
**Qualité de l'eau et du sol —
Recommandations et exigences
relatives à la conception d'un essai
interlaboratoires pour la validation
des essais biologiques**

*Soil and water quality — Guidance and requirements for designing an
interlaboratory trial for validation of biotests*

iTeh STANDARDS
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 5594:2022](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2c388726-cc52-41a5-a67c-3c2c1237fca0/iso-ts-5594-2022)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2c388726-cc52-41a5-a67c-3c2c1237fca0/iso-ts-5594-2022>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TS 5594:2022

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2c388726-cc52-41a5-a67c-3c2c1237fca0/iso-ts-5594-2022>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2022

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	3
5 Exigences, conception et organisation de la ou des campagnes d'essais de validation de la méthode	4
5.1 Généralités	4
5.2 Prévalidation — Exigences minimales relatives aux performances de la méthode d'essai	5
5.3 Première étape de validation — Démonstration de l'état de préparation des laboratoires participants en vue des essais	5
5.4 Deuxième étape de validation — Démonstration de l'aptitude du laboratoire et de la transférabilité de l'essai biologique	5
5.5 Troisième étape de validation — Validation de la méthode	6
5.5.1 Généralités	6
5.5.2 Laboratoires participants	6
5.5.3 Échantillons	7
5.5.4 Plan d'expérimentation	7
5.5.5 Informations à fournir aux participants	8
5.5.6 Analyse de données et évaluation statistique des essais interlaboratoires	8
6 Évaluation	9
7 Documentation et rapport	10
Annexe A (informative) Détermination de l'exactitude (justesse et fidélité) lorsque les résultats des essais d'écotoxicité sont exprimés en descripteurs de toxicité	11
Annexe B (informative) Estimation de l'écart-type de répétabilité	16
Annexe C (informative) Calcul et rapport d'incertitude de s_R	18
Annexe D (informative) Schéma de validation	20
Annexe E (informative) Questionnaire (exemple)	21
Annexe F (informative) Caractéristiques spécifiques des essais biologiques terrestres recommandés par les laboratoires de référence	23
Annexe G (informative) Caractéristiques spécifiques des essais biologiques aquatiques recommandés par les laboratoires de référence	27
Annexe H (informative) Résumé des essais interlaboratoires réalisés dans le cadre de la validation d'essais biologiques terrestres	29
Annexe I (informative) Résumé des essais interlaboratoires réalisés dans le cadre de la validation d'essais biologiques aquatiques	33
Bibliographie	39

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 190 *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Caractérisation biologique*, en collaboration avec le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Introduction

La validation d'une norme ISO relative à des essais biologiques a pour but d'estimer l'incertitude des résultats au moyen d'un essai interlaboratoires. Ce programme de validation comporte généralement trois étapes majeures.

- a) Démonstration de l'état de préparation en vue des essais: cette première étape donne au laboratoire de référence l'occasion de s'assurer que l'instrumentation recommandée est en place et que les organismes d'essai et les cultures cellulaires ont été établis en utilisant des mesures de performance afin de garantir l'utilisation de cultures ou d'organismes sains lors des essais. Ces conditions sont généralement spécifiées dans l'article ou le paragraphe intitulé «Organismes d'essai» ou «Matériaux d'essai» dans une norme ISO.
- b) Démonstration de l'aptitude du laboratoire et de la transférabilité de l'essai biologique: au cours de cette deuxième étape, les laboratoires participants ont pour but d'atteindre les performances dans les conditions contrôlées pendant cette campagne d'essais interlaboratoires préliminaires, en ajoutant un composé de référence à une matrice solide ou à un milieu liquide, selon la méthode d'essai biologique à valider. La capacité de mise en œuvre de la norme d'essai est démontrée lorsque les critères de validité (par exemple la variabilité des témoins exprimée par le coefficient de variation du nombre de jeunes dans le cadre d'un essai de reproduction) et qualifie le laboratoire pour la dernière étape de validation de la méthode.
- c) Validation de la méthode: la troisième étape n'implique que les laboratoires qui ont démontré leur expertise à mettre en œuvre la norme ISO en cours d'élaboration (étape b). En cas de validation d'une méthode d'essai écotoxicologique ou microbiologique, une ou deux campagnes d'essais interlaboratoires de validation d'une méthode utilisant un ou plusieurs échantillons environnementaux sont menées, et les résultats de chaque campagne servent à calculer la variabilité intralaboratoire et interlaboratoires de la norme d'essai ISO afin de démontrer la fidélité de la méthode ([Annexe A](#)). Si la répétition des campagnes d'essais biologiques est possible, la répétabilité est déterminée. Pour la validation des méthodes écotoxicologiques, il peut s'avérer utile d'évaluer l'exactitude de l'effet mesuré – la justesse de mesure. Cela prévaut en particulier pour les méthodes dont les résultats sont rapportés sous forme de mesurage quantitatif tel qu'une concentration biologique équivalente. Les résultats obtenus servent à confirmer ou ajuster les critères de validité.

Pour l'étude de validation, il convient de choisir des échantillons représentatifs en fonction du domaine d'application prévu de la norme (par exemple sols contaminés, sols amendés, sols après remédiation, déchets, eaux usées, éluats, eaux de surface, eaux souterraines, sédiments et échantillons extraits).

L'[Annexe D](#) fournit un schéma global du processus de validation.

Qualité de l'eau et du sol — Recommandations et exigences relatives à la conception d'un essai interlaboratoires pour la validation des essais biologiques

1 Domaine d'application

Le présent document a pour but de faciliter la conception et l'organisation des essais de validation d'essais biologiques. Il décrit les activités de validation au cours des différentes étapes du processus de normalisation et comprend l'évaluation globale des données et la conclusion qui découle de l'étude de validation.

Le présent document est destiné à la validation d'essais biologiques dont le plan d'expérimentation et les critères d'effet peuvent différer. Il se peut que certaines exigences du présent document ne soient pas applicables à toutes les méthodes d'essai.

2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <https://www.electropedia.org/>

3.1

témoin

matériau et/ou matrice qui reproduit tous les facteurs susceptibles d'avoir un impact sur les résultats, à l'exception de la condition spécifique ou du traitement étudié

Note 1 à l'article: Dans les essais de toxicité, il convient que le témoin soit soumis à la totalité des conditions rencontrées lors de l'exposition au traitement, mais sans le produit toxique.

[SOURCE: Environment Canada 2005]

3.2

critère d'effet

seuil de toxicité déterminé par voie statistique (CE50, par exemple)

[SOURCE: Environment Canada 2005, modifié — La recommandation de ne pas utiliser ce terme pour des variables observées, telle que la taille, a été supprimée]

3.3

laboratoire de référence

laboratoire en charge de l'organisation de l'étude de validation interlaboratoires

3.4 justesse de mesure

justesse

étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence

Note 1 à l'article: L'exigence d'un nombre infini de mesures répétées a un fondement théorique. Dans la pratique, une grande série de résultats d'essai sert à estimer la justesse de mesure.

[SOURCE: Guide ISO/IEC 99:2007, 2.14, modifié — Les Notes à l'article ont été remplacées]

3.5 caractéristiques de performance

mesurages de la performance d'un essai dans des conditions particulières, y compris sa fiabilité et son exactitude

Note 1 à l'article: Les caractéristiques de performance donnent une indication de l'utilité, des limites et de la pertinence de l'essai.

[SOURCE: OCDE 2005]

3.6 fidélité

étroitesse de l'accord entre les indications ou les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées

Note 1 à l'article: La fidélité est en général exprimée numériquement par des caractéristiques, telles que l'écart-type, la variance ou le coefficient de variation dans les conditions spécifiées.

Note 2 à l'article: Les conditions spécifiées peuvent être, par exemple, des *conditions de répétabilité* (3.10), des conditions de fidélité intermédiaire ou des *conditions de reproductibilité* (3.12) (voir l'ISO 5725-1).

Note 3 à l'article: La fidélité sert à définir la *répétabilité* (3.9) de mesure, la fidélité intermédiaire de mesure et la *reproductibilité* (3.11) de mesure.

Note 4 à l'article: Le terme «fidélité de mesure» est quelquefois utilisé improprement pour désigner l'exactitude de mesure.

[SOURCE: JCGM 200:2012]

3.7 prévalidation

phase(s) initiale(s) d'une étude de validation

Note 1 à l'article: Cette étude à petite échelle vise à obtenir des informations préliminaires sur la pertinence et la fiabilité d'une méthode d'essai. Sur la base des résultats de cette étude, il est ensuite permis de modifier ou d'optimiser le protocole de la méthode d'essai afin de réduire la variabilité intralaboratoire et/ou interlaboratoires et d'augmenter l'exactitude des études de validation ultérieures. Si elles sont disponibles, les données de la littérature peuvent être utilisées à cet effet.

[SOURCE: OCDE:2005, modifié — Les raisons de la réalisation d'une prévalidation ne sont pas précisées]

3.8 composé de référence

produit chimique pour lequel la réponse de l'organisme d'essai est connue

3.9 répétabilité

fidélité (3.6) de mesure selon un ensemble de *conditions de répétabilité* (3.10)

[SOURCE: JCGM 200:2012]

3.10**condition de répétabilité**

condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure de mesure, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps

Note 1 à l'article: Une condition de mesurage n'est une condition de répétabilité que par rapport à un ensemble donné de conditions de répétabilité.

[SOURCE: JCGM 200:2012]

3.11**reproductibilité**

fidélité (3.6) de mesure selon un ensemble de *conditions de reproductibilité* (3.12)

Note 1 à l'article: Des termes statistiques pertinents sont donnés dans l'ISO 5725-1 et l'ISO 5725-2.

3.12**condition de reproductibilité**

condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent des lieux, des opérateurs et des systèmes de mesure différents, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires

Note 1 à l'article: Les différents systèmes de mesure peuvent utiliser des procédures de mesure différentes.

Note 2 à l'article: Il convient qu'une spécification relative aux conditions contienne, dans la mesure du possible, les conditions que l'on fait varier et celles qui restent inchangées.

[SOURCE: JCGM 200:2012]

3.13**essai de validation interlaboratoires d'une méthode**

étude de validation interlaboratoires au cours de laquelle tous les laboratoires réalisent le même essai biologique en utilisant le même matériau en essai et le même protocole d'essai

Note 1 à l'article: L'essai a pour objectif de déterminer la variabilité interlaboratoires et, dans la mesure du possible, intralaboratoire.

3.14**transférabilité**

capacité des laboratoires compétents et indépendants à mettre en œuvre une procédure d'essai de manière précise et fiable

[SOURCE: OCDE:2005]

4 Principe

La validation d'une méthode d'essai proposée est obtenue par la démonstration de coefficients de variation intralaboratoire et interlaboratoires raisonnables qui ont participé aux campagnes d'essais de validation formelle de la méthode (c'est-à-dire à la troisième étape de validation, 5.5). Il convient, de préférence, de déterminer la répétabilité. Cependant, la durée ou la charge de travail de la méthode d'essai empêche parfois la répétition de l'analyse par des laboratoires individuels. En cas d'absence de données expérimentales obtenues dans des conditions de répétabilité, il est proposé d'estimer la répétabilité à partir des limites de confiance du descripteur de toxicité qui intègre la variabilité des mesurages répétés de la variable biologique dans chaque traitement/dilution (voir référence [67]). Le cas échéant, la justesse de mesure de la méthode peut être déterminée en accord avec la validation de la méthode, en particulier pour les méthodes dont les résultats sont rapportés en concentrations biologiques équivalentes (CBE) (voir l'ISO 23196). La décision finale d'inclure la justesse de mesure dans l'essai interlaboratoires de validation de la méthode doit être prise par le laboratoire de référence, après consultation des autres experts impliqués dans l'élaboration de la méthode.

5 Exigences, conception et organisation de la ou des campagnes d'essais de validation de la méthode

5.1 Généralités

Une condition préalable à la réalisation d'un essai interlaboratoires est que le développement de la méthode soit achevé. Comme l'objectif de ce type de comparaison interlaboratoires est d'évaluer les caractéristiques de performance d'un essai biologique, les aspects techniques sont définis dans une procédure d'essai de validation interlaboratoires de la méthode, préparée par le laboratoire de référence et unique à chaque campagne d'essais interlaboratoires. Les caractéristiques spécifiques dont l'examen est recommandé aux laboratoires de référence sont respectivement résumées dans les [Annexes F](#) et [G](#) pour les essais terrestres et aquatiques, respectivement.

Il convient qu'un laboratoire de référence soit en mesure de démontrer son niveau de compétence en matière de planification et de réalisation de l'essai de validation interlaboratoires de la méthode. Par exemple, le laboratoire qui propose de diriger le processus de validation peut indiquer les années d'expérience du personnel participant à la réalisation des essais de toxicologie environnementale ou de microbiologie (par exemple plus de 10 ans d'expérience); apporter la preuve d'une qualité de service reconnue par le biais d'un programme de certification ou d'accréditation; fournir la preuve qu'il dispose d'un dossier de suivi de la planification et de la réalisation d'études d'essais multilaboratoires; démontrer par écrit que son personnel comprend clairement toutes les étapes dont le laboratoire serait en charge pour mener un programme de validation interlaboratoires; manifester clairement sa volonté de fournir les matériaux nécessaires pour la culture ou le maintien et l'acclimatation des organismes requis pour la mise en œuvre de la nouvelle norme d'essai biologique avant et pendant la campagne d'essais de validation complète; ou indiquer sa volonté d'assurer une formation à distance ou sur site afin d'aider les laboratoires participants aux étapes préliminaires nécessaires pour démontrer leur état de préparation pour la mise en œuvre de la nouvelle procédure d'essai. Des suggestions spécifiques et des détails supplémentaires concernant les étapes et l'aptitude d'un laboratoire de référence et de son personnel sont décrits dans l'ISO 17043.

Dans le cadre de l'essai de validation interlaboratoires de la méthode, il convient que le laboratoire de référence:

- soit responsable de l'organisation et de l'exécution des trois étapes de validation ([5.3](#), [5.4](#), [5.5](#)) ou des campagnes d'essais interlaboratoires;
- prépare une procédure d'essai de validation interlaboratoires de la méthode pour chaque campagne d'essais, en définissant tous les aspects techniques de l'exécution de l'essai biologique;
- fournisse aux participants les instructions nécessaires, les échantillons pour essai (par exemple sols pollués, sols amendés, sols après remédiation, déchets, eaux usées, éluats, eaux de surface, eaux souterraines, sédiments et échantillons extraits) et les matériaux sélectionnés par le laboratoire de référence, pour chaque campagne d'essais;
- soit en charge de l'analyse et du compte-rendu des résultats de chaque campagne d'essais;
- soit chargé de demander aux laboratoires participants un retour d'information sur la procédure d'essai de validation interlaboratoires de la méthode proposée, avant chaque campagne d'essais, en organisant une télé- ou visio-conférence ou par un échange de courrier électronique.

Un exemple des différents rôles du personnel impliqué dans l'organisation de l'essai de validation interlaboratoires de la méthode est donné dans l'ISO 5725-2:2019, Article 6.

Sauf spécification contraire du laboratoire de référence, il est fortement recommandé de transférer tous les résultats ainsi que tous les mesurages des paramètres des conditions d'essai, juste après la fin des essais pour chaque campagne spécifique.

5.2 Prévalidation — Exigences minimales relatives aux performances de la méthode d'essai

Il convient que la première étape de validation de la méthode repose sur une évaluation minutieuse de la littérature scientifique évaluée par les pairs et d'autres rapports et publications pertinents et crédibles fournissant des informations sur les performances de la méthode d'essai. Il est recommandé d'axer cette revue documentaire sur l'identification des conditions expérimentales susceptibles d'avoir un impact sur les résultats d'un essai biologique. Des expériences complémentaires peuvent être réalisées en laboratoire pour affiner et optimiser la procédure en conséquence. Il est recommandé de porter une attention particulière à la pertinence écologique des organismes ainsi qu'aux réponses biologiques utilisées dans les essais biologiques, écologiques et écotoxicologiques par rapport aux propriétés de la matrice à étudier, par exemple le pH, la matière organique, la conductivité, la teneur en argile ou la turbidité. Il convient que la conception de l'essai de validation interlaboratoires de la méthode couvre la plage de propriétés adaptée à la matrice d'essai (par exemple eau, sédiment, sol) pour laquelle l'essai biologique est pertinent.

Pour optimiser l'essai biologique pour les essais d'écotoxicité, des témoins doivent être définis pour différencier les effets des propriétés intrinsèques des échantillons pour essai de ceux causés par les contaminants. Par exemple, il est recommandé que la validation d'un essai en ce qui concerne son applicabilité dans l'évaluation des risques des sites pollués comprenne un échantillon de sol pollué ainsi qu'un échantillon de sol de référence. Il convient que l'échantillon de sol de référence présente des propriétés intrinsèques similaires à celles de l'échantillon contaminé, mais ne contienne aucun contaminant ou un niveau de contaminants négligeable.

Des méthodes d'essai sont souvent définies pour au moins deux types d'échantillons différents, par exemple des sites pollués, des sols amendés, des sols après remédiation, des déchets (par exemple matériaux de dragage, boues municipales provenant d'une station d'épuration des eaux usées, matières composées ou lisier, en particulier ceux destinés à un éventuel épandage), des eaux usées, des éluats, des eaux de surface, des eaux souterraines, des sédiments ou des produits chimiques. Dans une situation idéale, la méthode d'essai est validée en utilisant le type de contaminant le plus applicable ou le type de milieu le plus contaminé. Cependant, la validation complète d'une méthode intégrant une grande diversité d'échantillons n'est généralement pas possible. Il peut être inutile d'effectuer une validation aussi étendue si un nombre limité d'échantillons est, d'après l'avis des experts du laboratoire de référence, considéré comme représentatif des domaines d'application les plus importants. Par exemple, il convient que la validation d'une méthode d'essai destinée à évaluer la qualité des eaux de surface (par exemple des échantillons d'eau de rivière provenant d'une zone non polluée en amont et d'un point en aval affecté par une pollution diffuse ou un rejet d'effluents), ou l'efficacité des stations d'épuration des eaux usées (par exemple en utilisant des échantillons liquides d'effluents ayant été soumis à un traitement préliminaire et/ou final) tienne compte de la sélection d'échantillons adaptés à l'objectif de l'application.

5.3 Première étape de validation — Démonstration de l'état de préparation des laboratoires participants en vue des essais

La première étape consiste à démontrer l'état de préparation des laboratoires participants pour la culture des organismes d'essai ou des cultures cellulaires et la mise en œuvre de la norme d'essai. Il est recommandé d'évaluer l'état de préparation des laboratoires participants à l'aide d'une enquête ou d'un questionnaire complété par chaque participant ([Annexe E](#)). Ce questionnaire fournit au coordinateur des essais de validation du laboratoire de référence, des informations concernant le savoir-faire technique, l'expérience et les ressources disponibles pour la culture des organismes d'essai et la mise en œuvre de la procédure d'essai.

5.4 Deuxième étape de validation — Démonstration de l'aptitude du laboratoire et de la transférabilité de l'essai biologique

La deuxième étape de l'essai interlaboratoires consiste à réaliser une évaluation préliminaire de la transférabilité et de la fiabilité de l'essai et à identifier les limites éventuelles de l'essai. Parfois, des campagnes d'essais de validation interlaboratoires d'une méthode impliquant des participants de

laboratoires expérimentés ne génèrent pas de données comparables. Dans ce cas, le laboratoire de référence peut restreindre davantage les options de la méthode afin d'élever le degré de normalisation avant la prochaine campagne d'essais interlaboratoires, ou peut conduire ou commander des recherches complémentaires sur la méthode afin d'affiner la normalisation des parties de culture ou d'essai de la méthodologie. Les résultats de la deuxième étape de validation peuvent être utilisés lors de la conception de la future campagne d'essais de validation interlaboratoires.

Au moins un laboratoire indépendant du laboratoire ayant mis au point la méthode d'essai réalise l'essai biologique complet en vue d'une évaluation initiale et d'un examen de sa transférabilité interlaboratoires et de sa reproductibilité préliminaire. Les laboratoires participants réalisent l'essai biologique dans les conditions contrôlées et avec un composé de référence dont la toxicité est connue, à une concentration d'essai spécifique ou dans une plage de concentrations connue communiquée par le laboratoire de référence. Les résultats sont évalués par le laboratoire de référence, ce qui peut conduire à l'optimisation de la procédure de culture des organismes et/ou d'essai. Il convient que seuls les laboratoires qui satisfont aux critères de validité proposés (par exemple variabilité des témoins exprimée par le coefficient de variation, la sensibilité, le taux de réponse biologique des organismes soumis à essai dans les témoins) participent à la campagne d'essais de validation de la méthode (voir 5.5). L'implication des laboratoires non expérimentés est décrite en 5.5.2. L'intégration de ces laboratoires entraîne parfois des conclusions moins précises, ce qui pose des questions de transférabilité des essais. Dans les cas où la méthode d'essai ne permet pas d'assurer une reproductibilité suffisante, selon le degré d'échec, une optimisation ultérieure de cette méthode peut être envisagée ou des recherches supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires pour cette méthode d'essai. Toutes les exigences spécifiées en 5.5.5 pour l'essai de validation interlaboratoires de la méthode sont applicables pour la deuxième étape.

5.5 Troisième étape de validation — Validation de la méthode

5.5.1 Généralités

La troisième étape implique une ou plusieurs campagnes d'essais pour obtenir la validation de la méthode. La procédure d'essai de validation interlaboratoires de la méthode est conçue pour évaluer la variabilité interlaboratoires des résultats obtenus, en réalisant, dans chaque laboratoire participant, les mêmes mesurages en appliquant la méthode d'essai complète. La répétabilité (variabilité intralaboratoire) peut être estimée si les essais et les analyses de données sont répétés par chaque laboratoire. L'Annexe B décrit une autre approche pour estimer la répétabilité à l'aide des limites de confiance du descripteur de toxicité, qui intègre la variabilité des mesurages répétés de la variable biologique dans chaque traitement/dilution. Si le résultat n'est pas une valeur numérique (extraction d'ADN, par exemple), une approche spécifique est nécessaire pour évaluer la reproductibilité (voir 5.5.6).

5.5.2 Laboratoires participants

Le nombre de participants a une influence sur la fiabilité des données de performance calculées statistiquement. Il est suggéré d'obtenir des ensembles de données valides auprès d'un minimum de 6 laboratoires situés dans 3 pays différents. Par conséquent, il est fortement recommandé d'inviter un plus grand nombre de laboratoires d'essai et de pays et de les inclure dans des essais de validation interlaboratoires de la méthode. L'Annexe C fournit des recommandations sur la manière de procéder si un nombre inférieur d'ensembles de données valides est obtenu, en calculant et en mentionnant l'incertitude de la variance de reproductibilité.

La participation à ce type d'essais est volontaire et il convient d'attribuer un code (qui peut être communiqué) à chaque laboratoire participant afin de conserver l'anonymat de la source des ensembles de données des essais de validation. Si l'appel aux participants engendre un nombre insuffisant de laboratoires expérimentés avec la méthode, il convient que le laboratoire de référence fournisse de l'aide pour l'application de cette méthode (en proposant, par exemple, de former le personnel dans des laboratoires non expérimentés, en organisant un atelier de formation ou en proposant une téléconférence de planification).

Une invitation doit être adressée aux participants interlaboratoires intéressés bien avant le lancement de l'essai de validation interlaboratoires de la méthode. Il est recommandé au laboratoire de référence qui organise le programme interlaboratoires de transmettre l'invitation aux laboratoires participants potentiels cinq mois avant le début de la première campagne d'essais interlaboratoires. Il convient de demander aux laboratoires de manifester leur intérêt à participer dans les quatre semaines suivant la réception de l'annonce de l'essai interlaboratoires.

Si une validation complète d'une méthode est déjà présente, la méthode peut être adoptée sans autre essai de validation interlaboratoires de la méthode.

5.5.3 Échantillons

Les matrices d'échantillons doivent refléter le domaine d'application de la méthode d'essai (voir 5.2). Il convient de ne fournir aux participants aucune information sur les valeurs espérées des paramètres estimés. Chaque participant doit réaliser l'essai biologique conformément au nombre de réplicats spécifié par la procédure d'essai de validation interlaboratoires de la méthode. Chaque laboratoire doit recevoir une quantité suffisante d'échantillons ou de sous-échantillons. Les échantillons doivent être clairement étiquetés (par exemple numéro d'échantillon ou de sous-échantillon, nom du participant, matrice, date).

Si la détermination de la justesse de mesure est incluse dans l'essai de validation, une valeur vraie du mesurage est requise. Cette valeur vraie est de nature théorique et ne peut être déterminée qu'en utilisant un matériau de référence adapté, par référence à une autre méthode de mesure validée ou par la préparation d'un échantillon de référence connu. Dans ce dernier cas, la matrice environnementale à évaluer (de l'eau ou un éluat, par exemple) est dopée avec une quantité définie d'un composé de référence ayant une puissance d'effet toxique connue pour la méthode étudiée. Les échantillons dopés et les échantillons non dopés respectifs doivent être inclus dans l'essai de validation interlaboratoires de la méthode, dans lequel il convient que l'échantillon non dopé ne produise aucun effet. Il est également possible d'utiliser des matrices environnementales synthétiques ou artificielles, telles que des eaux usées synthétiques (voir référence [61]) pour produire un échantillon sans effet défini. Dans les deux cas, il convient que le laboratoire de référence vérifie le dopage correct et la stabilité du composé de référence dans la matrice environnementale, à l'aide d'un essai préliminaire.

Des informations concernant la stabilité et l'homogénéité des sous-échantillons doivent être fournies ainsi que la date finale de lancement de l'essai. Les conditions de stockage (plage de températures, protection contre la lumière, par exemple) sont des points importants à décrire dans la procédure d'essai de validation interlaboratoires de la méthode. Le respect des conditions critiques doit être pris en compte par le coordinateur du laboratoire de référence lors de l'expédition des échantillons vers d'autres pays. L'organisateur est tenu de choisir un mode de diffusion ou de distribution des échantillons approprié.

Si les concentrations d'une substance chimique sont estimées dans le cadre de l'essai biologique, le laboratoire de référence peut fournir des solutions étalons pour vérifier l'étalonnage, ainsi que des informations supplémentaires afin d'aider les participants à établir et à réaliser l'essai biologique dans leurs laboratoires.

Il convient que le laboratoire de référence demande à tous les laboratoires participants d'envoyer un sous-échantillon du milieu d'essai à un laboratoire d'analyse commun sous contrat avec le laboratoire de référence, pour la confirmation chimique de la concentration d'essai nominale lorsqu'un composé de référence est utilisé pour la campagne de validation ordinaire.

5.5.4 Plan d'expérimentation

Les méthodes écotoxicologiques permettent d'établir différents plans d'expérimentation qui peuvent conduire à différents types de calcul statistique pour l'estimation des critères d'effet de l'essai [par exemple CMEO (concentration minimale avec effet observé), CEx (concentration efficace), approche combinée, DMSE (dilution minimale sans effet) ou concentration biologique équivalente (CBE)]. Le laboratoire de référence doit fournir à chaque laboratoire participant des informations détaillées sur le plan d'expérimentation (par exemple série de dilutions, nombre de dilutions d'essai et de témoins,

nombre de réplicats par traitement). Une estimation de la CEx est préférée à la CSEO (concentration sans effet observé) ou à la CMEO. À ce stade, il convient de consulter un statisticien et le laboratoire de référence se chargera probablement de cette consultation.

5.5.5 Informations à fournir aux participants

Il convient que la procédure d'essai de validation interlaboratoires de la méthode comprenne les informations suivantes:

- le strict respect de la procédure d'étude de validation (procédure opératoire normalisée, par exemple) pour la campagne spécifique d'essais de validation interlaboratoires de la méthode;
- des instructions relatives aux mesures de sécurité car la présence potentielle de contaminants dans l'échantillon peut présenter un risque pour le personnel de laboratoire;
- les conditions de prétraitement et de stockage des échantillons;
- des instructions supplémentaires pour la réalisation de l'analyse, si nécessaire;
- une description du système d'essai, des conditions d'exposition, des procédures de sélection des concentrations/dilutions, des variables estimées;
- la personne à contacter (au laboratoire de référence);
- un calendrier (délais pour le début de l'analyse et le retour des résultats);
- la forme des résultats des analyses (unité, nombre de chiffres significatifs, etc.);
- un questionnaire sur les détails expérimentaux, en particulier en cas d'essais d'un protocole à options multiples;
- la liste des données à soumettre, qu'il convient d'inclure: valeurs de blanc, données d'étalonnage, données expérimentales d'origine, dossiers médicaux des organismes de culture, registres de température, procédures utilisées pour calculer et exprimer les résultats, utilisation de témoins et d'autres contrôles de performance ou mesurages des critères de validité;
- une feuille de calcul pour recalculer les données brutes dans le résultat final, le cas échéant (par exemple pour le calcul des activités microbiennes à partir des concentrations estimées).

5.5.6 Analyse de données et évaluation statistique des essais interlaboratoires

Tous les résultats doivent satisfaire à chaque critère de validité d'essai proposé. Avant l'évaluation statistique, les résultats des participants doivent également être vérifiés afin de détecter les données erronées et les ensembles de données aberrants explicables. Si nécessaire, il peut être demandé à un participant de laboratoire de vérifier l'absence d'erreurs dans les données transférées.

L'évaluation statistique des essais interlaboratoires comprend deux étapes: l'évaluation des observations biologiques individuelles ou des critères d'effet calculés de l'essai (par exemple calcul de l'activité microbienne ou de la CEx) et le calcul de la variabilité intra-/interlaboratoires. Les participants soumettent les données brutes au laboratoire de référence qui en assure l'évaluation. Si cela est prévu, il est également possible de soumettre des calculs individuels effectués par les laboratoires participants. Il convient de noter que même lorsque la même procédure statistique (régression logistique, par exemple) est utilisée, les résultats peuvent présenter de légères différences en fonction des options définies pour le calcul et le logiciel utilisé. Des organigrammes de modélisation de la dose-effet pour l'estimation de la CSEO/CMEO et de la CEx sont disponibles dans l'ISO/TS 20281 et les références [64] et [68].

Pour les données continues (par exemple longueur, poids), il convient de procéder à l'évaluation statistique conformément à l'ISO 5725-2, qui décrit l'analyse de la cohérence des données et la détection des valeurs aberrantes, ainsi que le calcul de la reproductibilité et de la répétabilité. Si un seul essai est disponible par laboratoire, il est impossible de calculer la répétabilité conformément à

l'ISO 5725-2. Dans ce cas, la répétabilité peut être calculée conformément à l'[Annexe B](#). Lors de l'analyse interlaboratoires des données, il convient que la décision de retrait des résultats d'essai aberrants des laboratoires soit fondée sur l'avis d'experts statistiques ou sur une discussion avec le personnel du laboratoire impliqué dans ces essais. Si les données ne satisfont pas aux critères spécifiés par l'ISO 5725-2, des statistiques robustes décrites dans l'ISO 5725-5 peuvent être plus appropriées. Des procédures statistiques pour un petit nombre de participants sont décrites dans l'ISO 13528:2015, Annexe D. Les résultats rapportés sous forme de valeurs «inférieures à» ne sont pas valables et doivent être exclus de l'évaluation statistique de la variabilité des essais.

Si les données ne sont pas conformes à une distribution normale [comptages (nombre de jeunes, par exemple) et données binomiales (si un organisme est vivant ou mort, par exemple)], il convient d'appliquer des calculs statistiques appropriés pour l'estimation de l'écart-type et de se conformer aux hypothèses requises par la technique statistique utilisée. Dans certains cas, une transformation (par exemple, arcsin pour des données en pourcentage ou des données en espace log) entraîne une normalisation des données, ce qui permet l'utilisation de procédures statistiques normalisées. Voir l'[Annexe A](#) pour de plus amples informations. Il est également possible d'utiliser des formules de calcul de la variabilité des données à partir d'une distribution donnée (Poisson ou binomiale, par exemple). Des procédures statistiques pour l'évaluation des données d'écotoxicité sont disponibles dans l'ISO/TS 20281 et les références [64], [68] et [69]. Il est fortement conseillé de consulter un statisticien lorsque les ensembles de données soumis sont complexes.

Si elle est estimée, la justesse de mesure est exprimée sous forme de biais, c'est-à-dire une erreur systématique en matière d'écart en pourcentage par rapport à la valeur vraie du mesurage. Les valeurs positives reflètent une surestimation et les valeurs négatives une sous-estimation de la valeur vraie par la méthode de mesure. En tenant compte de la variabilité du mesurage, il est possible de déterminer si un biais observé entre la moyenne d'une grande série de résultats d'essai, par exemple à partir d'un échantillon dopé, et la valeur vraie est statistiquement significatif (par exemple par des analyses de variance et des tests post hoc correspondants).

Les données de contrôle issues de la campagne de validation de la méthode peuvent être utilisées pour confirmer ou ajuster, si nécessaire, les critères de validité.

Il convient de noter que cette recommandation ne peut pas couvrir tous les types de données obtenues par des essais biologiques. Le laboratoire de référence est responsable de cette évaluation qui caractérise la variabilité interlaboratoires.

6 Évaluation

Il convient de considérer un minimum de 6 ensembles de données valides (conformément au [5.5.2](#)) pour estimer la répétabilité et/ou la reproductibilité de la méthode d'essai. Il est admis que différents essais biologiques peuvent conduire à différents coefficients de variation de reproductibilité acceptables. Sur la base de l'étape de prévalidation et du résultat de l'optimisation de la méthode d'essai, le laboratoire de référence et les experts participants peuvent définir les valeurs acceptables pour le coefficient de variation (CV). Dans tous les cas, $CV \leq 30\%$ est une cible couramment spécifiée de variabilité acceptable de l'essai biologique (voir référence [\[68\]](#)). Néanmoins, certaines méthodes sont intrinsèquement plus variables et dépassent un CV de 30 %, auquel cas une explication doit être fournie.

Si la variabilité ne peut pas être exprimée par le CV (CMEQ, par exemple), il convient que le laboratoire de référence spécifie les critères d'acceptation des résultats pour un essai biologique donné. Quel que soit le type des données, les résultats de l'essai biologique doivent être conformes aux critères de validité établis dans la méthode.

Si elle est incluse dans l'essai de validation interlaboratoires de la méthode, la justesse de mesure de la méthode doit également être évaluée. En l'absence de biais significatif (voir [5.5.6](#)) associé au mesurage, la méthode respective produit des résultats vrais, c'est-à-dire qu'elle présente une justesse de mesure acceptable. S'il existe un biais significatif, l'acceptation des valeurs mesurées (résultats) doit être examinée par le groupe d'experts intervenant dans l'élaboration de la méthode. En cas d'acceptation, une justification doit être fournie dans le rapport des données de validation.