2 Méthodes Immuno-enzymatiques***

Comme leur nom l'indique, ces méthodes font intervenir des enzymes et des anticorps. Ces méthodes sont rapides et permettent d'analyser simultanément plusieurs échantillons. Mais certains réactifs nécessitent d'être stockés à -20°C ou entre 0 et 4°C.

### ***I.4.1.3 Méthode fluorimétrique***

La méthode fluorimétrique est également prévue par la réglementation européenne. C'est une méthode dite quantitative.

Le dosage fluorimétrique présente des avantages remarquables :

- elle est d'exécution rapide.

- elle n'expose pas le manipulateur aux vapeurs de certains réactifs dangereux.

Néanmoins elle demande un appareillage important et des réactifs très chers.

## **I.4.2 Méthodes d'interprétation**

Ils se situent à deux niveaux:



Au niveau Européen :

Au niveau européen, les limites de concentration à ne pas dépasser pour l'histamine sont définies par le règlement CE n°2073/2005 du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.

Un produit est de qualité satisfaisante si :

- la teneur moyenne ne dépasse pas 100 mg d'histamine /kg. (100ppm ou 10mg/100g)

- aucun échantillon ne dépasse 200 mg d'histamine /kg

Dans le cas où un des deux critères précédents n'est pas rempli, le produit est jugé de qualité insatisfaisante.



Au niveau international :

C'est le Codex Alimentaires qui a fixé les limites de concentration à ne pas dépasser. Ces seuils sont de deux types :

- le premier est un seuil de qualité, indicateur d'altération du produit. Il est égal à 100 mg/kg ou 10mg/100g.
- le second est un critère de santé publique qui ne doit pas être dépassé. Il est fixé à 200 mg/kg [4].

## II. Problématique

A cause des faibles niveaux de détection exigés par la réglementation et la nature des matrices dans lesquelles les composés d'intérêts sont présents la préparation d'échantillon, la détection et l'identification des composés à des niveaux de traces sont des aspects des méthodes analytiques.

La surveillance de la qualité des produits de la mer est confrontée à la quantification et l'identification de centaines de molécules ayant des propriétés physico-chimiques différentes dans des matrices variées (telle que l'histamine). Aussi des méthodes sensibles, sélectives, fiables et engendrant un cout modéré sont nécessaires et représentent un enjeu non négligeable voire même un défi pour les analystes.

C'est dans ce contexte de réglementation de la présence d'histamine, du respect de la conformité commerciale des produits de la pêche et de la garantie de la sécurité du consommateur, que des méthodes analytiques capables d'identifier sans ambiguïté les teneurs en histamine et de les quantifier à de très faibles niveaux sont très fortement requises. C'est dans cette même voie que des travaux de mise au point du méthode d'analyses de cette molécule (Méthode spectrofluorimétrie) ont démaré au CVTPM pour évaluer le degré de sensibilité de l'appareil, renforcer le plan de contrôle des produits de la pêche et valider l'utilisation quotidienne de cette méthode pour une quantification avec une exactitude précise et un degré d'incertitude acceptable d'histamine présente dans ces derniers.

### III. La validation analytique

La validation des procédures analytiques quantitatives est, aujourd'hui, largement répondue dans tous les domaines d'activité où des mesures sont réalisées. Le champ d'application de la validation analytique s'étend à toute procédure d'analyse utilisée dans le contrôle de la matière première, le contrôle en cours de fabrication, le contrôle des produits intermédiaires et finis et les essais de stabilité de tous les produits.

De plus pour tout laboratoire, la validation analytique est une nécessité universellement reconnue, en vue de la garantie d'un système d'assurance qualité complet [6].

#### III.1 Définitions

**Selon la norme ISO/IEC 17025** : La validation se définit comme la « confirmation par l'examen et l'apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières en vue de l'utilisation prévue déterminée sont remplies » [7].

Valider, c'est démontrer que les méthodes correspondent à l'utilisation pour laquelle elles sont proposées et permettent de minimiser les essais effectués et minimiser les deux risques de premier et deuxième espèces c'est à dire le risque d'accepter une procédure qui ne serait pas suffisamment exact ou, au contraire, de rejeter une procédure qui serait fiable.

#### III.2 Objectif de la validation analytique

L'objectif de la validation est de :

- démontrer qu'elles conviennent aux usages auxquels on les destine [8].
- permettre de donner aux laboratoires ainsi qu'aux autorités compétentes, les garanties que chaque mesure qui sera réalisée ultérieurement en routine, une fois la procédure validée, sera suffisamment proche de la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable, en fonction de la finalité de la procédure. Le but est de minimiser le risque tant au niveau du producteur que du futur consommateur [9].

### III.3 Textes de références pour la validation analytique

La validation analytique est régie par des textes réglementaires ou des référentiels tels ceux de :

❖ **SFSTP (Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques) :**

Présente les recommandations réglementaires communément admises et appliquées dans l'industrie pharmaceutique nationale et une démarche statistique pour la validation d'une procédure analytique.

❖ **L'ICH : (International Conference on Harmonization) :**

Représentent la référence internationale de base en matière de validation analytique pour l'industrie pharmaceutique [8].

❖ **FDA (Food and Drug Administration), l'European Medicines Agency (EMA).**

❖ **L'International Union of Pure and Applied chemistry (IUPAC).**

❖ **L'Association of Official Analytical Chemists (AOAC).**

Toutes ces références décrivent et définissent les critères de validation à prendre en considération pour toute validation analytique.

### III.4 Critères de validation

La validation d'une méthode analytique consiste à vérifier certains critères à savoir :

- La spécificité
- La linéarité
- La justesse
- La fidélité :
  - Répétabilité (intra-laboratoire)
  - Fidélité intermédiaire
  - Reproductibilité (inter-laboratoires)
- L'exactitude
- La limite de détection
- La limite de quantification
- L'intervalle de dosage
- La fonction de réponse

Les paramètres faisant partie de la validation d'une méthode analytique dépendent de cette méthode (ICH Q2) :

- Tests d'identification
- Test limite de recherche d'impureté
- Test quantitatif de teneur en impureté
- Test quantitatif de teneur en principe actif (PA)

Le tableau suivant renseigne les différentes caractéristiques à évaluer en fonction du type de procédure analytique à valider. Cette liste doit être considérée comme un guide et une base de référence.

**Tableau 2 :** Les critères à évaluer en fonction du type de procédure analytique à valider

| Type de tests caractéristiques | Dosage | Impuretés   |                | Identification |
|--------------------------------|--------|-------------|----------------|----------------|
|                                |        | Quantitatif | Essais limites |                |
| Fidélité : Répétabilité        | ✓      | ✓           | ✓              |                |
| Fidélité intermédiaire         | ✓      | ✓           | ✓              |                |
| Spécificité/sélectivité        | ✓      | ✓           | ✓              | ✓              |
| Limite de détection            |        | ✓           | ✓              |                |
| Limite de quantification       |        | ✓           | ✓              |                |
| Linéarité                      | ✓      | ✓           | ✓              |                |
| Intervalle de mesure           | ✓      | ✓           | ✓              |                |
| Robustesse                     | ✓      | ✓           | ✓              |                |

### III.4.1 Spécificité

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composantes potentiellement présentes. En effet elle permet de vérifier que la ou les substance(s) analysée(s) au sein de la matrice est bien le ou les analyte(s) recherché(s).

En chimie analytique, la cause principale d'un manque de spécificité est la présence d'interférences. Les interférences sont une des grandes causes d'erreur de justesse.

### III.4.2 Linéarité

La linéarité d'une procédure analytique donnée est *'' sa capacité (à l'intérieur d'un intervalle de dosage donné) à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration/quantité de la substance à analyser (dans l'échantillon) [8]''* sur lequel il a été démontré que la procédure possède une fidélité, une exactitude et une linéarité appropriées.

### III.4.3 Exactitude

L'exactitude d'une procédure analytique exprime *« l'étroitesse de l'accord entre la valeur acceptée comme conventionnellement vraie, ou comme valeur de référence, et la valeur trouvée » [10]*. Elle est appelée justesse. La mesure de la justesse est exprimée en termes du biais, celui-ci représentant la différence entre la moyenne des résultats d'essais et la valeur de référence acceptée.

### III.4.4 Fidélité

La Fidélité d'une procédure analytique exprime *« l'étroitesse de l'accord (mesure de la dispersion) entre une série de mesures obtenues à partir de plusieurs prises d'essai provenant d'un même échantillon homogène, dans les conditions prescrites » [11]*. La fidélité traduit uniquement la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée.

La fidélité d'une procédure analytique est en général exprimée en termes de variance, d'écart type ou de coefficient de variation d'une série de résultats de mesure. Aussi elle peut être considérée à 3 niveaux : Répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité.

- **Répétabilité**

La Répétabilité est la fidélité obtenue dans des conditions opératoires identiques (conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps) Elle est également appelée fidélité intra-essai.

- **Fidélité intermédiaire**

La fidélité intermédiaire est l'expression de la variabilité intra-laboratoire (conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, avec des jours différents, des analystes différents, et des équipements différents).

- **Reproductibilité**

La reproductibilité est l'expression de la variabilité inter-laboratoires (conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents).

### III.4.5 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.

### III.4.6 Intervalle de dosage

L'intervalle de dosage d'une procédure d'analyse est la région entre les niveaux supérieurs et d'inférieurs (ces valeurs incluses) pour la quelle il a été démontré que la procédure est appropriée quant à son exactitude (justesse+fidélité) et sa linéarité, en utilisant la méthode décrite.

### III.4.7 Fonction de réponse

La fonction de réponse traduit à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existant entre réponse et la concentration en substance à examiner dans l'échantillon.

La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelé « courbe d'étalonnage »

## IV. Principe de la méthode du profil d'exactitude

### IV.1 Généralité

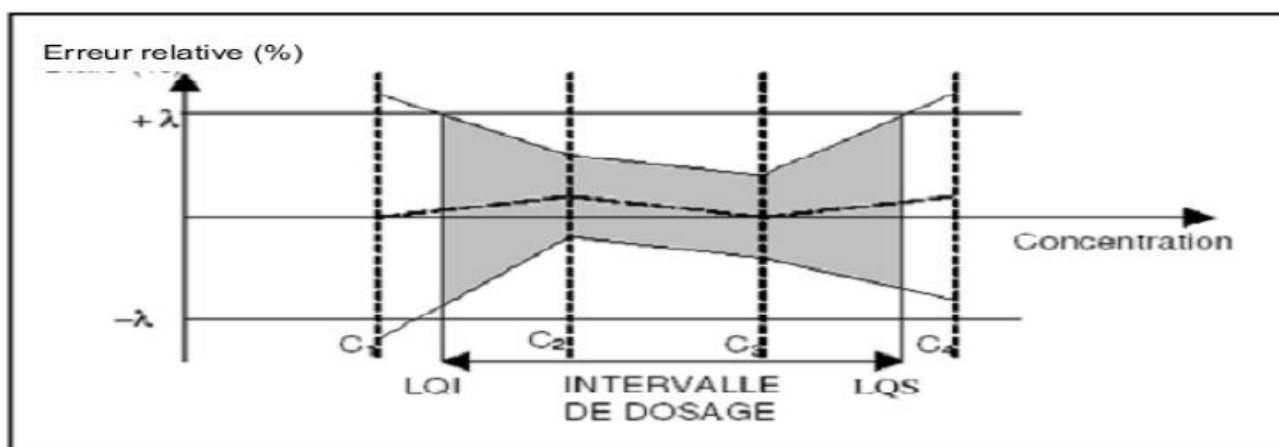
Si on revient à la définition fournie par la **norme ISO 17025**, il apparait qu'il est impératif de confronter la méthode à son objectif pour décider de sa validité : la validation ne peut pas être une simple caractérisation de la méthode à l'aide d'une liste plus ou moins longue de caractéristiques statistiques.

Bien que, plusieurs textes réglementaires et documents à caractères normatifs tels que (ISO, ICH, FDA, AOAC, EURACHEM...) que nous avons déjà cité, ont été proposés pour faire appliquer la validation, ils montrent des ambiguïtés en particulier lors de l'évaluation de la validité des résultats [12].

Pour faire face à ces problèmes, une nouvelle commission SFSTP a été créée en 2003. Cette dernière propose une nouvelle stratégie pour la validation des procédures quantitatives analytiques. Cette stratégie consiste à construire un outil de décision graphique simple appelé profil d'exactitude qui repose sur l'utilisation d'un intervalle de tolérance de type «  $\beta$ -expectation » comme méthodologie statistique. La supériorité de cette approche par rapport à ceux qui existaient déjà, est nettement claire [12].

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles de tolérance permet donc, comme illustré dans la figure n° 9, de décider de la capacité ou non d'une procédure à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. La zone en couleur grise montre l'intervalle de dosage dans lequel la procédure est capable de quantifier avec une exactitude connue et un risque fixé par l'analyste.

C'est ainsi que dans ces conditions, si l'analyste est prêt à assumer par exemple un risque de 5%, il pourra au terme de la validation de sa procédure garantir que 95 fois sur 100 les futures mesures fournies par celle-ci seront comprises dans les limites d'acceptation fixées en fonction des contraintes de son secteur d'activité.



**Figure 9 : Illustration du profil d'exactitude comme outil de décision.**

Comme les vraies valeurs de biais et de fidélité de la procédure sont inconnues, le profil d'exactitude par niveau de concentration ( $C_1, C_2, \dots$ ) s'obtient en calculant l'intervalle de tolérance qui permet d'évaluer la probabilité d'obtenir des résultats futurs dans des limites d'acceptation et ce, à partir des estimations disponibles du biais et de la fidélité de la procédure après la phase de validation au niveau de concentration en question. A noter que les estimations du biais et de la variance sont des éléments essentiels pour calculer les intervalles de tolérance, mais la décision n'est pas faite sur la base de ces estimations de biais et de variance [13].

Un objectif évident pour une méthode est qu'elle soit susceptible de fournir un résultat aussi exact que possible pour chaque échantillon inconnu à venir. Traduire cet objectif en termes statistiques, signifie que l'analyste veut connaître la probabilité selon laquelle la différence entre la valeur rapportée  $Y$  et la valeur de référence  $T$  reste inférieure à une limite d'acceptation (ou un pourcentage) fixée à l'avance et, si possible mais non nécessairement, que cette différence soit petite.

Cet objectif peut alors être représenté par l'équation 1 (Eq.1), dans laquelle  $\lambda$  représente la limite d'acceptation et  $\beta$  la probabilité considérée acceptable (par exemple 95%) que l'erreur sur les

futures mesures réalisées, une fois la méthode validée, se situent en dessous de la limite d'acceptation fixée.

$$\Pr(Y - T < \lambda) \geq \beta \text{ (Eq.1)}$$

La limite d'acceptation permet de montrer qu'on a plus de chances de produire des résultats non-conformes et trop éloignés de la valeur T avec la méthode B et que la méthode A réduit cette probabilité. Une solution possible pour calculer l'intervalle autour de Y correspondant à la probabilité  $\beta$  est basée sur le concept d'intervalle de tolérance  $\beta$  [14].

### IV.2 Domaine d'application

Le domaine d'application pour valider la méthode est défini par les points essentiels suivants :

#### Matrice d'analyse :

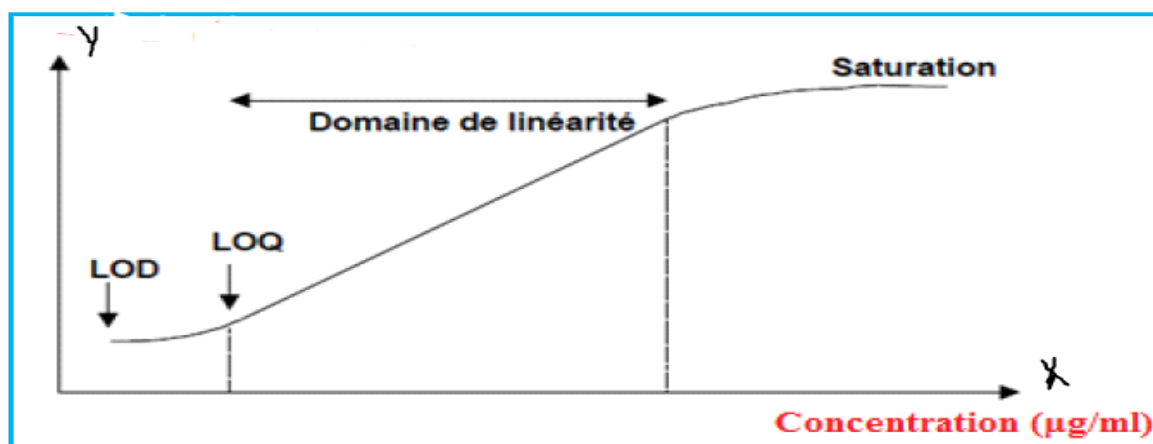
Il est obligatoire de définir la nature de la matrice :

Matrice simple (sa composition est bien déterminée)

Matrice complexe (exp : eau de mer, aliments, **poisson...**)

#### L'intervalle de dosage :

L'étude du domaine de linéarité (figure10), est évaluée généralement par la qualité de la régression (à partir du coefficient de détermination  $R^2$  qui représente le pouvoir explicatif du modèle de régression retenu. Elle permet de définir les limites haute et basse de la relation linéaire existant entre la concentration de l'analyse observée et la dilution effectuée.



**Figure 10 : Domaine de linéarité**

#### Spécificité /Sélectivité:

Toujours il faut vérifier si la présence de la matrice n'entraîne pas d'interférences.

La principale cause d'un manque de spécificité est la présence d'interférences.

L'interférence est un contributeur majeur de l'inexactitude. Les sources d'interférence sont également dues à la présence de constituants que celui qui est recherché dans la matrice : on parle alors d'effet de matrice.

En pratique, les interférences ont deux conséquences néfastes, soit:

- Ils mènent une surestimation de la concentration de l'échantillon, car la réponse est plus élevée que ce qu'elle devrait être.
- Ils provoquent une sous-estimation de la concentration, parce que le signal est partiellement masqué. Ils occasionnent donc un biais de justesse.

Très souvent la spécificité / sélectivité se fonde sur une absence d'interférences. Elle peut être démontée par différents moyens :

- Représentations graphique montrant l'effet des interférences ou du manque de la spécificité.
- De façon mathématique (résolution d'équations simultanées).
- De façon biochimie (réaction à l'aide d'enzymes).
- A l'aide des méthodes spectroscopiques (chromatographie).
- A l'aide d'un test statistique de student en comparant les pentes des deux droites de régression de PV et PE.

Dans notre cas nous proposons à représenter seulement le critère spécificité car dans notre travail la méthode de dosage n'est pas une méthode chromatographique. Donc ce critère est démontré par une simple représentation graphique qui sert à vérifier l'effet du manque de la spécificité en considérant les deux droites de régression de plan d'étalonnage et plan de validation :

- Une gamme de concentration est préparée par les étalons dont leurs concentrations sont connues.
- Les solutions à examiner sont préparées en dopant la matrice inconnue contenant l'analyte à doser (échantillon) par des quantités connues des étalons.
- Mesurer les paramètres des deux droites de régression.

### **Limites d'acceptation :**

Elles sont fixées en fonction des contraintes du secteur d'activité :

- $\pm 1\%$  ou  $\pm 2\%$  : pour la matière première.
- $\pm 5\%$  : pour les spécialités pharmaceutiques.
- $\pm 15\%$  : en bioanalyse, environnement...etc.

### IV.3 Etape de la validation analytique basée sur le concept de l'erreur totale

Les 10 étapes pour valider une méthode avec le profil d'exactitude :

- Disposer du mode opératoire et définir le mesurande.
- Définir le domaine de validation (gamme de concentrations) et l'objectif attendu de la méthode sous la forme d'un intervalle d'acceptabilité.
- Sélectionner des échantillons de validation dont les valeurs de référence sont connues.
- Choisir un plan d'expérience de validation.
- Pour les méthodes indirectes, choisir du plan d'expérience d'étalonnage
- Collecter les données.
- Pour les méthodes indirectes, calculer les concentrations retrouvées.
- Calculer les critères de validation à partir des concentrations retrouvées : principalement les écarts-types de fidélité.

- Calculer les intervalles de tolérance et construire le profil d'exactitude.
- Interpréter les résultats et décider si la méthode est valide ou non.

### IV.4 Avantages de l'approche de l'erreur totale

La méthode de validation reposant sur le concept de l'erreur totale en combinant les deux erreurs, aléatoire (fidélité) et systématique (justesse), présente plusieurs avantages par apport aux approches classiques :

- ✚ Elle est considérée comme une approche globale qui peut être appliquée quelque soit le domaine d'activité et la matrice étudiée.
- ✚ Elle propose une méthode d'interprétation graphique très simple et visuelle qui ne s'embarrasse pas de tests statistiques toujours délicats à décrypter.
- ✚ Elle permet de minimiser considérablement le risque d'accepter une procédure qui ne serait pas suffisamment exacte, ou contraire, de rejeter une procédure qui serait exacte.
- ✚ Elle permet non seulement de simplifier l'approche de validation d'une procédure mais aussi l'estimation de l'incertitude de mesure sur la base des données de validation.
- ✚ Elle permet de générer différents modèles d'étalonnages et possibilité de choisir le plus adéquat pour calculer par la prédiction inverse la concentration en retour.

## IV.5 Plans d'expériences

Deux plans d'expériences sont nécessaires, l'un dit d'étalonnage (PE) sert à calculer la fonction de réponse de la méthode, l'autre dit de validation (PV) sert à calculer les caractéristiques de validation. La même structure de plans a été choisie pour l'étalonnage et la validation : ( $n \times p \times m$ ) essais réalisés à  $m$  niveaux de concentration, sur  $p$  jours avec  $n$  répétitions [14].

### Remarque :

Les essais de validation doivent cependant être effectués les mêmes jours que ceux d'étalonnage afin d'utiliser les fonctions d'étalonnage correspondantes.

## IV.6 Calculer les critères de validation

### IV.6.1 Analyse de la fonction de réponse et prédiction inverse :

#### ❖ *Analyse de la fonction de réponse :*

C'est une étape plus importante car la fiabilité des résultats de validation qui seront obtenus dépend du modèle de régression sélectionné.

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

$$Y = f(X) + \varepsilon \text{ (Eq. 2)}$$

Où  $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$  est l'erreur associée à la fonction de réponse  $f$  appelée : Erreur résiduelle.

Le calcul des estimations des coefficients du modèle d'étalonnage peut faire appel à la technique statistique classique détaillée dans la littérature : c'est la régression par la méthode des moindres carrés (AFNOR, 1996).

Différentes fonctions de réponse peuvent être sélectionnées lors de la validation de la méthode, le tableau suivant illustre différents modèles sélectionnés dans notre travail :

**Tableau 3 : Les différents modèles sélectionnés**

| Type                                 | Equation                   | Paramètres |
|--------------------------------------|----------------------------|------------|
| Droite passe par l'origine           | $Y = aX$                   | $a$        |
| Droite                               | $Y = aX + b$               | $a, b$     |
| Transformation mathématique (racine) | $\sqrt{Y} = a\sqrt{X} + b$ | $a, b$     |
| Fonction quadratique                 | $Y = aX^2 + bX + c$        | $a, b, c$  |

## ❖ *Prédiction inverse :*

Le calcul des concentrations prédites inverses se fait à partir des données du PV en retranchées les concentrations trouvées pour le niveau sans ajout de chaque niveau de concentration . Ce calcul s'effectue via la fonction inverse de la fonction de réponse choisie à partir des données d'étalonnage selon les équations suivantes :

**Tableau 4 : Les fonctions inverses des fonctions de réponse choisies.**

| Type de fonction de réponse choisie | Equation                   | Prédiction des Concentrations calculées            |
|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------|
| Droite passant par l'origine        | $Y = aX$                   | $X_{cal} = \frac{Y}{a}$                            |
| Linéaire simple                     | $Y = aX + b$               | $X_{cal} = \frac{Y - b}{a}$                        |
| Linéaire quadratique                | $Y = aX^2 + bX + c$        | $X_{cal} = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4a(c - Y)}}{2a}$ |
| Racine carré                        | $\sqrt{Y} = a\sqrt{X} + b$ | $X_{cal} = \left(\frac{\sqrt{Y} - b}{a}\right)^2$  |

## **Remarque :**

Pour chaque jour (ou série), le calcul de la fonction de réponse se fait à partir des données du PE, en utilisant un même modèle théorique.

## **IV.6.2 Calcul de la justesse et de la fidélité**

### ❖ Calcul de la justesse :

La justesse d'une méthode (ou biais) à chaque niveau de concentration est obtenue en calculant la différence entre les concentrations introduites significient ( $X_j$ ) et les concentrations calculées moyenne ( $Z_j$ ). La justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique.

Ce calcul s'effectue indépendamment pour chaque niveau de concentration et selon le principe de la norme ISO 5725-2.

Les défauts de la justesse sont exprimés en 3 paramètres :

$$\text{Biais absolue} = Z_j - X_j \quad (\text{Eq.3})$$

$$\text{Biais Relatif (\%)} = 100 * (Z_j - X_j) / X_j \quad (\text{Eq.4})$$

$$\text{Recouvrement (\%)} = z_i / x_i \times 100 \quad (\text{Eq.5})$$

❖ Calcul de la fidélité :

La fidélité fournit une indication sur les erreurs due au hasard. Elle peut être estimée en calculant la répétabilité et la fidélité intermédiaire à chaque niveau de concentration  $j$ .

La norme ISO 5725 ne prend en compte que les plans d'expériences où le nombre de répétitions  $n$  par série est le même pour toutes les séries. Le nombre total de répétitions doit être égal à  $n \times p$ . Par contre, ce total peut être différent pour chaque niveau.

Les variances  $\sigma^2_{B,j}$  et  $\sigma^2_{W,j}$  représentent les variances inter-série et intra-séries respectivement.

L'estimation de la fidélité nécessite une analyse de la variance (one way balanced ANOVA) à chaque niveau de concentration. Cette dernière analyse permet de calculer les variances inter et intra séries en utilisant les équations suivantes :

$$CM_{\text{inter-série},j} = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p nij(\bar{x}_{ij} \text{ cal} - \bar{x}_{.j.} \text{ cal})^2 \quad (\text{Eq.6})$$

$$CM_{\text{intra-série},j} = \frac{1}{p(n-1)} \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^n nij(x_{ijk} \text{ cal} - \bar{x}_{ij.} \text{ cal})^2 \quad (\text{Eq.7})$$

– Si  $CM_{\text{intra-série},j} < CM_{\text{inter-série},j}$  alors :

Les variances intra-série et inter-série sont :  $\sigma^2_{W,j} = CM_{\text{intra-série},j} \quad (\text{Eq.8})$

$$\sigma^2_{B,j} = \frac{CM_{\text{inter-série},j} - CM_{\text{intra-série},j}}{n} \quad (\text{Eq.9})$$

$$\sigma^2_{fi} = \sigma^2_W + \sigma^2_B \quad (\text{Eq.10})$$

– Si non :  $\sigma^2_{W,j} = CM_{\text{intra-série}} \quad (\text{Eq.11})$

$$\sigma^2_{fi} = \sigma^2_{\text{totale}} \quad (\text{Eq.12})$$

$$\sigma^2_{B,j} = 0 \quad (\text{Eq.13})$$

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de variance de répétabilité  $\sigma^2_{R,j}$ :

$$\sigma^2_{R,j} = \sigma^2_{W,j} \quad (\text{Eq.14})$$

$$CV_r = \frac{\sigma_{R,j}}{Z_j} * 100 \quad (\text{Eq.15})$$

Et la somme des estimations des variances intra et inter série donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaires  $\sigma^2_{FI}$  :

$$\sigma^2_{FI,j} = \sigma^2_{W,j} + \sigma^2_{B,j} \quad (\text{Eq.16})$$

$$CV_{FI} = \frac{\sigma_{FI,j}}{Z_j} * 100 \quad (\text{Eq.17})$$

n : est le nombre de répétition pour chaque série et p : est le nombre de séries.

#### IV.6.3 Calcul des intervalles de tolérance

Ce qui nous importe cependant en validation, ce n'est pas la validité des résultats obtenus que nous obtenions avec l'Erreur Totale, mais plutôt la garantie ou une représentation de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultats dans le futur, C'est le rôle de l'intervalle de Tolérance.

La méthode de calcul proposée par Mee (1984) est celle qui a été choisie pour cette procédure. Elle a aussi été adoptée par une commission de la Société des sciences et techniques pharmaceutiques (SFSTP - 2003, 2006). Le calcul se fait à partir des données des critères de fidélité et de justesse par niveau, indépendamment pour chaque niveau de concentration j.

L'estimation des paramètres  $\mu_j$ ,  $\sigma^2_{B,j}$  et  $\sigma^2_{W,j}$  à chaque niveau de concentration j à pour but de permettre d'estimer la proportion attendue d'observation dans les limites d'acceptation prédéfinies  $[-\lambda, \lambda]$ , c'est-à-dire :

$$E_{\mu, \sigma} \{P[|X - \mu_T| < \lambda] | \mu, \sigma\} \geq \beta \quad (\text{Eq.18})$$

Cependant il n'existe pas de solution exacte pour estimer cette proportion attendue. La solution qui est déjà proposée par plusieurs auteurs est de calculer l'intervalle de tolérance (bêta-expectation Tolerance Interval) tel que proposé par Mee :

$$\left[ \hat{\mu}_j - Q\left(v, \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{n \cdot p \cdot B_j^2}} \hat{\sigma}_{f.i.j} ; \hat{\mu}_j + Q\left(v, \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{n \cdot p \cdot B_j^2}} \hat{\sigma}_{f.i.j} \right] \quad (\text{Eq.19})$$

Si on remplace la valeur de la moyenne estimée des concentrations calculées par le biais relatif estimé de la méthode d'analyses et l'écart type par le coefficient de variation, les bornes supérieur et inférieur de l'intervalle de tolérance sont données par les deux formules suivantes :

$$\left[ \left( \text{Biais}(\%) - Q\left(v, \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{p \cdot n \cdot B_j^2}} CV_{fi,j} \right) ; \left( \text{Biais}(\%) + Q\left(v, \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{p \cdot n \cdot B_j^2}} CV_{fi,j} \right) \right] \quad (\text{Eq.20})$$

Avec :

- $Q\left[\frac{1+\beta}{2}, v\right]$  : est le quantile  $\beta$  de la distribution t de Student à  $v$  degré de liberté.
- $R_j = \frac{S^2_{Bj}}{S^2_{Wj}}$

- $$v = \frac{(Rj+1)^2}{\frac{(R+\frac{1}{n})^2}{p-1} + \frac{1-\frac{1}{n}}{np}}$$
- $$B_j = \sqrt{\frac{Rj+1}{nRj+1}}$$
- $$CV_{Fl,j} = \frac{Sfi}{\text{moyenne des } Cr} * 100$$
- n : nombre de répétition par série et P : Nombre de séries

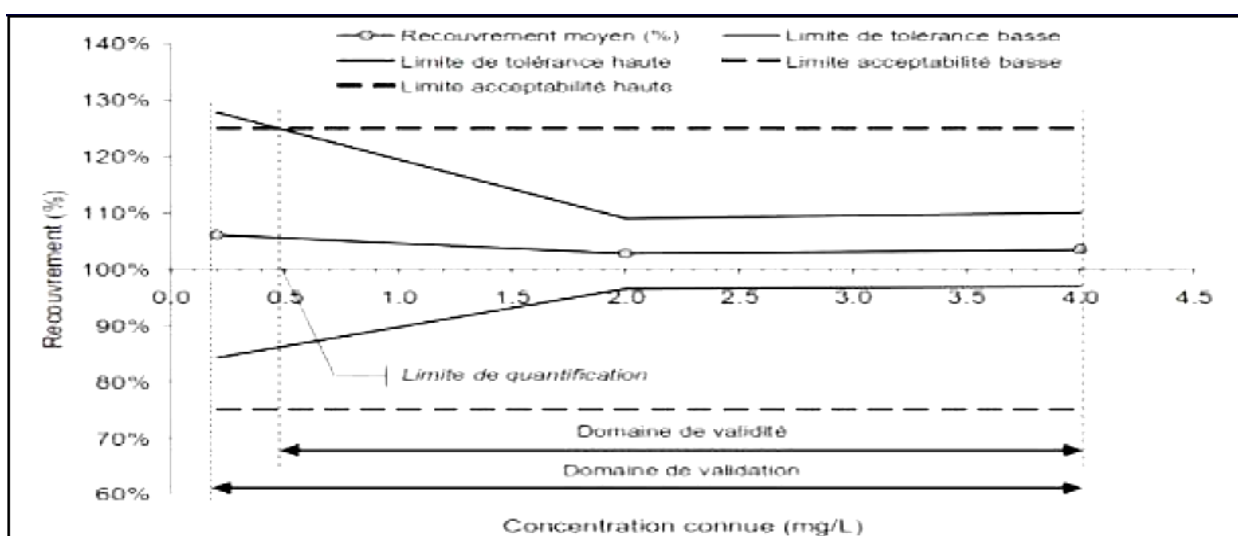
#### IV.6.4 Construction du Profil d'exactitude et décision

Pour faciliter l'interprétation, le mode le plus adéquat est ce lui qui consiste à exprimer tout les résultats en valeurs relatives ramènes à la valeur de référence du chaque niveau. Les limites d'acceptabilités sont aussi exprimées en valeurs relatives.

Sur l'axe des abscisses, on représente la concentration théorique des niveaux tandis que sur l'axe des ordonnées on représente simultanément :

- Les limites des intervalles de tolérances d'espérance  $\beta$  calculés sur les concentrations retrouvées et exprimé en pourcentages sous la forme d'un taux de recouvrement ou d'une exactitude relative.
- Les limites d'acceptabilité définie en fonction de l'objectif de la méthode exprimée de la même façon que les intervalles de tolérance.

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes  $L_j$  entre elles ( $L1 \rightarrow L2 \rightarrow \dots \rightarrow Lm$ ) et d'autre part les bornes  $U_i$  entre elles ( $U1 \rightarrow U2 \rightarrow \dots \rightarrow Um$ ) comme dans la figure 11 suivante :

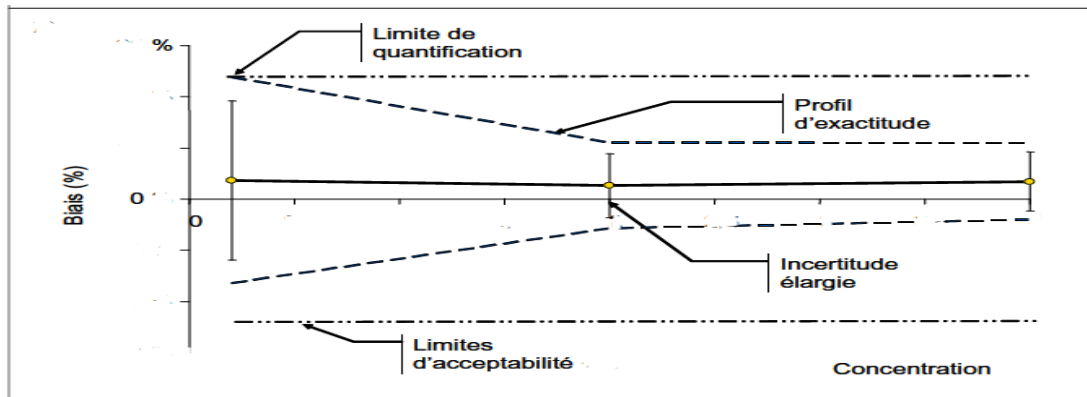


**Figure 11 :** Exemple de profil d'exactitude construit avec 3 niveaux de concentration (0,4 ; 2 et 4 mg/L) qui délimitent le domaine de validation (ou d'application) de la méthode à valider

La méthode est considérée comme exacte (validé) au niveau de confiance  $\beta$  à un niveau de concentration  $j$  si l'intervalle de tolérance est inclus (ou dite aussi tombe) dans les limites d'acceptation prédéfinies  $[-\lambda, +\lambda]$ .

#### IV.6.5 Calcul de la limite de quantification

Elle est calculée par simple interpolation linéaire entre les points où l'intervalle de tolérance coupe la limite d'acceptabilité.



**Figure 12 : Calcul de la limite de quantification par interpolation [14]**

La LQ peut être obtenue en calculant l'abscisse du point d'intersection de la droite de la limite d'acceptation et de la droite de l'intervalle de tolérance.

- Z les valeurs absolues lues sur l'axe des ordonnées.
- X les valeurs de référence fournies par l'axe des abscisses.
- $X_a$  et  $X_b$  les abscisses des deux niveaux A et B.
- $X_{at}$  et  $X_{bt}$  les ordonnées de la limite supérieure (ou inférieure) de l'intervalle de tolérance.
- $X_{aa}$  et  $X_{ab}$  les ordonnées de la limite supérieure (ou inférieure) d'acceptabilité.

Les équations de deux droites (intervalle de tolérance et limite d'acceptabilité) sont respectivement:

$$Z = t_0 + t_1X$$

$$Z = a_0 + a_1X$$

L'égalité entre les deux droites permet de calculer la LQ :

$$t_0 + t_1X = a_0 + a_1X$$

Donc :

$$(t_1 - a_1)X = a_0 - t_0$$

La limite de quantification s'exprime comme suit :

$$XLQ = \frac{a_0 - t_0}{(t_1 - a_1)} \quad (\text{Eq.21})$$

### IV.7 Estimation de l'incertitude de mesure

#### IV.7.1 Concept d'incertitude

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. 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.

L'incertitude au sens large, d'une mesure est la zone au sein de laquelle se trouve probablement la valeur vraie [15]. Cette zone est définie par une dispersion et se quantifie par un écart type. Elle reflète la qualité d'un mesurage, d'un instrument ou d'une méthode employée. C'est donc un indicateur de qualité.

#### IV.7.2 Incertitude et erreur :

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.

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 [15].

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.

Finalement, pour le résultat d'une mesure  $x$ , l'erreur doit être distinguée de l'incertitude.

### IV.7.3 Calcul d'incertitude :

L'expression de l'incertitude-type composée de  $Z$  est à peu près égale à :

$$U(Z) \approx \sqrt{u^2(\delta) + S^2_B + S^2_r} \quad (\text{Eq.22})$$

Par exemple, la variance de fidélité intermédiaire est égale à :

$$S^2_{fi} = S^2_r + S^2_B$$

Avec :

$S^2_B$  : représente la variance de l'effet série ;

$S^2_r$  : la variance de répétabilité.

Et la variance  $\delta$  est égale à la variance de la moyenne générale:

$$u^2(\delta) = S^2_{fi} * \left(\frac{1}{npB^2}\right) \quad (\text{Eq.23})$$

$p$  : est le nombre de séries

$n$  : est le nombre de répétitions.

Si on additionne ces deux variances, comme la loi de propagation des incertitudes le propose, on trouve que l'incertitude composée de  $Z$  est égale à écart type de l'intervalle de tolérance :

$$U(Z) \approx S_{fi} \sqrt{1 + \frac{1}{npB^2}} = S_{IT} \quad (\text{Eq.24})$$

Puisque l'incertitude composée de  $Z$  est égale à  $S_{IT}$ , alors leur estimation se fait à partir des calculs effectués lors de la construction du profil d'exactitude pour les différents niveaux de concentration retenue dans le plan de validation. D'un point de vue pratique, on utilise l'incertitude élargie à 95%, notée :

$$U(Z) = 2 * S_{IT}. \quad (\text{Eq.25})$$

Ou l'incertitude élargie relative :

$$U(\%) = \frac{U(Z)}{C_{moyenne\ retourné}} * 100 \quad (\text{Eq.26})$$



## **PARTIE III : VALIDATION DE LA METHODE DE DOSAGE D'HISTAMINE PAR PROFIL D'EXACTITUDE**

## I. Matériels et méthode

### I.1 Méthode de LERKE et BELL

#### I.1.1 Objet de domaine d'application

Le dosage de l'histamine dans les produits de la mer permet d'évaluer le degré de toxicité. Cette méthode de dosage de l'histamine est applicable à l'ensemble des produits de la pêche quel que soit leur mode de présentation

#### I.1.2 Principe

L'histamine est extraite par l'acide trichloracétique puis fixé sur une colonne remplie d'une résine échangeuse d'ions et éluée par l'acide chlorhydrique. Le dosage est effectué par fluorométrie après addition d'ortho-phthalaldéhyde.

#### I.1.3 Réactifs et leurs préparation

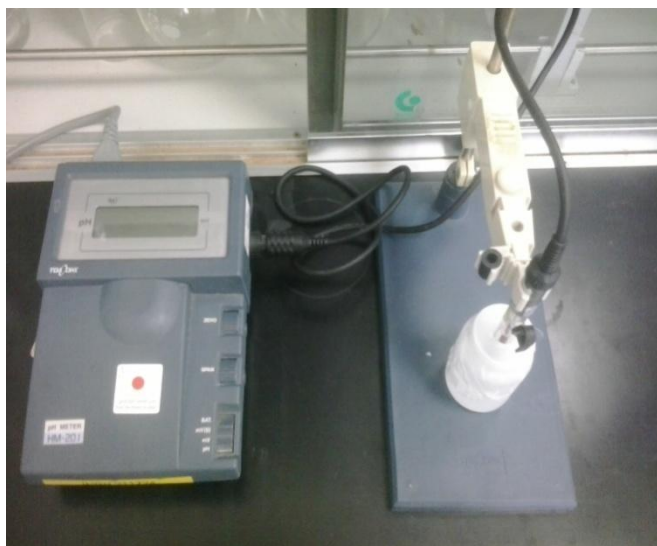
**Tableau 5 : Instructions de préparation des réactifs chimiques pour le dosage de l'histamine**

| Instruction       | Nature                                                                 | Description                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| • Instruction H01 | Préparation de Solution d'acide trichloracétique à 10% (M/V)           | Peser 100g d'acide TCA pur et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau.                                                                                                                                                      |
| • Instruction H02 | Préparation de résine Amberlite CG-50 100-200 Mesh (type 1.75 microns) | Mettre en suspensions 1,3g de résine Amberlite dans une quantité suffisante de tampon acétate, transférer dans la colonne. L'hauteur de résine doit être de 50mm                                                                |
| • Instruction H03 | Préparation de Tampon Acétate (0.2 molaire, pH 4.62)                   | dissoudre 27.20 g d'acétate de sodium cristallisable dans quelques ml d'eau, ajouter 11.4 ml d'acide acétique et compléter à 2 litres avec de l'eau. Le pH est ramené à 4.62 avec quelques gouttes de $\text{CH}_3\text{COONa}$ |
| • Instruction H04 | Préparation de solution Acide chlorhydrique 1N                         | prélever 82.8ml d'Acide chlorhydrique Concentré (37% ; $d=1,19$ ; $M=36,46$ ) et compléter le volume par l'eau jusqu' à un litre.                                                                                               |
| • Instruction H05 | Préparation de solution Acide chlorhydrique 0.2N                       | Pipeter 200ml d'Acide chlorhydrique 1N et compléter le volume par l'eau jusqu' à un litre.                                                                                                                                      |

|                   |                                                                                           |                                                                                                                            |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| • Instruction H06 | Préparation de solution<br>Acide chlorhydrique<br>0.7N                                    | Pipeter 175ml d'Acide chlorhydrique 1N et compléter le volume par l'eau jusqu'à 250 ml.                                    |
| • Instruction H07 | Hydroxyde de sodium<br>solution 1N                                                        | Dissoudre 40g d'Hydroxyde de sodium dans un litre d'eau.                                                                   |
| • Instruction H08 | Préparation de solution<br>Ortho-phthalaldehyde à<br>1% dans l'alcool<br>méthylique (M/V) | Peser 0.2g Ortho-phthalaldehyde et compléter le volume à 20ml avec de l'alcool méthylique.                                 |
| • Instruction H09 | Préparation de solution<br>mère d'histamine à 1g/l                                        | Dissoudre 0.1656 g de dichlorhydrate d'histamine dans 100 ml d'acide chlorhydrique 0.1N                                    |
| • Instruction H10 | Préparation de Solution<br>étalon d'histamine à 20<br>ppm                                 | Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire 2 ml de solution mère et compléter avec l'acide trichloracétique à 10% (M/V)   |
| • Instruction H12 | Préparation de Solution<br>étalon d'histamine à 15<br>ppm                                 | Dans une fiole jaugée de 100ml, introduire 1,5 ml de solution mère et compléter avec l'acide trichloracétique à 10% (M/V)  |
| • Instruction H13 | Préparation de Solution<br>étalon d'histamine à 10<br>ppm                                 | Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire 1 ml de solution mère et compléter avec l'acide trichloracétique à 10% (M/V)   |
| • Instruction H14 | Préparation de Solution<br>étalon d'histamine à 5<br>ppm                                  | Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire 0,5 ml de solution mère et compléter avec l'acide trichloracétique à 10% (M/V) |

### I.2 Matériels du laboratoire

❖ Verreries et petits Matériel :



**Figure 13 : pH Mètre (HM – 20 J)**



**Figure 14 : Colonnes d'échangeuses d'ions**

**Tableau 6 : Matériel du laboratoire**

| Verrerie du laboratoire                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Petits matériel                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fioles jaugées de 500mL de classe A</li> <li>- Fioles jaugées de 1000mL de classe A</li> <li>- Fioles jaugées de 250mL de classe A</li> <li>- Bouteilles en verre de couleur ombrée</li> <li>- Tubes en verre - Entonnoirs</li> <li>- Erlen Mayer</li> <li>-béchers</li> <li>- Pipette de 10ml</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Micropipette de 50 à 1000 <math>\mu</math>L</li> <li>- Micropipette de 10 à 100 <math>\mu</math>L (SOCOREX)</li> <li>- Micropipette de 1 à 5 ml (HUMAN)</li> <li>- Balance de précision (<math>\mp</math>0,001g)</li> <li>- Balance analytique (<math>\mp</math>0,01g)</li> <li>- Agitateur magnétique (SIBATA MGP-301)</li> <li>- Mixeur (Moulinex)</li> </ul> |

❖ Appareillage :

- \* 10 Colonnes en verre de 150 x 9mm munie d'un robinet et d'un réservoir de 250 ml (Figure 14).
- \* Distillateur (ADVONTEC GS-990)
- \* Spectrofluorimètre (type : RF-5301PC SHIMADZU)
- \* pH –mètre (HM-20J) (figure13)



**Figure 15 : Spectrofluorimètre RF-5301PC SHIMADZU**

### I.3 Mode opératoire

#### ❖ *Préparation de l'extrait T.C.A :*

- Peser à 0.01 g près 5 g de l'échantillon
- Ajouter 45 ml de T.C.A à 10%
- Broyer pendant une minute
- Filtrer ensuite sur papier filtre

#### ❖ *Purification de l'histamine :*

- Dans un bêcher, placer 20ml du tampon acétate et ajouter 0.2ml d'extrait T C A
- Transférer sur la colonne puis rincer le bêcher avec 30ml du tampon
- Laisser couler le liquide, rincer avec environ 100 ml de tampon acétate
- Eliminer les solutions de lavage
- Eluer l'histamine avec 20ml d'acide chlorhydrique 0.2N
- Recueillir l'éluant dans une fiole jaugée de 20ml

#### ❖ *Lecture de fluorescence:*

- Transférer 2ml de l'éluant dans un tube et ajouter dans l'ordre en agitant après chaque addition : 1ml de NaOH (1N) et 0.1ml d'ortho-phthalaldéhyde (1%)
- Après exactement 3.5 minutes, ajouter 2ml de HCl = 0.7N
- Effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions en remplaçant les 2ml de l'éluant par 2ml d'eau
- La mesure du signal de fluorescence est réalisée à la température ambiante aux longueurs d'onde d'émission et d'excitation respectives de 450 et 360 nm avec un Spéctrofluorimètre (type : RF-5301PC SHIMADZU) relié à un microordinateur piloté par le logiciel (SOFTWARE.Verssion :2.03). La cuvette employée est en Quartz et comprend 4 faces optiques.

### I.4 Expression des résultats

La teneur en histamine est calculée en appliquant l'équation suivante:

$$\text{Histamine (exprimé en mg /100 g)} = \frac{\text{F échantillon} - \text{F blanc}}{\text{F standard (20 mg /l)} - \text{F blanc}} * 18$$

$$\text{Q mg/100g de poisson} = (T/Z)*18$$

F : Intensité de fluorescence

T : Intensité de fluorescence de l'échantillon moins celle du blanc.

Z : Intensité de Fluorescence de l'étalon moins celle du blanc.

## II. Validation au moyen du profil d'exactitude

### II.1 Prévalidation

#### Objectif :

La méthode de dosage d'histamine repose sur une technique physicochimique délicate et d'incertitude élevée. Le but de cette validation est de vérifier si une méthode spectrofluorimétrie est acceptable comme méthode alternative et aussi si elle est capable de quantifier avec une exactitude connue la quantité d'histamine dans la chair de poisson.

#### Domaine d'application :

Le domaine d'application choisie est basé sur les points suivants :

- ✚ Matrice d'analyse : Boite de conserve à Sauce de tomate.
- ✚ Intervalle de dosage : Pour évaluer cet intervalle, le tableau 7 suivant montre les résultats obtenus sur deux intervalles de dosage:

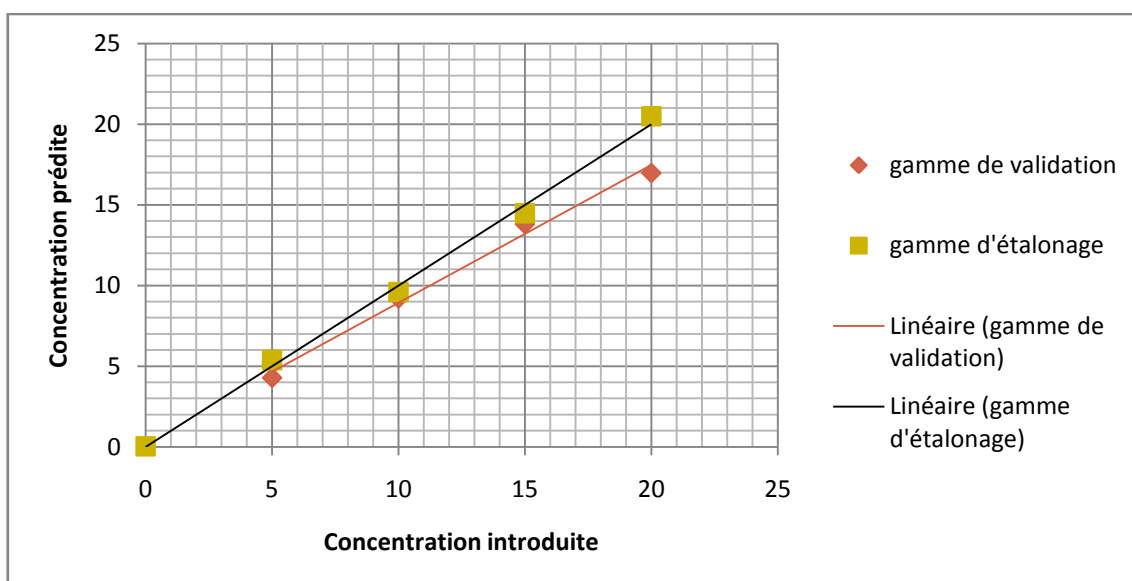
**Tableau 7 : Coefficients de détermination de deux intervalles de linéarité.**

| Intervalle de dosage (ppm)                        | 0 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 25 ; 30 | 0 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 |
|---------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| <b>Coefficient de détermination R<sup>2</sup></b> | <b>0,8892</b>                  | <b>0,9903</b>        |

La détermination de l'intervalle de linéarité dépend de la qualité de la régression statistique et évalué à partir du coefficient de détermination R<sup>2</sup> qui représente le pouvoir explicatif du modèle de régression retenu. D'après le tableau, on a choisi l'intervalle de 0 jusqu'à 20, car le Coefficient de détermination est plus proche de 1 et satisfait largement nos attentes.

#### ✚ Spécificité :

Dans notre cas on propose à représenter graphiquement l'effet du manque de la spécificité en utilisant la méthode des ajouts dosés.



**Figure 16 : données d'étalonnage et validation reportées sur le même graphique**

La figure 16 illustre, l'ensemble des données expérimentales, regroupées en 3 jours pour des niveaux de concentration. i) les solutions d'étalonnage (étalons) obtenues par mise en solution de l'histamine pure dans de TCA ; ii) les données de validation qui correspondent aux ajouts dosés dans la matrice de poisson.

Des droites de régression ont été ajustées aux données d'étalonnage pour illustrer la variabilité de la sensibilité de la méthode d'un jour à l'autre, d'où l'importance de conduire la validation sur plusieurs jours. Par ailleurs, on peut déjà voir un effet de matrice puisque les deux droites ne sont pas parallèles.

Alors il ya un manque de spécificité.

✚ Limites d'acceptation : Elles sont fixées à  $\pm 15\%$

## II.2 Plan d'expériences

La validation de cette méthode a été réalisée par l'approche d'erreur totale basée sur l'utilisation des  $\beta$  Expectation Tolérance Intervalle. Les solutions des standards d'étalonnage ont été analysé pendant trois jours déferents ( $p=3$ ), avec 4 niveaux de concentration ( $m=4$ ), chaque niveau étant répété 3fois ( $n=3$ ).

Etant donné qu'il n'existe pas de matériau de référence adapte à ce type de détermination, il a été décidé de faire des ajouts doses sur l'échantillon en utilisant les étalons (5 , 10 , 15 , 20ppm). Le même plan d'expérience de 36 essais a été utilis2 pour ces séries d'ajouts.

Les résultats trouvés sont donnés par les tableaux 9 et 10 suivants :

**Tableau 8 : Standard d'étalonnage**

| niveau | Concentration (ppm) | Réponse analytique |           |           |
|--------|---------------------|--------------------|-----------|-----------|
|        |                     | Série n°1          | Série n°2 | Série n°3 |
| Blanc  | 0                   | 0,0017             | 0,034     | 0,037     |
|        | 0                   | 0,006              | 0,011     | 0,022     |
|        | 0                   | 0,015              | 0,033     | 0,000     |
| 2      | 5                   | 0,951              | 0,917     | 0,905     |
|        | 5                   | 0,925              | 0,961     | 0,857     |
|        | 5                   | 0,916              | 0,928     | 0,927     |
| 3      | 10                  | 1,595              | 1,675     | 1,65      |
|        | 10                  | 1,622              | 1,59      | 1,688     |
|        | 10                  | 1,594              | 1,626     | 1,666     |
| 4      | 15                  | 2,518              | 2,454     | 2,437     |
|        | 15                  | 2,488              | 2,48      | 2,434     |
|        | 15                  | 2,449              | 2,445     | 2,436     |
| 5      | 20                  | 3,475              | 3,467     | 3,488     |
|        | 20                  | 3,423              | 3,498     | 3,491     |
|        | 20                  | 3,492              | 3,451     | 3,489     |

**Tableau 9 : Standard de validation**

| niveau                  | Concentration (ppm) | Réponse analytique |           |           |
|-------------------------|---------------------|--------------------|-----------|-----------|
|                         |                     | Série n°1          | Série n°2 | Série n°3 |
| sans ajout de l'analyte | 0                   | 0,497              | 0,488     | 0,481     |
|                         | 0                   | 0,533              | 0,493     | 0,491     |
|                         | 0                   | 0,478              | 0,498     | 0,490     |
| 1                       | 5                   | 1,23               | 1,254     | 1,26      |
|                         | 5                   | 1,232              | 1,22      | 1,22      |
|                         | 5                   | 1,222              | 1,129     | 1,196     |
| 2                       | 10                  | 2,071              | 2,055     | 2,025     |
|                         | 10                  | 2,102              | 2,009     | 1,987     |
|                         | 10                  | 2,065              | 2,057     | 2,078     |
| 3                       | 15                  | 2,856              | 2,857     | 2,83      |
|                         | 15                  | 2,838              | 2,83      | 2,808     |
|                         | 15                  | 2,811              | 2,818     | 2,814     |
| 4                       | 20                  | 3,343              | 3,37      | 3,369     |
|                         | 20                  | 3,378              | 3,372     | 3,316     |
|                         | 20                  | 3,393              | 3,362     | 3,383     |

### II.3 Fonction de réponse

Pour chaque jour (ou série), on calcule la fonction de réponse à partir des données du PE, en utilisant un même modèle théorique cité dans le tableau N°3. On obtient ainsi 4 modèles :

**Tableau 10 : Résultats statistiques des modèles générés**

| Modèle généré   | N° de Série | Intercepte ( $a_0$ ) | Coefficient ( $a_1$ ) | Coefficient ( $a_{11}$ ) | R <sup>2</sup> (%) |
|-----------------|-------------|----------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------|
| 0-MAX           | 1           | -----                | 0,1696                | -----                    | 0,9988             |
|                 | 2           | -----                | 0,1698                | -----                    | 0,9987             |
|                 | 3           | -----                | 0,1700                | -----                    | 0,9988             |
| Linéaire simple | 1           | 0,0049               | 0,1693                | -----                    | 0,9964             |
|                 | 2           | 0,0214               | 0,1683                | -----                    | 0,9964             |
|                 | 3           | 0,0061               | 0,1696                | -----                    | 0,9964             |
| Quadratique     | 1           | 0,0504               | 0,1511                | 0,0009                   | 0,9974             |
|                 | 2           | 0,0700               | 0,1489                | 0,0010                   | 0,9973             |
|                 | 3           | 0,0561               | 0,1496                | 0,0010                   | 0,9976             |
| racine          | 1           | 0,0731               | 0,3917                | -----                    | 0,9972             |
|                 | 2           | 0,1376               | 0,3743                | -----                    | 0,9958             |
|                 | 3           | 0,0968               | 0,3854                | -----                    | 0,9939             |

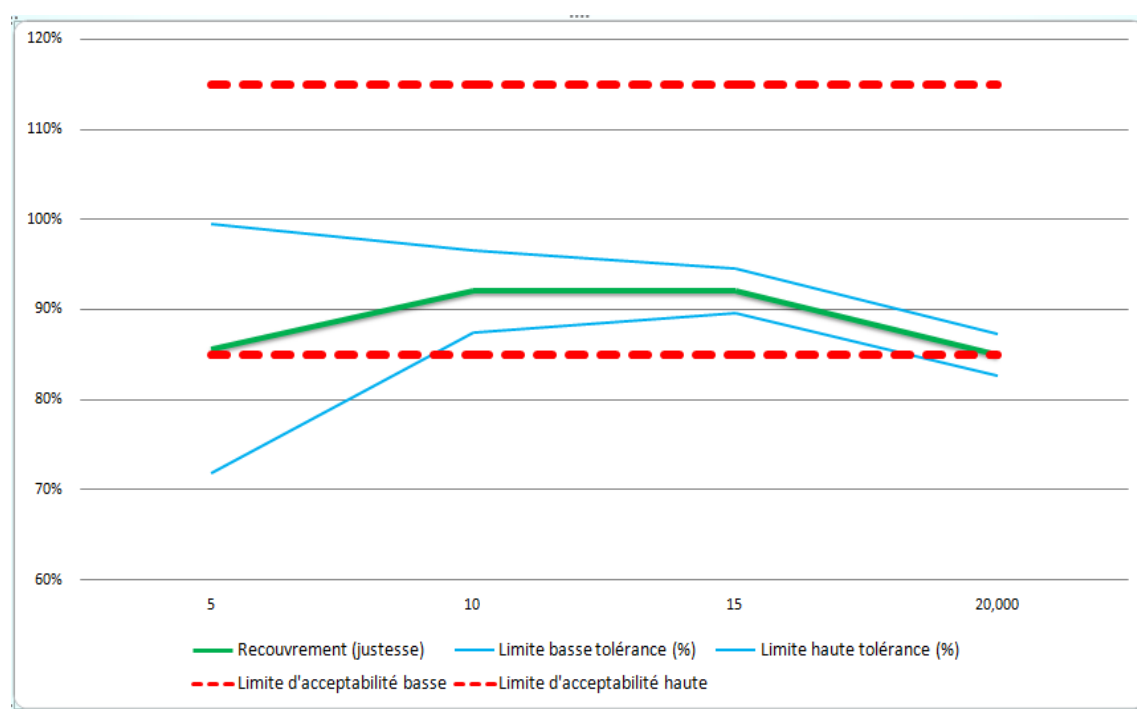
En utilisant différents modèles générés, une prédiction inverse sur les données de PV permet de calculer des concentrations retrouvées après la soustraction de celles retrouvées par le niveau sans ajout. Ces derniers servent à calculer les valeurs du biais relatives, les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire, ainsi que les paramètres nécessaires pour la construction du profil d'exactitude pour quatre niveaux de concentration (5, 10, 15 et 20 ppm).

Les profils d'exactitude construits en utilisant les 4 modèles générés sont donnés dans l'annexe n°1. L'examen de ces profils montre que le meilleur modèle est une droite de la forme :

$$Y = a_0 + a_1 X$$

Où Y est la réponse instrumentale et X la concentration. Pour cela nous avons choisi le modèle linéaire. Le choix est basé sur l'objectif de trouver des recouvrements par niveau, les plus proches possibles du 100%, avec un intervalle de tolérance le plus étroit et situé à l'intérieur des limites d'acceptabilité, pour avoir une méthode validée dans l'intervalle de concentration étudiée.

La figure 17 illustre son profil d'exactitude.



**Figure 17 : Profil d'exactitude de la méthode de dosage d'histamine dans la chair de poisson, obtenu par un modèle linéaire sans correction à  $\beta=95\%$   $\lambda=\pm 15\%$ .**

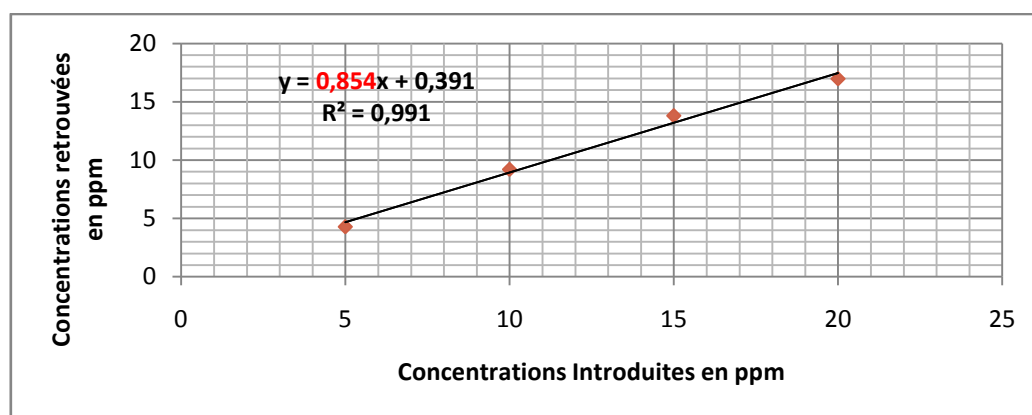
Sur ce graphe, on voit très facilement que l'intervalle de tolérance n'est pas compris entre les limites d'acceptation : la limite inférieure de l'intervalle de tolérance est sort légèrement de la limite d'acceptabilité (-15%) pour le niveau de concentration 5ppm. Ce petit décalage est du à l'effet de matrice qui a pour conséquence de réduire le signal observé lors des mesures sur les solutions de validation.

Pour cela on peut utiliser une méthode très classiquement appliquée pour les mesures physiques qui consiste à corriger les données à l'aide d'un facteur de correction.

Pour calculer ce facteur de correction, on reporte sur un graphique les deux variables concentration retrouvée, et concentration théorique ajoutée. La Figure 18 illustre le très bon ajustement linéaire de ces deux variables.

Les concentrations retrouvées sont strictement proportionnelles aux concentrations théoriques ajoutées et la droite qui les relie est égale à :  $[\text{Retrouvée}] = 0,854[\text{Ajoutée}] + 0,391$

La pente de cette droite représente le taux moyen de recouvrement et le facteur de correction proposé est égal à l'inverse de cette pente.



**Figure 18 :** Droite de régression entre les concentrations introduites et les concentrations en retour pour le modèle retenu (Linéaire Simple).

Donc le facteur de correction (FC) à appliquer est :  $FC = \frac{1}{\text{Pente}}$  (Eq .27)

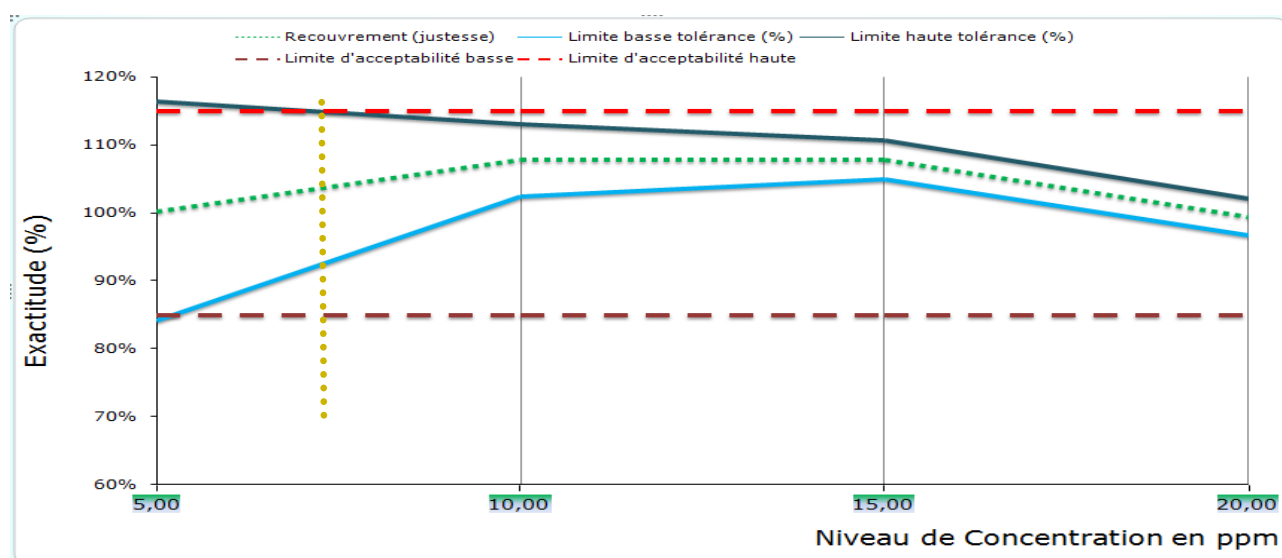
**Tableau 11 :** Valeurs de la pente et du facteur de correction FC

| PENTE | Facteur de Correction |
|-------|-----------------------|
| 0,854 | 1,171                 |

Comme ce facteur devra être appliqué systématiquement en routine, on a décidé de prendre la valeur approchée de 1,2 pour corriger les réponses obtenues sur les données de validation.

Un nouveau calcul du profil d'exactitude est réalisé en tenant compte du facteur de correction. La correction est effectuée sur les concentrations calculées en retour.

Le profil d'exactitude obtenue après la correction est donné par la figure N° 19.



**Figure 19 :** Profil d'exactitude obtenu par un modèle linéaire réalisé avec les données corrigées à partir des valeurs relatives par niveau ( $\beta=95\%$   $\lambda= \pm 15\%$ ).

Comme c'est déjà motionné, le domaine de validité est le domaine où les limites de tolérance (supérieure et basse) sont incluses dans les limites d'acceptabilités. Dans notre nouveau profil obtenu, l'intersection entre la valeur de la limite haute de tolérance et la limite haute d'acceptabilité (Limite de quantification) est située entre les deux niveaux 5ppm et 10 ppm. Donc :

- En dessus de cette intersection, la méthode en routine sera capable de produire en moyen 95 de résultats acceptables
- Au dessous de cette intersection on ne peut pas garantir que la méthode capable, en routine, de produire des résultats acceptables.

## II.4 Prédiction inverse

Le calcul des concentrations prédites inverses se fait à partir des données du PV pour 4 niveaux de concentration, en retranchant les concentrations trouvées pour le niveau sans ajout de chaque niveau de concentration .

En respectant le jour où les données de validation ont été collectées, alors on obtient finalement 4 niveaux de concentration prédites inverses.

Les concentrations prédites ou calculées, en utilisant le modèle linéaire ,sans et avec l'introduction du facteur de correction ,sont données dans le tableau 13 suivant :

**Tableau 12 : Concentrations prédites ou calculé, en utilisant le modél linéaire ,sans et avec l'introduction du facteur de correction**

| niveau | Concentration (ppm) | Concentrations calculées (ppm) |           |           | Concentrations Prédites Corrigées (ppm) |           |           |
|--------|---------------------|--------------------------------|-----------|-----------|-----------------------------------------|-----------|-----------|
|        |                     | Série n°1                      | Série n°2 | Série n°3 | Série n°1                               | Série n°2 | Série n°3 |
| 1      | 5                   | 4,3291                         | 4,5507    | 4,5939    | 5,0693                                  | 5,3287    | 5,3793    |
|        | 5                   | 4,1283                         | 4,3190    | 4,2990    | 4,8341                                  | 5,0574    | 5,0340    |
|        | 5                   | 4,3941                         | 3,7487    | 4,1634    | 5,1453                                  | 4,3895    | 4,8752    |
| 2      | 10                  | 9,2962                         | 9,3093    | 9,1052    | 10,8854                                 | 10,9008   | 10,6618   |
|        | 10                  | 9,2666                         | 9,0063    | 8,8221    | 10,8508                                 | 10,5460   | 10,3304   |
|        | 10                  | 9,3729                         | 9,2618    | 9,3647    | 10,9753                                 | 10,8451   | 10,9657   |
| 3      | 15                  | 13,9324                        | 14,0738   | 13,8524   | 16,3143                                 | 16,4799   | 16,2206   |
|        | 15                  | 13,6135                        | 13,8837   | 13,6637   | 15,9409                                 | 16,2573   | 15,9997   |
|        | 15                  | 13,7789                        | 13,7827   | 13,7050   | 16,1345                                 | 16,1390   | 16,0480   |
| 4      | 20                  | 16,8087                        | 17,1215   | 17,0310   | 19,6823                                 | 20,0486   | 19,9426   |
|        | 20                  | 16,8028                        | 17,1036   | 16,6595   | 19,6754                                 | 20,0277   | 19,5076   |
|        | 20                  | 17,2162                        | 17,0145   | 17,0605   | 20,1595                                 | 19,9233   | 19,9771   |

Ces données seront à calculer les critères de validation.

## II.5 Calcul de la justesse

A partir des concentrations prédites inverses et pour chaque niveau d'ajout, en calculant la concentration moyenne retrouvée et le biais en lui soustrayant la concentration theorique de l'ajout. Puis, en calculant le taux de recouvrement en % Comme le montre le tableaux suivant :

**Tableau 13 : Critères de la justesse**

| Niveaux                              | Niveau 1 | Niveau 2 | Niveau 3 | Niveau 4 |
|--------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Valeur cible                         | 5        | 10       | 15       | 20       |
| Moyenne des concentrations calculées | 5,0125   | 10,7735  | 16,1705  | 19,8827  |
| Biais %                              | 0,25     | 7,73     | 7,80     | -0,59    |
| Recouvrement (justesse) %            | 100,2504 | 107,7349 | 107,8031 | 99,4133  |

D'après ces résultats, il apparaît que la justesse varie avec la concentration. Le taux de recouvrement qui traduit cette justesse est d'environ 107 % aux basses concentrations pour être proche de 99 % aux concentrations élevées.

## II.6 Calcul de la fidélité

La méthode de calcul des critères de fidélité et les limites des intervalles de tolérance est décrite précédemment. Le tableau récapitulatif suivant rassemble les valeurs trouvées.

**Tableau 14 : Tableau récapitulatif des critères de fidélité pour les quatre niveaux de concentration**

| Concentration introduite | Concentration prédite corrigée | Ecart type de répétabilité S rép | Ecart type de fidélité intermédiaire Sfi | Coefficient de variation de FI CVfi% | Coefficient de variation de répétabilité CVr% |
|--------------------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 5                        | 5,0125                         | 0,3298                           | 0,3298                                   | 6,5798                               | 6,57983992                                    |
| 10                       | 10,7735                        | 0,2172                           | 0,2175                                   | 2,0186                               | 2,01585298                                    |
| 15                       | 16,1705                        | 0,1616                           | 0,1700                                   | 1,0514                               | 0,99927834                                    |
| 20                       | 19,8827                        | 0,2236                           | 0,2236                                   | 1,1247                               | 1,12466524                                    |

D'après le tableau 15, on constate que :

- ☒ le coefficient de variation de fidélité intermédiaire qui reflète la fidélité inter-jour ne dépasse pas 2,02%. (Sauf le premier niveau).
- ☒ l'écart-type de fidélité dépend largement du niveau de concentration, il doit toujours être relié à la concentration où il a été estimé.

Mais, pour l'instant on ne peut pas juger sur les valeurs individuelles trouvées pour chaque critère, car, par principe, le profil d'exactitude va combiner la fidélité et la justesse et permettre un diagnostic global qui interviendra plus loin.

## II.7 Calcul des intervalles de tolérance

Le calcul se fait à partir des données des critères de fidélité et de justesse par niveau, indépendamment pour chaque niveau de concentration. Le tableau 16 présente un récapitulatif des critères d'exactitude pour les 4 niveaux de concentration.

**Tableau 15 : Récapitulatif des critères d'exactitude pour les quatre niveaux de concentration**

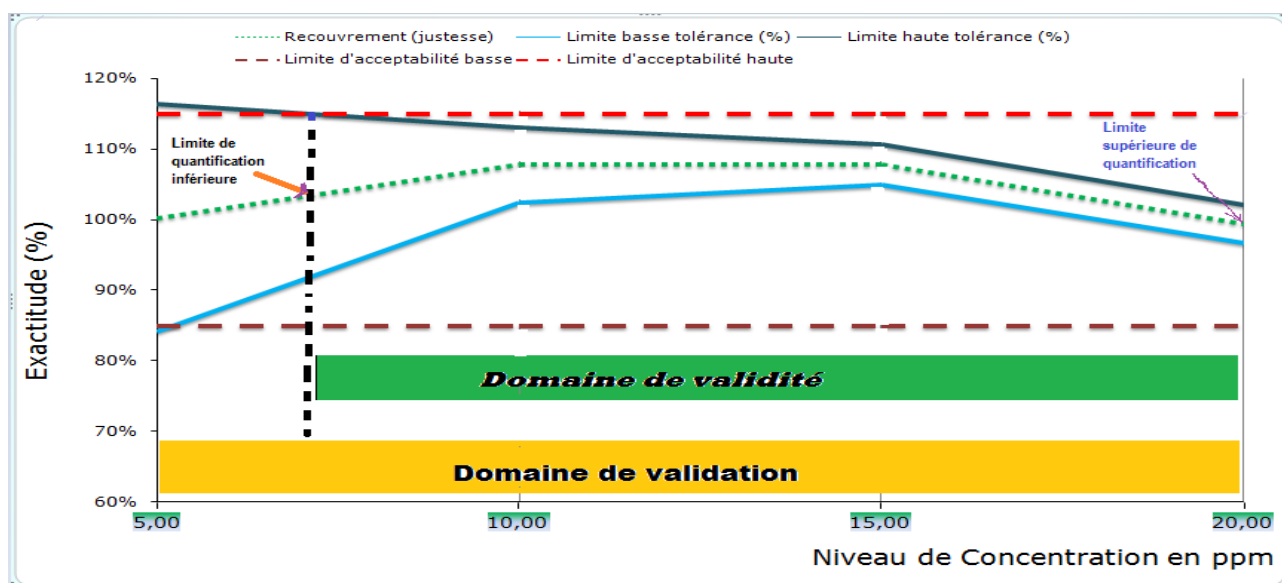
| <b>Profil d'exactitude</b>                           |                 |                 |                 |                 |
|------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>Probabilité tolérance (bêta)%</b>                 | 95              |                 |                 |                 |
| <b>Limite d'acceptabilité %</b>                      | 15              |                 |                 |                 |
| <b>Niveaux</b>                                       | <b>Niveau A</b> | <b>Niveau B</b> | <b>Niveau C</b> | <b>Niveau D</b> |
| <b>Valeur cible</b>                                  | 5               | 10              | 15              | 20              |
| <b>Moyenne niveau</b>                                | 5,01            | 10,77           | 16,17           | 19,88           |
| <b>Ecart-type de répétabilité (<math>S_r</math>)</b> | 0,33            | 0,22            | 0,16            | 0,22            |
| <b>Ecart-type inter-séries (<math>S_L</math>)</b>    | 0,00            | 0,01            | 0,05            | 0,00            |
| <b>Ecart-type de fidélité (<math>S_{fi}</math>)</b>  | 0,33            | 0,22            | 0,17            | 0,22            |
| <b>Rapport des variances (R)</b>                     | 0,00            | 0,00            | 0,11            | 0,00            |
| <b>Coefficient intermédiaire</b>                     | 1,05            | 1,05            | 1,06            | 1,05            |
| <b>Nombre de degrés liberté</b>                      | 7,71            | 7,70            | 7,16            | 7,71            |
| <b>Valeur basse tolérance</b>                        | 4,21            | 10,24           | 15,74           | 19,34           |
| <b>Valeur haute tolérance</b>                        | 5,82            | 11,31           | 16,60           | 20,43           |
| <b>Biais (%)</b>                                     | 0,25            | 7,73            | 7,80            | -0,59           |
| <b>Recouvrement (justesse)</b>                       | 100,25          | 107,73          | 107,80          | 99,41           |
| <b>Limite basse tolérance (%)</b>                    | 84,10           | 102,41          | 104,96          | 96,68           |
| <b>Limite haute tolérance (%)</b>                    | 116,40          | 113,06          | 110,64          | 102,15          |
| <b>Limite d'acceptabilité basse</b>                  | 85,00           | 85,00           | 85,00           | 85,00           |
| <b>Limite d'acceptabilité haute</b>                  | 115,00          | 115,00          | 115,00          | 115,00          |

Pour une concentration de référence égale à 5ppm ,95% des futures mesures se situent entre 4,21 et 5,82 ppm; cet intervalle est dissymétrique car la méthode présente un biais de justesse de 0,25%. Si on passe en valeurs relatives, on obtient les limites de tolérance 84,1% et 116,4%. Or les limites d'acceptabilité sont entre 85% et 115%. La méthode n'est pas capable de produire au moins 95% de futures mesures entre les limites d'acceptabilité à ce niveau de concentration. Elle n'est donc pas validée aux basses concentrations. Par contre, elle est validée pour les niveaux 2, 3 et 4.

## II.8 Calcul de la limite de quantification

Sur la figure 20, il existe une concentration en dessous de laquelle au moins une des bornes de l'intervalle de tolérance sort des limites d'acceptabilité. Au-dessus de cette concentration, l'analyste peut garantir que la méthode quantifiera de façon acceptable les échantillons reçus. Assez naturellement, on peut proposer de désigner cette limite de concentration la plus basse comme la limite de quantification (LQ) de la méthode. Si on se réfère à la figure 20 et au tableau 16 récapitulatif des calculs, la LQ se situerait entre le niveau 1 et 2.

La LQ peut être obtenue exactement si on connaît l'abscisse de ce point d'intersection entre la limite de tolérance et la limite d'acceptabilité.



**Figure 20 :** Profil d'exactitude établi après l'introduction du facteur de correction sur les résultats de mesures, avec un intervalle de tolérance à 95 % et un intervalle d'acceptabilité à 15 %.

La LQ est le point d'intersection entre des droites qui sont respectivement la limite supérieure de l'intervalle de tolérance et la limite supérieure d'acceptabilité. L'égalité entre les équations des deux droites donne la LQ. Le tableau 17 résume le calcul des pentes et ordonné à l'origine des deux droites.

**Tableau 16 :** Indices en ppm de la droite d'intervalle de tolérance et limite d'acceptation par niveau

| N° Niveau               | 1    | 2      |
|-------------------------|------|--------|
| Concentration en ppm    | 5    | 10     |
| Intervalle de tolérance | 5,82 | 11,306 |
| Limite d'acceptation    | 5,75 | 11,5   |

Les calculs sont réalisés sur les valeurs absolues telles qu'elles sont représentées dans le tableau 17.

D'après ces résultats on calcule les droites de limite d'acceptation et l'intervalle de tolérance.

**Tableau 17 : Droite d'intervalle de tolérance et de limite d'acceptation**

| Droite de               | Pente  | Ordonné à l'origine |
|-------------------------|--------|---------------------|
| Intervalle de tolérance | 1,0972 | 0,334               |
| Limite d'acceptation    | 1,15   | 0                   |

Selon l'équation 21 on trouve :

$$LQ = \frac{(0-0,334)}{1,0972-1,15} = 6,3257 \text{ ppm}$$

On trouve que la LQ vaut finalement 6,32 ppm. Donc on peut alors dire que le domaine validé s'étend entre 6,326 et 20 ppm.

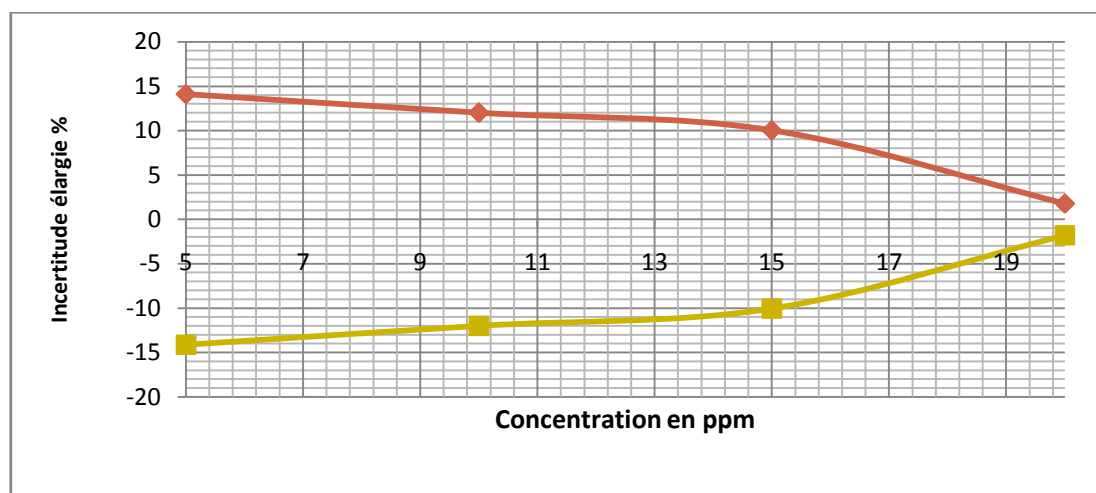
### III. Estimation de l'incertitude

On peut calculer l'incertitude élargie soit directement soit de façon relative en la ramenant à la valeur de référence. Le tableau 18 rassemble les résultats obtenues en utilisant les équations : (Eq.24), (Eq.25) et (Eq.26) pour chaque niveau de concentration, ces résultats montrent que l'incertitude élargie relative varie entre 2% et 5% pour les 3 derniers niveaux, par contre elle est 13,87% pour le premier niveau.

**Tableau 18 : Calcul de l'incertitude type et de l'incertitude élargie pour chaque niveau de concentration**

| niveau de concentration | concentration introduite (mg/l) | incertitude type | incertitude élargie | incertitude élargie(%) |
|-------------------------|---------------------------------|------------------|---------------------|------------------------|
| 1                       | 5                               | 0,3476           | 0,69531             | 13,87                  |
| 2                       | 10                              | 0,2293           | 0,45858             | 4,26                   |
| 3                       | 15                              | 0,18094          | 0,361887            | 2,24                   |
| 4                       | 20                              | 0,2357           | 0,471418            | 2,37                   |

Ces résultats montrent que les valeurs relatives de l'incertitude élargie ne dépassent pas 5% à l'exception du premier niveau de concentration ( $U=13,87\%$ ) ; résultat qui illustre bien l'idée que, qu'à proximité de la LQ, pour les concentrations les plus basses, l'analyste ne peut plus vraiment garantir l'acceptabilité de ces résultats. On peut aussi visualiser l'incertitude en construisant un profil d'incertitude comme celui de la figure 21.



**Figure 21 : Profil d'incertitude illustrant l'incertitude élargie de la méthode en fonction de la concentration**

Comme le montre la figure 21, l'incertitude de la méthode varie en fonction de la concentration, on voit que dans le domaine de validité de la méthode (entre  $\approx 7$  et 20 ppm), elle est minimale pour le niveau de concentration 15 ppm et maximale pour le niveau 10ppm, mais généralement ne dépasse pas 5%.

### Conclusion :

Le domaine de validité de la méthode s'attient entre 6,32 et 20ppm. Alors dans cet Interval la méthode est capable de produire au moins 95% de futures mesures entre les limites d'acceptabilité. Elle n'est donc pas validée aux basses concentrations. Par contre, elle est validée pour les niveaux 2, 3 et 4.

Les valeurs relatives de l'incertitude élargie ne dépassent pas 5% dans le domaine de validité de la méthode.

## CONCLUSION GENERALE

La méthodologie globale du profil d'exactitude appliquée pour valider la méthode Spectrofluorimétrique de dosage de l'histamine dans la chaire de poisson est mieux adaptée aux enjeux de la validation, à savoir la satisfaction des besoins des services demandeurs tout en contrôlant le risque de laboratoire. Elle permet de décider la validité de la méthode seulement à partir d'une illustration graphique sans qu'aucun test d'hypothèse ne soit effectué. Et elle permet non seulement de simplifier l'approche de validation d'une procédure mais aussi l'estimation de l'incertitude de mesure sur la base des données de validation.

Alors le profil d'exactitude peut être considéré comme un outil de décision pour accepter ou rejeter une méthode selon son usage prévu.

Dans notre travail, une méthode de dosage de l'histamine a l'objet de validation analytique par l'approche du profil d'exactitude. En premier lieu, nous avons pu démontrer la non spécificité de la méthode et déterminer l'intervalle de linéarité qui s'étend entre 5 et 20mg/l. Après nous avons effectué un plan d'étalonnage pour générer plusieurs modèle d'étalonnage de chaque série (le jour) qui permet de relier la réponse analytique (Fluorescence) à la concentration introduite. Le modèle retenu est le modèle linéaire simple qui donne des résultats très satisfaisants.

En deuxième lieu, l'établissement des deux intervalles de tolérance basse et haute en utilisant les paramètres statistiques telles que le biais relatif et le coefficient de variation de la fidélité intermédiaire pour une attente d'une proportion de 95% des résultats futurs soit comprise entre les limites d'acceptation de  $\pm 15\%$ , nous a permis de construire le profil d'exactitude.

Le profil d'exactitude construit à l'issue de ce travail caractérisant la méthode de dosage d'histamine, est validé dans un intervalle de concentration allant de la limite inférieure de quantification, estimée égale à 6, 3257 ppm, vers la limite supérieure de quantification égale à 20 ppm. Dans cet intervalle l'analyste peut garantir que la méthode quantifiera de façon acceptable les échantillons reçus.

Dans le même contexte, nous avons calculé l'incertitude de la méthode. La valeur de l'incertitude calculée se trouve incluse dans la limite d'acceptation  $\pm 5\%$ . Ce qui nous permet de déclarer que cette méthode peut être utilisée dans le contrôle de qualité de routine.

Enfin, nous estimons que le fait de rassembler la validation et l'incertitude dans la même approche permet à l'analyste de contrôler le risque d'utiliser cette méthode d'analyse en routine et d'avoir une information complète sur ses performances.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### SITES WEBS :

[1] : <http://www.inrh.ma/fr/centre-specialise-de-valorisation-et-de-technologies-des-produits-de-la-mer-agadir>(Visité le 17/03/2016).

[2] : <http://www.bibliomer.com> (Visité le 18/03/2016).

[4] : <http://wwz.ifremer.fr/> (IFREMER, 2008).

### Références divers

[3] : Fiche de description de dangers transmissibles par les aliments: Histamine

[5] : Moussa DIATTA: Mémoire de diplôme de master en Qualité des Aliments de l'Homme Spécialité: Denrées Alimentaires d'origine Animale Présenté et soutenu publiquement le 11 Août 2012 à l'EISMV de Dakar.

[6] : Circulation du ministre de la santé N°49 DMP/00 du 16Juillet 2003, modifiant complètement la circulation N°48 DMP/00 du 10 Décembre 1998 relative à la procédure de demande d'obtention de l'autorisation de débit d'une spécialité pharmaceutique en pharmacie d'officine ou l'hôpital.

[7] :Max FEINBERG, Validation interne des méthodes d'analyse, p 224, techniques d'ingénieurs 2009.

[8]: International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Metthodology, 2005.

[9] : Ph. Hubert, M. Feinberg et all; validation of quantitative analytical procedures, Harmonization of approaches Part I. STP Pharma Pratiques 2003. 101-138.

[10] : Christian Ducauze, Arlette Baillet-Guffroy et Thanh X. Bui (page2) ‘‘Choix et validation d'une méthode d'analyse ‘’.2003

[11] : ICH harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: methodology Q2B. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceutical for human use; 6 novembre 1996.

[12] : Bouchaib IHSSANE : Article (Intitulé: Uncertainty Profile: a new global strategy for the analytical validation and the estimation of measurement uncertainty) January 2013 Université Sidi Mohamed Ben Abdellah

[13] : "Abderrahim BOUABIDI"Thèse Etude Critique des Différentes Approches de Validation des Méthodes Analytiques, mai 2013 université de Liège – Faculté de Médecine et l'Université Hassan II Mohammedia – Faculté des sciences Ben M'sik.

[14] : Max FEINBERG : SPECTRA ANALYSE n° 249 • Avril - mai 2006 (Article intitulé : Approche globale et harmonisée de la validation) Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) – 16, rue Claude Bernard - 75231 Paris.

[15] : Thèse ‘‘ Evaluation des différentes approches pour l'estimation de l'incertitude des mesures analytiques’’ ROLAND MARINI DJANG'EING'A Année académique : 2005-2006, université de Liège, Faculté de médecine –Unité de recherche de chimie bio-analytique service de chimie analytique.

## ANNEXE N°1

| Nature du model                             | Profil d'exactitudes des données avant la correction | Profil d'exactitudes des données après la correction |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Droite passant par l'origine</b>         |                                                      |                                                      |
| <b>Droite linéaire</b>                      |                                                      |                                                      |
| <b>Transformation mathématique (racine)</b> |                                                      |                                                      |
| <b>Fonction quadratique</b>                 |                                                      |                                                      |