

Limites de détection, de quantification : connaissez-vous vos limites ?

Par Emmanuel CURIS^{1,2}

RÉSUMÉ :

La connaissance de la capacité d'une méthode à détecter le composant à doser fait partie intégrante de la validation d'une méthode de dosage, lorsque cela est pertinent pour l'interprétation des résultats. Cette capacité se traduit, dans les documents réglementaires, par les notions de limite de détection (plus petite quantité détectable) et de quantification (plus petite quantité mesurable avec une fidélité donnée). Si les concepts de ces deux limites font l'unanimité, les définitions opérationnelles de ces quantités (en particulier les formules), et donc leur calcul, diffèrent cependant suivant les sources, y compris entre sources officielles (ISO/AFNOR, CLSI, Cofrac...), du fait d'hypothèses différentes.

Cet article propose une synthèse, illustrée par un exemple concret, des différents modes d'évaluation, et des formules associées, relevées dans la littérature, en rappelle l'origine et les hypothèses associées à partir des données d'étalonnage et des celles obtenues pour des blancs d'échantillons..

MOTS-CLÉS :

Limite de quantification, limite de détection, limite de blanc, étalonnage, dosage, qualité

INTRODUCTION

Évaluer la quantité présente d'une substance dans un mélange plus ou moins complexe est une activité quasi universelle, dont les applications vont bien au-delà des applications en clinique. Les substances recherchées sont des plus diverses : petites molécules, ions, protéines... tout autant que les techniques utilisées à cette fin : spectrométrie à des longueurs d'onde variées, spectrométrie de masse, chronométrie... Cependant, quelles que soient l'application et la méthode utilisée, le principe est le

même et deux questions se posent toujours : quelle est la quantité minimale de la substance susceptible d'être détectée ? d'être quantifiée ? Pour un laboratoire de biologie médicale, ces questions font partie intégrante des exigences de qualité et de compétence, telles que définies par la norme NF EN ISO 15189 d'application obligatoire (1) : le paragraphe 5.5.1.3 mentionne explicitement limite de détection et de qualification dans la liste des caractéristiques de performance ; il ne donne cependant aucune définition à ce sujet, ni consigne pour les obtenir (ce n'est pas le rôle de cette norme).

¹ UR7537 « BioSTM », faculté de pharmacie de Paris, Université Paris Cité,

² Service d'hématologie biologique, hôpital Lariboisière-APHP Nord, Paris

Plusieurs documents existent (normes ISO/AFNOR [2-5], guide d'accréditation Cofrac [6], recommandations du CLSI [7], de la SFBC [8]...), chacune avec son propre vocabulaire, pour formaliser et rendre opérationnelles ces définitions de limites de détection. Comparer ces documents, les comprendre pour une application au quotidien n'est pas aisé. Cet article a pour but de revenir sur ces deux notions et d'expliquer les idées qui sont à l'origine de ces définitions opérationnelles, ainsi que les façons de procéder pour établir ces deux valeurs importantes pour qualifier toute méthode de dosage. Le vocabulaire utilisé sera celui du document de référence du vocabulaire international de métrologie (VIM, [9]) ou, à défaut, du CLSI. Un tableau de correspondance entre les appellations et définitions des différentes normes est présenté en fin d'article.

Après avoir rappelé le contexte et précisé les définitions, ainsi que les protocoles opératoires permettant de les obtenir, nous montrerons l'origine des formules usuelles permettant de calculer ces limites, évoquant par la même occasion les conditions dans lesquelles elles peuvent être appliquées. L'utilisation de ces formules sera ensuite illustrée sur un exemple.

LE CONTEXTE

L'étalonnage dans un monde idéal

On souhaite évaluer la quantité d'une molécule définie, M , dans un mélange donné – par exemple, d'un médicament dans le sang, d'une toxine dans un aliment... cette quantité sera notée q_M et, dans l'immense majorité des situations, sera en pratique une concentration. Pour ce faire, on mesure une propriété physique du mélange — comme son absorbance —, à l'issue d'un protocole plus ou moins complexe : cette propriété physique sera notée y . Cette dernière dépend de la quantité de la molécule étudiée et il existe donc une relation f entre les deux, $y = f(q_M)$ qui est la courbe d'étalonnage théorique ; elle est supposée monotone, croissante (c'est-à-dire que si q_M augmente, y ne peut qu'augmenter) ou décroissante (si q_M augmente, y ne peut que diminuer) — pour simplifier, nous n'envisagerons que le cas d'une relation croissante dans la suite. Souvent, on peut considérer que cette relation est, pour la plage de concentrations pour laquelle la méthode sera utilisée, celle d'une droite : $y = \alpha_E q_M + \beta_E$, où α_E est la pente et β_E l'ordonnée à l'origine, on parlera de droite d'étalonnage. Dans la suite, là encore, on n'envisagera que ce cas dans un but de simplification.

En pratique, d'autres types de relations sont aussi utilisées : nous précisons dans quelle mesure les résultats qui suivent se transposent à ces relations.

Lorsqu'il n'y a pas de molécule ($q_M = 0$), la mesure physique donne idéalement une valeur $y_0 = f(0)$: valeur du « blanc ». C'est la valeur minimale que l'on peut avoir pour y (pour une relation croissante), et toute valeur plus élevée correspond à une quantité présente de la molécule M .

En inversant cette relation, on peut associer à une valeur de y donnée une quantité de la molécule étudiée : $q_M = f^{-1}(y)$. C'est le principe du dosage par étalonnage.

Dans cette approche idéale, la différence entre « détection » et « quantification » n'existe pas, et la réponse à la question de la plus petite valeur détectable (ou quantifiable) n'a pas de sens... On doit donc quitter ce paradis perdu de l'analyste et explorer les conséquences de ce passage au monde réel.

L'étalonnage dans le monde presque réel – limites de blanc, de détection, de quantification théoriques

Deux points compliquent sérieusement la situation dans la réalité : d'une part, on ne connaît pas la relation f — ainsi, on ne connaît pas les valeurs d' α_E et de β_E pour le cas d'une droite d'étalonnage ; d'autre part, pour de nombreuses raisons que cet article n'a pas vocation à détailler, on sait très bien que toute mesure comporte une part d'aléatoire, qui fait que même en répétant exactement la même opération sur le même échantillon, avec la même valeur de q_M , on n'aura jamais deux fois parfaitement la même valeur mesurée, y .

Le premier point conduit à utiliser une gamme d'étalonnage. À partir de k étalons contenant des quantités connues, $q_{M,1}$ à $q_{M,k}$, de la molécule M , on obtient k valeurs de y , y_1 à y_k , qui permettent de reconstruire la fonction f . Nous ne détaillerons pas dans cet article les méthodes, bien connues, permettant de le faire. Si ce point était le seul, il n'y aurait pas de difficulté particulière : à condition d'avoir suffisamment d'étalons (deux pour une droite) bien choisis (deux concentrations différentes, pour une droite) et de ne s'être point trompé dans la forme de f (ne pas utiliser une droite alors que la relation est sigmoïdale, par exemple), on trouverait la forme exacte de f et nous serions revenus au paradis de l'analyste.

Le second point, lui, change radicalement la donne. En effet, à cause de ce côté aléatoire, à une quan-

tité q_M donnée correspond non plus une seule valeur y , mais toute une série, une plage de valeurs même. On a coutume de représenter cela par la formule $y = f(q_M) + \varepsilon$, où ε illustre ce terme aléatoire. Nous reviendrons un peu plus loin sur ce qu'il cache et comment il faut l'interpréter. En attendant, pour en comprendre les conséquences, prenons un cas très simple avec $f(q_M) = q_M$ et disons que ε symbolise « toute valeur entre $-0,1$ et $+0,1$ » : on se rapproche de la réalité, mais pouvoir ainsi borner ε reste un tantinet utopique.

Dans ce cas, pour le blanc, $q_M = 0$ donc $f(q_M) = 0$ et $y = \varepsilon =$ « toute valeur entre $-0,1$ et $+0,1$ ». Conséquence, en utilisant y pour trouver q_M , on obtient puisque $q_M = y$, « toute valeur entre $-0,1$ et $+0,1$ » (Figure 1A). En pratique, on n'aura en dosant le blanc qu'une seule valeur de y , n'importe laquelle entre $-0,1$ et $+0,1$; la réponse du dosage sera donc une unique concentration observée, c_M , n'importe laquelle entre $-0,1$ et $+0,1$ — différente de q_M ! (Figure 1B) On ne peut alors plus assimiler concentration vraie (q_M) et résultat du dosage (c_M). Certaines valeurs sont clairement absurdes, une concentration ne pouvant être négative ; cependant, d'autres pourraient être de vraies concentrations : alors que l'on a dosé un blanc ne contenant aucune trace de M , le résultat est une concentration de, par exemple, $0,02$: on croit, à tort, avoir détecté la présence de M . On définit alors la *limite de blanc* (λ_B) comme la concentration observée maximale que l'on peut obtenir en dosant un blanc. Ici, on aurait $\lambda_B = +0,1$. Il est clair que toute concentration observée, c_M , inférieure à la limite de blanc est impossible à interpréter : elle peut aussi bien refléter une réelle concentration qu'un échantillon ne contenant pas M .

Considérons maintenant un échantillon de concentration connue, réelle, q_M légèrement supérieure à la limite du blanc, ici $+0,1$: par exemple $q_M = 0,12$. Elle donnera une valeur y comprise entre $+0,02$ et $+0,22$, toujours avec ε représentant « n'importe quelle valeur entre $-0,1$ et $+0,1$ ». Ainsi, certains dosages de cet échantillon pourraient très bien fournir un résultat inférieur à la limite du blanc, donc ininterprétables. En d'autres termes, cette quantité de M ne pourrait pas être détectée à coup sûr, car elle donnerait elle-même une concentration observée c_M comprise entre $+0,02$ et $+0,22$: si l'on trouve $0,08$, s'agit-il d'un échantillon ne comportant pas M avec un $\varepsilon = +0,08$, ou d'un échantillon contenant M et un autre ε ? Apparaît alors ainsi naturellement la question de la *limite de détection* (λ_D) : quelle est la plus petite quantité réelle de M , q_M , que l'on est sûr de pouvoir déceler, c'est-à-dire dont on est certain

qu'elle donnera une valeur c_M qui ne peut pas être celle qu'aurait donné un blanc ? Ici, comme λ_D donnera une valeur c_M entre $\lambda_D - 0,1$ et $\lambda_D + 0,1$, il suffit que $\lambda_D - 0,1 > \lambda_B$, soit $\lambda_D = 0,1 + \lambda_B = +0,2$ (Figure 1C). Tout échantillon comprenant une quantité moindre de M peut fournir une mesure identique à celle d'un blanc ; en revanche, tout échantillon contenant une quantité au moins égale de M donnera une mesure distincte de celles d'un blanc et l'on est donc assuré de déceler la présence de M dans l'échantillon.

Détecter la présence de M est une chose, mais cela suffit-il à pouvoir donner une valeur pour q_M ? Dans l'exemple considéré, si un échantillon contient la quantité $q_M = \lambda_D$ de M , alors la quantité mesurée sera n'importe laquelle entre $+0,1$ et $+0,3$ (Figure 1D). En d'autres termes, on a une incertitude sur le dosage¹ de l'ordre de $0,1/\lambda_D = 0,1/0,2 = 50\%$: pour beaucoup d'applications, c'est trop pour que la valeur numérique obtenue soit utilisable. On sait qu'il y a M dans l'échantillon, mais pas vraiment en quelle quantité. Apparaît alors ainsi naturellement la question de la *limite de quantification* (λ_Q) : quelle est la plus petite quantité réelle de M , q_M , que l'on est sûr de pouvoir quantifier, c'est-à-dire pour laquelle on pourra donner la quantité avec une précision suffisante ? Pour répondre à cette question, il faut une information supplémentaire : quelle est la précision que l'on souhaite ? Quelle qu'elle soit, cependant, on est sûr que $\lambda_Q \geq \lambda_D$, car si l'on ne peut pas dire si M est présente ou non, la précision est nécessairement insuffisante. Pour terminer notre exemple, considérons que l'on veuille une incertitude de 10% : il faut donc avoir $0,1/\lambda_Q = 0,1$, soit $\lambda_Q = 1$. Pour une incertitude de 1% , en revanche, on aura $\lambda_Q = 10$.

Avant de transposer ceci aux applications réelles, rappelons que les conséquences de l'existence de cet ε se font aussi sentir pour le premier point : à cause de celui-ci, il est impossible de déterminer parfaitement la courbe d'étalonnage, f ; on n'en aura qu'une version approchée, ce qui accroît encore les largeurs des concentrations observées associées à une concentration vraie donnée et peut même les déplacer : apparaissent ainsi les notions d'exactitude et une diminution de la précision ; ceci sort cependant du cadre de cet article. Néanmoins, ce n'est pas sans conséquence sur la détermination concrète des limites de blanc et de détection, comme nous le verrons dans la suite.

¹ Incertitude relative, définie ici comme le rapport entre la demi-largeur de l'intervalle, donc toujours $0,1$, et la valeur vraie, analogue d'un coefficient de variation...

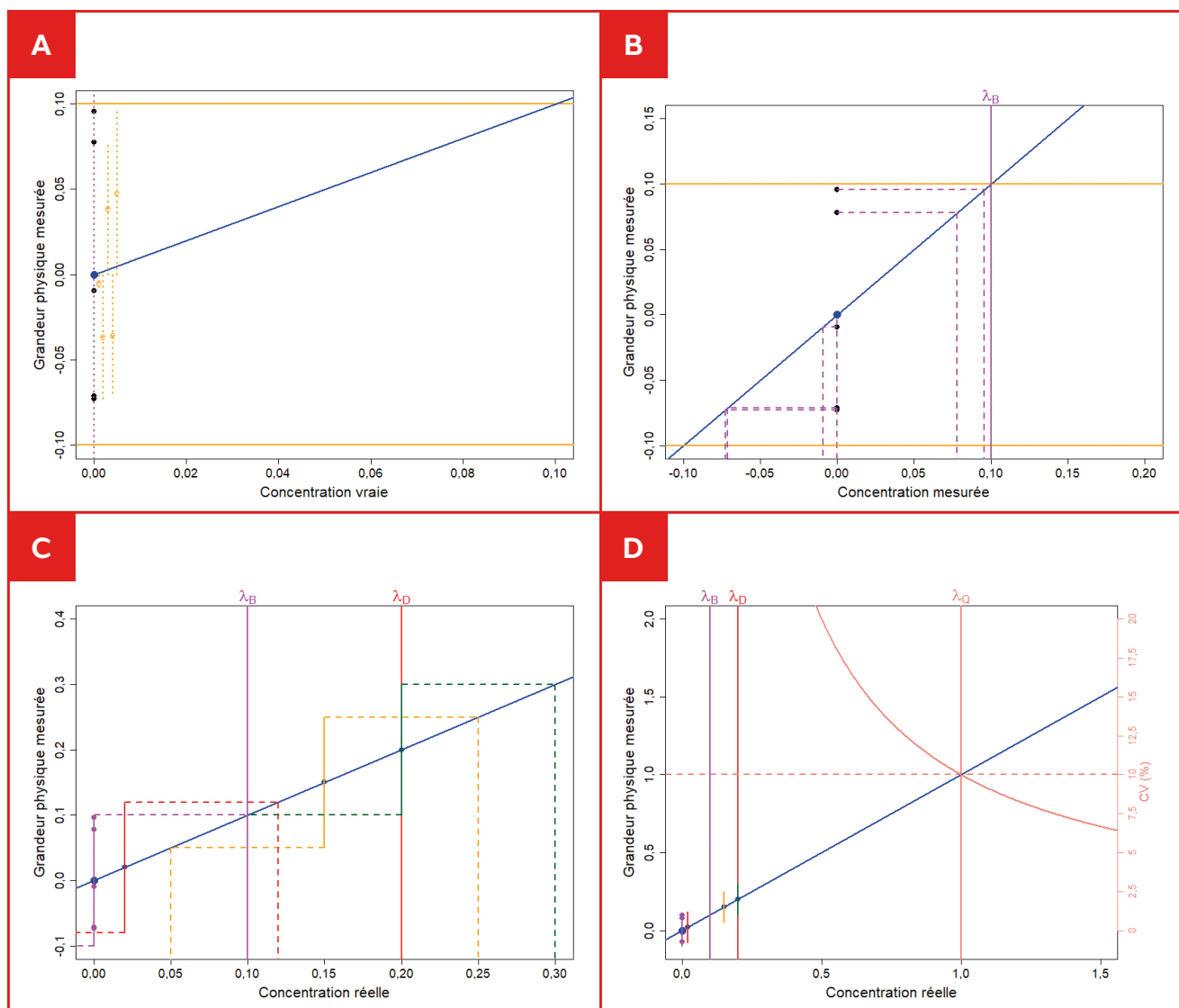


Fig. 1 - Concept de limite de blanc, limite de détection et limite de quantification.

- A :** Mesure de la grandeur physique servant au dosage (Y) pour 5 échantillons de concentration *réelle* nulle (« blancs ») : Y est reliée à la concentration par la courbe d'étalonnage *vraie*, en bleu. Pour une concentration réelle nulle, on attend la valeur de Y associée au point bleu. En pratique, on obtient 5 valeurs différentes, à cause des incertitudes de mesure (bruit, erreur...) : les points noirs. L'erreur est représentée, pour chacun d'eux, par un pointillé orange. L'erreur maximale est représentée par les deux lignes horizontales orange.
- B :** Chacune des valeurs Y mesurée permettra, en utilisant la courbe d'étalonnage *empirique*, d'obtenir une valeur de concentration mesurée. La courbe d'étalonnage empirique, obtenue à partir des solutions étalons, est ici représentée en bleu et est supposée, pour simplifier, identique à la courbe d'étalonnage *vraie*. On obtient 5 valeurs différentes de concentration mesurée. La **limite de blanc** (λ_B , trait vertical violet) est la plus élevée des valeurs possibles. Tout résultat inférieur à cette limite ne permet pas de savoir si l'échantillon contenait ou non le produit, puisqu'il est attendu si l'échantillon est un blanc.
- C :** Si la concentration réelle n'est pas nulle, deux cas de figure se distinguent :
 — si elle est inférieure à λ_B (cas rouge) ou légèrement supérieure à λ_B (cas orange), le résultat pourra être une valeur inférieure à λ_B , indiscernable du blanc, ou une valeur parfois supérieure : on n'est donc pas certain de réussir à détecter le produit dosé ;
 — si elle est « très » supérieure à λ_B (cas vert), on n'aura jamais de résultat inférieur à λ_B , on est sûr que l'échantillon n'est pas un blanc. La **limite de détection** est la plus petite concentration réelle qui est suffisamment supérieure à la limite de blanc pour cela (λ_D , trait vertical rouge foncé).
- D :** Évolution du coefficient de variation du résultat du dosage en fonction de la concentration réelle (courbe rose, axe de droite). Si l'objectif est d'avoir un dosage avec un coefficient de variation inférieur à 10 % (trait horizontal rose, tireté), la concentration doit être très supérieure à la limite de détection. La **limite de quantification** est la plus petite concentration permettant d'atteindre la précision de mesure souhaitée (λ_Q , trait vertical rose).

INTERMÈDE RÉALISTE : INTERPRÉTATION RÉELLE D' ε

Ce qui précède reste utopique, car on suppose que l'on connaît parfaitement la plage de valeurs que peut prendre ε . En pratique, il n'en est évidemment pas ainsi. Pour pouvoir utiliser les notions de limite de blanc, de détection et de quantification, il est donc nécessaire de mieux comprendre ce que représente ε et ce que l'on peut en dire.

Sans entrer dans les détails de la théorie mathématique, on sent bien qu' ε est un peu particulier par rapport aux quantités usuelles, comme q_M . En effet, sa valeur n'est pas unique et change à chaque fois qu'on réalise une nouvelle mesure, expérience... On dit que c'est une variable aléatoire. Pour la caractériser, il faut s'interroger sur les valeurs qu'elle peut prendre, mais encore plus sur les chances qu'elle prenne telle ou telle valeur : c'est ce que l'on appelle la loi de la variable aléatoire, ou sa *distribution*. Pour les situations qui nous intéressent, cette loi peut être représentée par une courbe qui donne, pour chaque valeur, les chances de l'obtenir². Le cas étudié dans la partie précédente correspondrait à la **Figure 2A** : ε ne peut prendre ses valeurs qu'entre $-0,1$ et $+0,1$, et toutes les valeurs de cette plage ont autant de chances de se produire (loi dite *uniforme*, ou équiprobable). Cependant, en réalité, c'est rarement cette loi qui reproduit correctement ce qu'est ε . En particulier, on n'a en général aucune idée des valeurs extrêmes que peut prendre ε et l'on ne peut donc pas les utiliser pour définir les limites de blanc et de détection !

Puisqu' ε est une variable aléatoire, $y = f(q_M) + \varepsilon$ en est une aussi, et par conséquent $c_M = f^{-1}(y)$ également. De ce fait, on aura aussi une distribution pour y et pour c_M . Par convention, comme ce sont des variables aléatoires, elles seront notées par des majuscules : Y et C_M , respectivement.

Quantiles et risques associés aux affirmations faites

Pour remédier à cette difficulté, on est obligé de remplacer les valeurs extrêmes par des valeurs « presque » extrêmes. Par exemple, au lieu de dire « ε ne peut pas dépasser $+0,1$ », nous devons dire « ε a seulement 1% de chances de dépasser $+0,1$ » ; le choix de 1% est arbitraire et toute autre valeur pourrait être utilisée. On appelle cette valeur le *quantile* d'ordre 1% de ε (ou de la loi de ε).

² Techniquement, cette courbe représente la densité de probabilité de la variable aléatoire.

Toute la démarche faite précédemment peut alors être réalisée à partir de cette valeur « presque maximale » ; cependant, comme ε peut dépasser cette valeur dans 1% des cas, un blanc pourra donner des valeurs plus grandes que la limite du blanc dans 1% des cas, et ainsi de suite : il faut donc adapter les définitions pour tenir compte de ce risque, contrôlé, mais existant. On note α ce risque :

- la **limite de blanc**, λ_B , est la valeur de c_M que seuls $\alpha\%$ des dosages de blancs pourront dépasser ;
- la **limite de détection**, λ_D , est la valeur de q_M telle qu'elle conduira à des valeurs c_M dosées inférieures à la limite du blanc dans seulement $\alpha\%$ des dosages.

La définition de la limite de quantification n'est, quant à elle, pas impactée directement puisqu'elle ne dépend que de la fidélité attendue sur le résultat. Cependant, comme elle est forcément supérieure à la limite de détection, elle peut être indirectement influencée.

Concrètement, cela veut dire qu'évaluer la limite de blanc consiste à trouver le quantile d'ordre α de la distribution des concentrations observées en dosant un blanc ($q_M = 0$). De même, la limite de détection est la valeur de q_M qui conduit à une distribution de c_M dont le quantile d'ordre $1 - \alpha$ est la limite de blanc. Tout revient donc à déterminer des quantiles...

Le modèle gaussien pour obtenir les quantiles

Le modèle le plus utilisé est de supposer que la loi de ε , et donc de y , est une loi de Gauss (aussi appelée loi « normale », loi de Laplace-Gauss ou tout simplement gaussienne). Sans entrer dans le détail des arguments à l'origine de ce choix, disons que ce modèle a l'avantage de représenter l'idée intuitive de ce que l'on attend pour la distribution des fluctuations de mesure, ε (**Figure 2B**) : elles peuvent se produire de la même façon par excès et par défaut (symétrie) et plus elles sont grandes, moins elles surviennent fréquemment (courbe « en cloche »).

Ce modèle a aussi l'avantage d'être entièrement défini par deux valeurs : la position du pic de la courbe, notée μ (l'espérance, en termes mathématiques), et la largeur de ce pic, notée σ (l'écart-type, en termes mathématiques). La connaissance de ces deux valeurs permet de calculer n'importe quel quantile : le quantile d'ordre α vaut $\mu + u_\alpha \sigma$, où u_α est donné par des tables ou par les fonctions appropriées d'un logiciel de statistiques – donc, si l'on arrive à connaître μ et σ , on peut trouver la limite qui nous intéresse.

Pour le terme ε , on peut poser par ailleurs que $\mu = 0$ (il suffit de changer la fonction f en $f + \mu$, si ce n'est

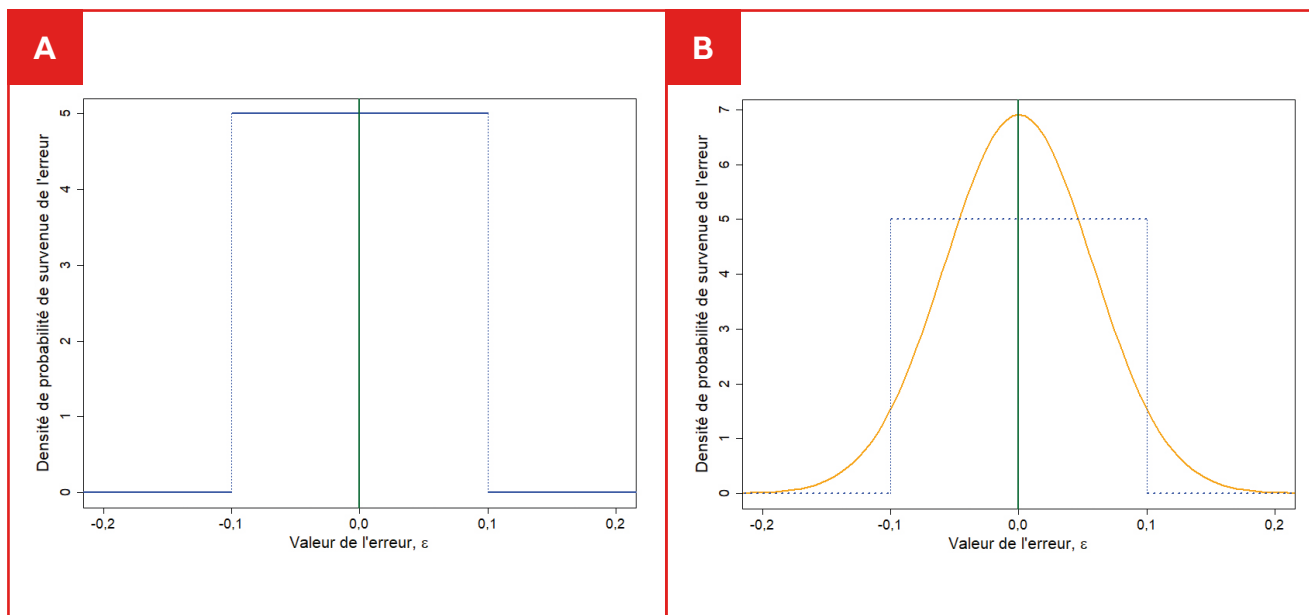


Fig. 2 - L'incertitude de mesure.

La ligne verticale verte correspond à la valeur vraie (erreur nulle, $\varepsilon = 0$).

A : Distribution de l'erreur (incertitude) de mesure suivant le modèle simple : toute valeur est possible entre $-0,1$ et $+0,1$, toutes les valeurs sont équiprobables. On parle de distribution *uniforme* de l'incertitude de mesure (de la variable aléatoire ε).

B : Distribution gaussienne de l'erreur (incertitude) de mesure. De grandes erreurs sont moins probables que de faibles erreurs (en valeur absolue) ; les erreurs ont autant de chances de se produire par surestimation que par sous-estimation. Il n'y a pas de borne pour l'erreur maximale possible (mais de « grandes » erreurs sont très improbables). La distribution uniforme de la figure A est rappelée, en pointillés, pour comparaison. La largeur de la courbe est reliée à la dispersion des mesures, donc à l'écart-type (σ). La position de la courbe est reliée à la valeur vraie et correspond à l'espérance (μ).

pas le cas) et il ne reste donc qu'à déterminer la valeur de σ . On peut montrer que si l'on suppose ε gaussien, alors $Y = f(q_M) + \varepsilon$ sera aussi une gaussienne, avec $\mu_Y = f(q_M)$ et $\sigma_Y = \sigma$ (à condition qu'il n'y ait rien d'aléatoire, ni dans f , ni dans q_M). Les choses sont en revanche plus complexes pour C_M , en partie car $c_M = f^{-1}(Y)$ est une transformation de Y qui peut être complexe, mais aussi parce qu'en pratique on ne connaît pas f^{-1} , mais son expression qui elle-même fait intervenir d'autres variables aléatoires. Cependant, dans de nombreuses situations, la loi de C_M reste suffisamment proche d'une gaussienne pour « faire comme si » ; demeurera à déterminer son espérance et son écart-type. Lorsque ce n'est pas le cas, on pourra approcher le quantile cherché par $f^{-1}(q_{Y,\alpha})$, où $q_{Y,\alpha}$ est le quantile d'ordre α de Y — la formule serait exacte si l'on connaissait parfaitement f et f^{-1} ; elle est approchée, car on n'en a que des approximations.

Ainsi, pour la limite de blanc, en admettant que $C_{M,0}$ soit gaussienne, d'espérance μ_0 et de variance σ_0 , on aurait alors $\lambda_B = \mu_0 + u_{1-\alpha} \sigma_0$. Si elle ne l'est pas et que l'on peut accepter que $Y_0 = y_0 + \varepsilon$ l'est, alors $\lambda_B = f^{-1}(y_0 + u_{1-\alpha} \sigma)$. Si aucune de ces deux variables

ne peut être supposée gaussienne, les choses sont plus compliquées : nous y reviendrons à la fin de cet article.

Pour la limite de détection, le principe serait le même, cependant la réalisation est plus délicate. En supposant que pour une quantité q de M , $C_{M,q}$ est gaussienne, d'espérance μ_q et de variance σ_q , son quantile d'ordre α est $\mu_q + u_\alpha \sigma_q$, et l'on veut qu'il vaille λ_B . Or, μ_q et σ_q sont fonctions de q . On peut donc chercher la valeur de q qui satisfait cette équation : cela donnera la limite de détection, λ_D . La difficulté est donc de trouver la relation entre μ_q , σ_q et q .

Dans le cas le plus simple d'une relation affine, $Y = \alpha_E q_M + \beta_E + \varepsilon$ et d'un écart-type d' ε constant, σ , on peut écrire que $C_M = \frac{Y - \beta_E}{\alpha_E} = q_M + \frac{\varepsilon}{\alpha_E}$, permettant d'en déduire que (si l'on connaissait parfaitement la courbe d'étalonnage), C_M est une gaussienne, avec $\mu_q = q$ et $\sigma_q = \sigma / |\alpha_E|$. De ce fait, l'équation devient $\lambda_D + u_{\alpha} \frac{\sigma}{|\alpha_E|} = \lambda_B$, qui donne la limite de détection. Comme, en réalité, on ne connaît pas exactement la courbe d'étalonnage, ce résultat n'est qu'une première approche.

On constate quoi qu'il en soit que la limite de blanc est la valeur la plus facile à obtenir, mais aussi une première étape indispensable pour pouvoir ensuite estimer la limite de détection.

Reste à recueillir les valeurs de y_0 et de σ , qui sont nécessaires pour tous ces calculs ! C'est ce que nous allons aborder maintenant, avec les conséquences que cela a aussi sur les formules encore trop optimistes que nous avons obtenues. Cependant, de façon générale, on peut retenir que μ , espérance, est assimilable à la moyenne arithmétique des valeurs d'un échantillon de n valeurs, tandis que σ est assimilable à leur écart-type, à condition de bien diviser par $n - 1$ et non n .

ÉVALUER LA LIMITE DE BLANC À PARTIR D'UN ÉCHANTILLON DE VALEURS

Cette situation est la plus fréquente et celle recommandée par les instances réglementaires. On considère que l'on dispose d'un échantillon pouvant jouer le rôle de blanc ($q_M = 0$) et que l'on peut doser autant de fois qu'on le souhaite. On réalise n dosages de cet échantillon – très souvent, $n = 30$, nombre minimal imposé par certaines instances. On dispose donc de n valeurs y_1 à y_n de la grandeur servant à faire le dosage ; chacune d'elle, en appliquant la courbe d'étalonnage, conduit à une valeur c_1 à c_n de la concentration mesurée. On note $c_i = f^1(y_i)$ le résultat du i -ème dosage du blanc. Comment utiliser ces n valeurs pour en déduire la limite de blanc, λ_B ? Plusieurs approches sont possibles, en fonction de la réponse aux deux questions suivantes :

- peut-on considérer que la distribution des valeurs est gaussienne ?
- travaille-t-on avec les valeurs y_i ou avec les valeurs c_i ?

Les valeurs y_i sont les réalisations de variables aléatoires, Y_i ; c_i , celles de variables aléatoires, C_i . Nous avons vu que la limite de blanc, λ_B , est le quantile d'ordre $1 - \alpha$ de la distribution des C_i : il paraît donc naturel de privilégier un travail directement sur les C_i . Toutefois, la relation entre Y_i et C_i est monotone, si l'étalonnage est correct. De ce fait, on peut montrer que les quantiles de C_i et de Y_i sont eux-mêmes reliés par la relation d'étalonnage : ainsi, si $q_{1-\alpha}$ est le quantile d'ordre α des Y_i , alors on a $\lambda_B = f^1(q_{1-\alpha})$. En pratique, s'il est plus simple de déterminer les quantiles de Y_i que ceux de C_i , cette relation permet d'en tirer parti.

Estimation du quantile dans le cas gaussien

Supposons que C_i suive une loi normale, d'espérance μ et d'écart-type σ . Dans ce cas, son quantile d'ordre

$1 - \alpha$, $q_{1-\alpha}$, est donné par la relation $q_{1-\alpha} = \mu + u_{1-\alpha} \sigma$, où $u_{1-\alpha}$ est le quantile d'ordre d'une loi normale centrée ($\mu = 0$) et réduite ($\sigma = 1$). Or ces valeurs de $u_{1-\alpha}$ sont tabulées et aisément obtenues à l'aide des logiciels courants. De ce fait, il « suffit » de connaître μ et σ pour pouvoir trouver la limite de blanc.

L'approche la plus simple est d'utiliser les estimations respectives associées : moyenne arithmétique, m , pour μ et écart-type, s , pour σ . La formule de la limite de blanc est alors estimée par $\lambda_B \approx \widehat{\lambda}_B = m + u_{1-\alpha} s$ – soit, pour le cas habituel $\alpha = 5\%$ (soit $u_{1-\alpha} = +1,96$), $\widehat{\lambda}_B = m + 1,96 s$.

Cette formule néglige cependant l'incertitude associée à m et s , utilisés à la place de μ et σ , inconnus. Elle présente de ce fait un double inconvénient :

- d'une part, en moyenne elle ne conduit pas à la « bonne » valeur de λ_B , (on parle d'estimateur biaisé) ;
- d'autre part, alors que par définition, $p(C_i > \lambda_B) = \alpha$ par définition, ici $p(C_i > \widehat{\lambda}_B) > \alpha$: en d'autres termes, le risque de dire que le composé est présent, alors qu'il n'y en a pas, est plus élevé que statué dans le cahier des charges.

Les recommandations et textes réglementaires, en général, se limitent néanmoins à la formule la plus simple comme définition expérimentale de la limite de blanc, soit $\widehat{\lambda}_B = m + u_{1-\alpha} s$. Une exception notable est la norme NF ISO 11843-3 (4), dans laquelle la formule proposée tient compte de l'incertitude associée à m et s . Par souci de simplicité, la façon d'obtenir cette extension ne sera pas présentée dans cet article introductif ; la formule à laquelle on aboutit, donnée dans cette norme, est

$$\widehat{\lambda}_B = m + t_{1-\alpha; n-1} s \sqrt{1 + \frac{1}{n}}$$

où n est le nombre de blancs utilisés et $t_{1-\alpha; n-1}$ est le quantile d'ordre $1 - \alpha$ d'une loi de Student à $n - 1$ degrés de liberté. Avec cette formule, on a réellement une probabilité α que le résultat obtenu pour un seul blanc dépasse $\widehat{\lambda}_B$ (soit $p(C_i > \lambda_B) = \alpha$). Si l'on suit les recommandations de faire (au moins) $n = 30$ blancs, la différence entre les deux formules peut ne pas être négligeable en pratique. En effet, pour $\alpha = 5\%$, dans ce cas $1/n \approx 0,033$ et $t_{0,95; 29} = 1,699$ au lieu de $u_{0,95} = 1,645$ soit $\widehat{\lambda}_B = m + 1,727 s$ au lieu de $m + 1,645 s$. Cela aura ensuite une conséquence sur la limite de détection...

Estimation du quantile dans le cas général

Si C_i n'est pas gaussien, la formule précédente ne s'applique pas. La principale raison pour que C_i ne soit pas gaussien est une troncature des résultats :

toutes les valeurs négatives, physiquement impossibles, sont tronquées à 0. Lorsque tel est le cas, l'utilisation de la formule précédente est incorrecte.

Si les Y_i sont gaussiens, il est possible de leur appliquer l'une des formules précédentes, puis de convertir le quantile estimé ainsi atteint en limite de blanc, en appliquant la fonction d'étalonnage. Lorsque la fonction d'étalonnage est une droite, le résultat sera le même que celui obtenu sur les C_i en l'absence de troncature (si telle est la raison de la non-normalité des C_i). Pour d'autres relations, les résultats différeront : il convient de choisir, entre les deux résultats, celui obtenu à partir des données « les plus gaussiennes », Y_i ou C_i .

Si aucune de ces deux distributions n'est gaussienne, d'autres méthodes d'estimation des quantiles doivent être utilisées ; leur description dépasse le cadre de cet article introductif.

Évaluer la limite de blanc par d'autres méthodes

Lorsqu'il est difficile de réaliser suffisamment de mesures d'un blanc, par exemple pour des échantillons coûteux ou délicats à produire, il est possible d'utiliser la courbe d'étalonnage pour construire la limite de blanc. Cette approche, qui n'est pas détaillée dans les recommandations usuelles, ne sera pas présentée ici. On trouvera le principe, lorsque la courbe d'étalonnage est linéaire, dans la norme ISO/AFNOR 11843-2 (3), ou plus généralement dans la norme ISO/AFNOR 11843-5 (5).

ÉVALUER LA LIMITE DE DÉTECTION

L'idéal serait de pouvoir la construire à partir d'un échantillon expérimental, comme précédemment. Le principe est, à première vue, similaire au précédent : on dispose d'un échantillon de concentration réelle $q_M = \lambda_D$ et on réalise n mesures par la méthode de dosage. Elles permettent de caractériser la distribution des concentrations mesurées et de vérifier que le quantile d'ordre α de cette distribution est bien la limite de blanc, λ_B .

On sent bien que cette approche est cependant vouée à l'échec, puisqu'elle suppose de connaître la limite de détection qui est justement ce que l'on cherche. Tout au plus peut-elle servir de vérification ultime, une fois la limite de détection estimée par une autre méthode. Néanmoins, lorsque l'on dispose du temps et des ressources nécessaires, il est tout à fait envisageable, et même recommandé, de réaliser une gamme d'échantillons de concentrations

croissantes et de les doser plusieurs fois chacun. En calculant, pour chacun, la proportion de résultats dépassant la limite de blanc, il sera possible d'encadrer la limite de détection.

Cependant, en général, on fera quelques hypothèses additionnelles afin de pouvoir utiliser une formule et les seuls résultats obtenus sur le blanc. Lorsque la limite de détection n'est pas le paramètre crucial de la méthode (c'est très souvent la limite de quantification qui importe), cette approche est largement suffisante. Dans le cas où la limite de détection est cruciale, par exemple pour détecter la présence d'une charge virale ou d'un marqueur tumoral, vérifier que la valeur ainsi obtenue satisfait bien à la définition reste une étape importante.

Estimation dans le cas gaussien

Supposons la limite de blanc λ_B connue et que, pour une quantité q_M donnée, la distribution des concentrations mesurées soit gaussienne, d'espérance $\mu(q_M)$ et d'écart-type $\sigma(q_M)$. Dans ces conditions, la limite de détection est la valeur λ_D de q_M telle que $\mu(\lambda_D) + u_\alpha \sigma(\lambda_D) = \lambda_B$ qui traduit le fait que seuls $\alpha\%$ des valeurs mesurées doivent être inférieures à la limite du blanc³. Il « suffit » donc de connaître $\sigma(\lambda_D)$ et la relation entre $\mu(q_M)$ et q_M pour pouvoir calculer la limite de détection. La réponse au second point est la courbe d'étalonnage, avec $\mu(q_M) = E(f^{-1}(f(q_M) + \varepsilon))$ — dans les situations usuelles où cette courbe est obtenue par régression et en notant $E(X)$ l'espérance de X . Lorsque la courbe d'étalonnage est une droite, cette formule se simplifie en $\mu(q_M) = q_M$. Dans le cas contraire, on considérera tout de même que le fait d'avoir une « bonne » courbe d'étalonnage permet d'assimiler q_M et $\mu(q_M)$ et la formule de la limite de détection devient donc $\lambda_D = \lambda_B - u_\alpha \sigma(\lambda_D)$. Reste donc à proposer une valeur pour $\sigma(\lambda_D)$.

Si l'on suppose que l'incertitude sur les concentrations mesurées est constante, la solution la plus simple est d'utiliser la valeur qui a été déterminée pour le blanc, $\sigma(0)$ estimée par s . Dans ce cas, $\lambda_D = \lambda_B - u_\alpha s$. Si l'on a obtenu λ_B par la méthode gaussienne, soit $\lambda_B = m + u_{1-\alpha} s$ où m est la moyenne des blancs et α le risque choisi pour le blanc, on aboutit à $\lambda_D = m + (u_{1-\alpha} - u_\alpha) s$. Très souvent, $\alpha = \alpha'$ et, puisque $u_\alpha = -u_{1-\alpha}$, la formule se simplifie en $\lambda_D = m + 2u_{1-\alpha} s$ — soit, pour la valeur usuelle $\alpha = 5\%$, $\lambda_D = m + 3,29 s$.

L'hypothèse d'une incertitude constante sur les concentrations est cependant assez rarement réaliste. Dans ce cas, la méthode recommandée est de recourir à des échantillons de concentration

³ On rappelle que, pour les valeurs usuelles de α , $u_\alpha < 0$.

connue, encadrant la limite de détection (dont une première idée pourra être obtenue par la formule ci-dessus). La répétition de la mesure sur ces échantillons permettra d'estimer l'écart-type. La formule est alors, toujours dans le cadre gaussien, $\lambda_D = m + u_{1-\alpha} s_0 - u_{\alpha'} s_M$ et, lorsque les deux risques sont les mêmes, $\lambda_D = m + u_{1-\alpha} (s_0 + s_M)$.

Comme pour la limite de blanc, et pour les mêmes raisons, mais de façon encore plus prononcée, cette formule sous-estime la limite de détection car elle néglige les incertitudes liées aux valeurs utilisées (m , s ou s_0 et s_M , mais aussi le lien entre concentration mesurée et concentration réelle via l'estimation de f et f^1) ; par ailleurs, elle ne contrôle pas réellement le risque indiqué. Nous n'entrerons pas, dans cet article, sur les corrections de cette formule pour résoudre ces problèmes ; on trouvera, dans le cas d'une droite d'étalonnage, des éléments à ce sujet dans la norme NF ISO 11843-2 (3).

OBTENIR LA LIMITE DE QUANTIFICATION

Pour définir une limite de quantification, il faut se donner une cible de fidélité ; celle-ci peut être exprimée en fidélité absolue (en concentration) ou relative (en pourcentage). La limite de quantification sera donc la plus petite concentration *vraie*, supérieure à la limite de détection, qui permettra d'obtenir une concentration *mesurée* avec cette fidélité. Très souvent, cette limite de quantification est le paramètre essentiel de la méthode de dosage, car en pratique on a besoin d'une valeur suffisamment précise de la quantité que l'on cherche...

Lorsque l'on dispose du temps et des ressources nécessaires, il est tout à fait envisageable, et même recommandé, de réaliser une gamme d'échantillons de concentrations croissantes et de les doser plusieurs fois chacun. En calculant, pour chacun, la fidélité des résultats, il sera possible d'encadrer la limite de quantification.

Lorsque la courbe d'étalonnage est une droite, avec une erreur de mesure (en y) constante sur toute la gamme, il est cependant possible d'utiliser une formule pour évaluer la limite de quantification connaissant la cible de fidélité. C'est le cas le plus simple, mais qui demande déjà des calculs importants... Si la relation n'est pas une droite, ou si l'erreur n'est pas constante, une approche similaire peut se faire mais les calculs sont beaucoup plus lourds et doivent être repris au cas par cas, ce qui dépasse le cadre de cet article.

Fidélité cible absolue

Dans ce cas, on souhaite une fidélité constante, exprimée dans la même unité que la concentration mesurée (par exemple, une fidélité de 2 ng/L pour une concentration en ng/mL). En pratique, cette fidélité sera définie comme la demi-largeur de l'intervalle qui a 95 % de chances de contenir la vraie valeur de concentration, compte tenu de la mesure réalisée : l'intervalle d'étalonnage (ou de calibration).

Deux méthodes existent pour obtenir l'intervalle d'étalonnage, toutes deux fondées sur l'utilisation de la courbe d'étalonnage et la variabilité des mesures : soit la méthode de propagation des erreurs, permettant de calculer l'écart-type de la concentration mesurée à partir des paramètres de la courbe d'étalonnage, soit la zone de prédiction de la courbe (le détail de cette méthode peut être trouvé dans [11]). C'est la première méthode que nous appliquerons ici, car elle est plus appropriée à la mise en équation pour rechercher une concentration ayant une fidélité connue.

Selon la méthode de propagation des erreurs, l'écart-type la concentration mesurée, σ_C , est donné, en première approche, par la formule

$$\sigma_C = \frac{\sigma_{\text{res}}}{|a|} \sqrt{\frac{1}{n_m} + \frac{1}{n_e} + \frac{(x - \bar{x})^2}{s_x^2(n_e - 1)}}$$

où a est la pente de la droite, σ_{res} l'écart-type de la mesure physique réalisée (y), n_m le nombre de répétitions de mesure de l'échantillon dosé, n_e le nombre de mesures utilisées pour construire la droite d'étalonnage, x la concentration mesurée (moyenne des résultats des n_m répétitions), \bar{x} la moyenne des concentrations utilisées pour l'étalonnage et s_x^2 la variance des concentrations d'étalonnage. L'intervalle de calibration est ensuite obtenu en supposant une distribution gaussienne ; en remplaçant σ_{res} , inconnu, par son estimation, s_{res} , la demi-largeur de l'intervalle est finalement donnée par

$$t_{1-\frac{\alpha}{2}; n_e-2} s_C = t_{1-\frac{\alpha}{2}; n_e-2} \frac{s_{\text{res}}}{|a|} \sqrt{\frac{1}{n_m} + \frac{1}{n_e} + \frac{(x - \bar{x})^2}{s_x^2(n_e - 1)}}$$

où $t_{q; \nu}$ est le quantile d'ordre q d'une loi de Student à ν degrés de liberté. Il reste alors à résoudre l'inéquation $t_{1-\frac{\alpha}{2}; n_e-2} s_C \leq c$, où c est la cible souhaitée. En remplaçant par la formule précédente, cette inéquation peut se réécrire

$$x^2 - 2\bar{x}x + \bar{x}^2 + \left(\frac{1}{n_m} + \frac{1}{n_e} - \left[\frac{c a}{t_{1-\frac{\alpha}{2}; n_e-2} s_{\text{res}}} \right]^2 \right) s_x^2(n_e - 1) \leq 0$$

On reconnaît un trinôme du second degré, qui aura donc deux racines (si la méthode permet d'atteindre la cible souhaitée, aucune dans le cas contraire) et la précision souhaitée sera atteinte pour les valeurs de x comprises entre ces deux racines⁴. Ces dernières permettent donc de définir la limite de quantification basse (plus petite racine) et la limite de quantification haute (plus grande racine).

Fidélité cible relative

Dans ce cas, la fidélité est définie comme un pourcentage de la concentration vraie. En pratique, elle est définie comme un coefficient de variation maximal, à ne pas dépasser : cv_{\max} .

La formule de la propagation des erreurs, présentée auparavant, donne l'écart-type associé à une concentration mesurée x : $\sigma_c = \frac{\sigma_{\text{res}}}{|a|} \sqrt{\frac{1}{n_m} + \frac{1}{n_e} + \frac{(x - \bar{x})^2}{s_x^2(n_e - 1)}}$. Le coefficient de variation, cv , est donc donné par

$$cv(x) = \frac{\sigma_c}{x} = \frac{\sigma_{\text{res}}}{x|a|} \sqrt{\frac{1}{n_m} + \frac{1}{n_e} + \frac{(x - \bar{x})^2}{s_x^2(n_e - 1)}}$$

⁴ En effet, le coefficient de x^2 est positif donc la parabole est décroissante puis croissante.

et la limite de quantification est la plus petite valeur de x telle que $cv(x) \leq cv_{\max}$. Un calcul similaire au précédent conduit finalement (en remplaçant σ_{res} par son estimation, s_{res}) à l'inéquation

$$x^2 \left[\frac{1}{s_x^2(n_e - 1)} - \frac{cv_{\max}^2 a^2}{s_{\text{res}}^2} \right] - \frac{2\bar{x}}{s_x^2(n_e - 1)} x + \frac{\bar{x}^2}{s_x^2(n_e - 1)} + \frac{1}{n_m} + \frac{1}{n_e} \leq 0$$

qui est aussi un trinôme du second degré, avec deux racines qui permettent de définir la limite de quantification. Si le coefficient de x^2 est positif, la situation est similaire à la précédente : la fidélité est atteinte pour des concentrations entre les deux racines, qui définissent les limites de quantification basse et haute de la méthode. En revanche, si le coefficient de x^2 est négatif, l'une des deux racines est négative et l'autre positive. La fidélité est atteinte pour des concentrations plus grandes que la racine positive, qui constitue la limite de quantification basse ; il n'y a pas de limite de quantification haute — en pratique, elle est confondue avec la limite haute de concentration pour laquelle la gamme est utilisable...

EXEMPLE ILLUSTRATIF

Tout au long de cette présentation, nous illustrerons les différentes définitions introduites à partir d'un exemple concret : celui du dosage plasmatique du dabigatran par mesure chronométrique (temps de thrombine diluée ; réactifs *Hemoclot Thrombin Inhibitors* [Hyphen Biomed]), réalisés sur un automate STAR-MAX (Stago) (12).

Construction de la courbe d'étalonnage

Les données permettant de construire la courbe d'étalonnage sont données dans le tableau ci-dessous. Elles correspondent à la mesure de quatre échantillons étalons fournis par le fabricant (Hyphen Biomed), chacun mesuré une seule fois. Une droite est un modèle acceptable ; la courbe d'étalonnage est obtenue par régression linéaire simple ; elle conduit à l'équation $y = 0,1244 x + 29,11$, où y est le temps et x la concentration en dabigatran, et est représentée en Figure 3.

Étalon	1	2	3	4
Concentration (ng/mL)	9	47	268	510
Temps (s)	30,2	34,5	63,4	92,1

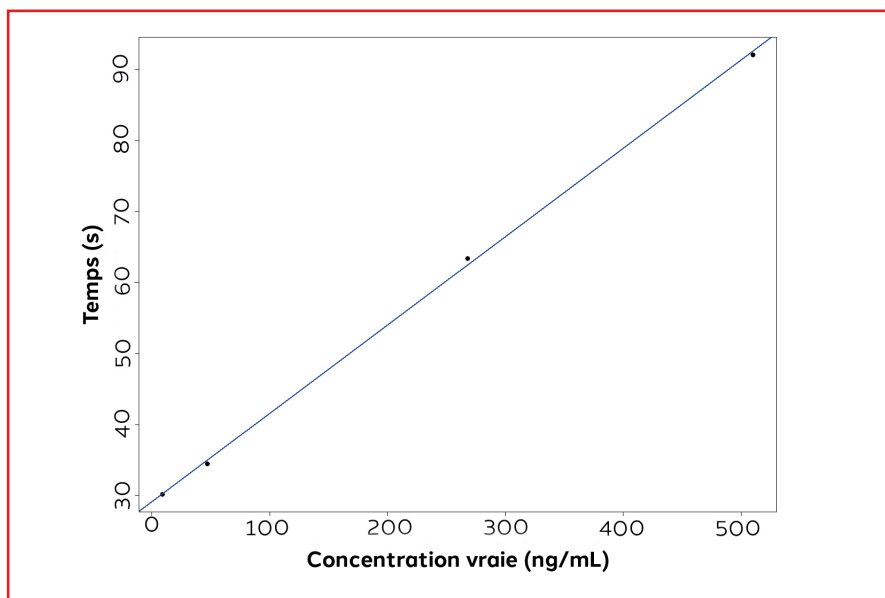


Fig. 3 - Courbe d'étalonnage pour le dosage du dabigatran réalisé par la méthode chromatométrique.

Chaque point correspond à la mesure d'un étalon ; la droite bleue correspond à la droite d'étalonnage.

Données associées au blanc

28 mesures sur le plasma du fournisseur (Hyphen Biomed) ne contenant pas de dabigatran (« blanc »), plasma avec lequel seront réalisées les dilutions du plasma « patient » pour lequel doser le dabigatran. Les résultats de ces mesures sont exprimés dans le tableau ci-dessous, **sans tronquer les concentrations calculées négatives à 0** (même s'il est évident que ces résultats sont, cliniquement, absurdes : ici, le but n'est pas de rendre un résultat clinique mais bien de caractériser la méthode).

Blanc	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Temps (s)	28,9	28,7	29,0	28,6	28,4	28,2	28,5	28,2	28,0	28,4
Concentration (ng/mL)	-1,716	-3,323	-0,912	-4,127	-5,735	-7,343	-4,931	-7,343	-8,951	-5,735

Blanc	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Temps (s)	28,4	28,1	28,3	28,6	28,7	28,0	28,5	28,5	28,3	28,4
Concentration (ng/mL)	-5,735	-8,147	-6,539	-4,127	-3,323	-8,951	-4,931	-4,931	-6,539	-5,735

Blanc	21	22	23	24	25	26	27	28
Temps (s)	28,6	28,7	28,4	27,5	29,2	29,0	28,7	27,2
Concentration (ng/mL)	-4,127	-3,323	-5,735	-12,97	0,696	-0,912	-3,323	-15,38

La variabilité des concentrations mesurées pour un même échantillon ayant une unique concentration réelle (nulle ici) est manifeste... Ces mesures sont représentées en Figure 4 ; la distribution peut, au moins grossièrement, être considérée gaussienne (test de normalité de Shapiro-Wilks : $p = 0,0734$) et l'on peut donc utiliser les formules présentées dans cet article. La moyenne des valeurs vaut $m = -5,505$ ng/mL ; l'écart-type, $s = 3,410$ ng/mL.

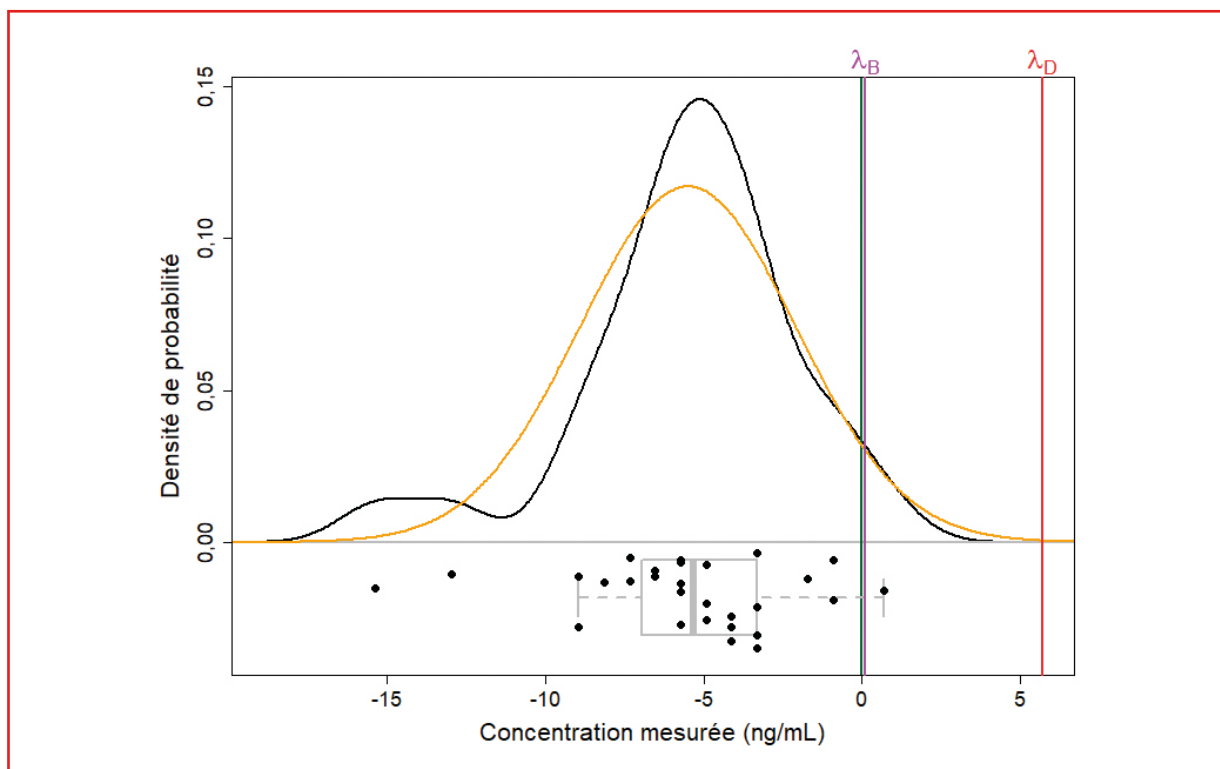


Fig. 4 - Distribution des mesures du blanc.

En noir : la distribution empirique des concentrations mesurées ; en orange : gaussienne de même moyenne et de même écart-type que l'échantillon des concentrations mesurées. Les mesures individuelles correspondent aux points sous la courbe. Le trait vert vertical correspond à la valeur nominale du blanc ; le trait violet, à la limite de blanc (pour un seuil à 5 %, λ_B) ; le trait rouge foncé, à la limite de détection (pour un seuil à 5 %, λ_D).

Limite de blanc

Si l'on accepte le modèle gaussien, la limite de blanc est donnée par la formule $\widehat{\lambda}_B = m + u_{1-\alpha} s$, soit pour un risque α fixé à 5% conduisant à $u_{1-\alpha} = u_{0,95} = 1,645$, $\widehat{\lambda}_B = -5,505 + 1,645 \times 3,410 = 0,103$ ng/mL. En d'autres termes, un blanc aurait 95 % de chances de conduire à une concentration mesurée inférieure ou égale à 0,1 ng/mL.

Remarque : en utilisant la formule plus rigoureuse de la norme NF ISO 11843-3, on trouve $\widehat{\lambda}_B = -5,505 + 1,727 \times 3,410 = 0,38$ ng/mL soit 0,4 ng/mL. On voit que, même avec 30 blancs, la différence est notable ! Elle reste cependant sans conséquence pratique, pour les contextes cliniques dans lesquels ce dosage peut être demandé.

Limite de détection

En l'absence d'échantillon dédié, l'on va supposer qu'au moins pour des concentrations faibles (comprises entre la limite de blanc et la limite de détection), l'incertitude de mesure est constante. Toujours en admettant une distribution gaussienne, la limite de détection est alors donnée par la formule $\lambda_D = m + (u_{1-\alpha} - u_{\alpha'}) s$; en supposant que l'on veuille le même risque, $\alpha' = \alpha = 5\%$, pour les deux limites, $u_{1-\alpha} = -u_{\alpha'} = 1,645$ et l'on aboutit finalement à $\widehat{\lambda_D} = -5,505 + 2 \times 1,645 \times 3,410 = 5,711$ ng/mL. En d'autres termes, pour qu'un échantillon contenant du dabigatran conduise dans 95 % des cas à une concentration mesurée supérieure à 0,1 ng/mL (limite de blanc), il doit contenir au moins 5,7 ng/mL de dabigatran.

Remarque : si l'on se fonde sur la limite de blanc obtenue par la formule de la norme AFNOR, plus rigoureuse, la limite de détection obtenue toujours selon la norme AFNOR serait maintenant de l'ordre de $-5,505 + 2 \times 1,727 \times 3,410 = 6,3$ ng/mL : l'ordre de grandeur est similaire, en particulier compte tenu des contextes cliniques dans lesquels ces dosages sont demandés. En utilisant la formule du Cofrac, on trouve $\widehat{\lambda_D} = 3 \times 3,410 = 10,23$ ng/mL : on trouve ici à une limite de détection plus grande (mais, dans d'autres situations, elle peut conduire, plus gênant, à une sous-estimation).

Limite de quantification

Compte tenu du contexte d'utilisation en clinique de cette méthode de dosage, la cible de fidélité choisie ici est une précision relative de $cv_{\max} = 15\%$ (soit ± 5 ng/mL pour une concentration de 30 ng/mL).

Dans notre exemple, on suppose que l'on ne réalise qu'une seule mesure sur l'échantillon du patient, donc $n_m = 1$; la droite d'étalonnage a été obtenue à partir de $n_e = 4$ solutions, pour lesquelles $\bar{x} = 208,5$ ng/mL et $s_x^2 = 53440$ (ng/mL)². La pente a été estimée à $a = 0,1244$ s/(ng/mL) ; l'écart-type résiduel est estimé à $\sigma_{\text{res}} \approx s_{\text{res}} = 1,149$ s. Ainsi, l'écart-type de la concentration mesurée vaut ici environ

$$s_c = \frac{1,149}{0,1244} \sqrt{\frac{1}{1} + \frac{1}{4} + \frac{(x - 208,5)^2}{53440(4 - 1)}} = 9,235 \sqrt{1,25 + 6,237 \times 10^{-6}(x - 208,5)^2}$$

L'inéquation à résoudre est alors

$$-2,576 \times 10^{-4} x^2 - 2,601 \times 10^{-3} x + 1,521 \leq 0$$

qui admet deux solutions : -82,06 ng/mL et +71,96 ng/mL. La première solution est manifestement absurde ; par ailleurs, le coefficient de x^2 étant négatif, l'inéquation sera satisfaite pour des valeurs de x après la plus grande (ou avant la plus petite) des deux racines.

La limite de quantification basse est donc 72 ng/mL.

Remarque : on voit que cette limite de quantification est nettement supérieure aux limites de blanc et de détection, quelle que soit la formule considérée pour ces dernières. L'utilisation de la formule du Cofrac, 10 s, conduit à la valeur 34,1 ng/mL, largement sous-estimée ; dans d'autres situations, elle peut conduire à une sur-estimation : en fait, rien dans sa définition ne garantit un quelconque contrôle de la fidélité...

BILAN SUR LES FORMULES PROPOSÉES PAR LES INSTANCES

Le **Tableau** propose un bilan des différentes définitions trouvées dans les plus importantes normes et recommandations évoquant les limites de détection et de quantification. Les formules sont données dans l'hypothèse d'une distribution gaussienne des valeurs des concentrations mesurées (pour une concentration réelle fixée), sans troncature (valeurs négatives des résultats de mesure possibles).

Remerciements

Je remercie Wassila Bouad, du laboratoire d'hématologie de l'hôpital Lariboisière, qui a réalisé les dosages utilisés dans l'exemple.

Je remercie Virginie Siguret et Anne Vassault pour leur relecture de cet article et les échanges autour de la problématique des limites de blanc, détection, quantification.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) AFNOR. Laboratoires de biologie médicale - Exigences concernant la qualité et la compétence, NF EN ISO 15189, décembre 2012 (norme d'application obligatoire); nouvelle version en décembre 2022 (mais dont l'application n'est pas obligatoire).
- (2) AFNOR. Capacité de détection. Partie 1 : Termes et définitions, NF ISO 11843-1, décembre 1998.
- (3) AFNOR. Capacité de détection. Partie 2 : Méthodologie de l'étalement linéaire, NF ISO 11843-2, septembre 2020
- (4) AFNOR. Capacité de détection. Partie 3 : Méthodologie pour déterminer la valeur critique d'une variable de réponse lorsque aucun étalonnage n'est utilisé, NF ISO 11843-3, septembre 2003
- (5) AFNOR. Capacité de détection. Partie 5 : Méthodologie des étalonnages linéaire et non linéaire, NF ISO 11843-5, juillet 2008.
- (6) Cofrac, Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de Biologie médicale, SH GTA 04 - révision 02, 2023, partie 8.6.1.7 « Étendue de mesure », p. 36-37.
- (7) NCCLS. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantification; approved guideline, EP17-A, vol. 24 n° 34, octobre 2004, ISBN 1-56238-551-8, ISSN 0273-3099.
- (8) ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2(R1), novembre 2005.
- (9) Vassault A, Hulin A, Chapuzet E, Arnaud J, Giroud C et les membres du sous-groupe 2 analytique de la SFBC. Vérification/validation des performances d'une méthode d'analyse, *Ann Biol Clin* (Paris) 2010 ; **68** : 247-94.
- (10) Bureau international des poids et mesure, *Vocabulaire international de métrologie – Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM)*, 3^e édition, 2008.
- (11) Curis E, Menet M-C. Quantifier les imprécisions en travaux pratiques. Détermination de la précision d'une concentration inconnue obtenue à partir d'une droite d'étalement *L'Act Chim* 2015 ; **402** : 45-9.
- (12) De Fautereau-Vassel A, Mokhtarian A, Mangenot M, Krekounian O, Kousignian I, Delavenne X, et al. Comparisons between diluted thrombin time, ecarin chromogenic assays, and UPLC-MS for plasma level dabigatran quantification: results from DRIVING study. *Int Lab Hematol* 2023 : DOI: 10.1111/ijlh.14166

Instance	Nom	Définition	Formule	Commentaire
IFCC & NCCLS (CLSI) (7)	Limite de blanc <i>Limit of Blank</i>	Plus grande valeur de concentration mesurée pouvant être obtenue avec un blanc	$m + u_{1-\alpha} s$	Définition utilisée dans cet article
	Limite de détection <i>Limit of Detection</i>	Plus petite concentration vraie conduisant à une mesure supérieure à la limite de blanc	$m + u_{1-\alpha'} s - u_{\alpha} s_M$	Définition utilisée dans cet article Toujours strictement supérieure à la limite de blanc
	Limite de quantification <i>Limit of Quantitation</i>	Plus petite concentration vraie pouvant être mesurée avec une précision suffisante		Définition utilisée dans cet article Toujours supérieure ou égale à la limite de détection
	Limite basse de la plage de mesure <i>Lower end of the measuring range</i>	Plus petite concentration vraie pour laquelle les caractéristiques de la méthode de mesure sont satisfaisantes		
	Limite basse de linéarité <i>Lower limit of linear range</i>	Concentration vraie à partir de laquelle la courbe d'étalonnage peut être assimilée à une droite		
ISO AFNOR (2-5)	Valeur critique <i>Critical value</i>	Concentration mesurée au-delà de laquelle on est conduit, pour une probabilité d'erreur α donnée, à la décision que la concentration n'est pas nulle	$m + t_{1-\alpha n-1} s \sqrt{1 + \frac{1}{n}}$	Limite de blanc
	Valeur minimale détectable <i>Minimum detectable value</i>	Concentration vraie qui conduira, avec une probabilité $(1 - \alpha')$, à la conclusion que la concentration n'est pas nulle	$m + 2 t_{1-\alpha n-1} s \sqrt{1 + \frac{1}{n}}$	Limite de détection Formule approchée, valable si $n > 4$

Tableau 1 - Formules proposées par les instances

On note σ l'écart-type des mesures de la grandeur physique utilisée pour le dosage, b la pente de la droite d'étalonnage ; m la moyenne de n valeurs des concentrations mesurées sur un échantillon blanc, s l'écart-type associé (en divisant par $n - 1$) ; s_M l'écart-type de n' valeurs des concentrations mesurées sur un échantillon de concentration réelle supposée proche de la limite de détection. Le risque associé à la limite de blanc est noté α , celui associé à la limite de détection α' — dans la majorité des cas, on aura $\alpha = \alpha'$. On note enfin u_{α} le quantile d'ordre α d'une loi normale centrée, réduite et $t_{\alpha, n}$ le quantile d'ordre α d'une loi de Student à n degrés de liberté.

Les formules sont données dans l'hypothèse d'une distribution gaussienne des valeurs des concentrations mesurées (pour une concentration réelle fixée), sans troncature (valeurs négatives des résultats de mesure possibles). Les définitions s'entendent toutes « avec un risque fixé ».

* : résultat valable en supposant un écart-type constant et les deux risques, α et α' , égaux ; s : résultat valable en postulant que $m = 0$, soit l'absence de bruit de fond.

Cofrac : Comité français d'accréditation ; ICH : International Council for Harmonisation ; IFCC : International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine ; GTA : guide technique d'analyse ; CLSI : Clinical Laboratory Standard Institute ; NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards (ancêtre du CLSI).

Instance	Nom	Définition	Formule	Commentaire
ICH (8)	Limite de détection [§] <i>Detection Limit</i>	Plus petite quantité qui peut être détectée, mais pas forcément quantifiée précisément	$3,3 \sigma_Y / b $	Limite de blanc, pour $\alpha = 0,05 \%$ Limite de détection*, pour $\alpha = \alpha' = 5 \%$
	Limite de quantification [§] <i>Quantitation limit</i>	Plus petite quantité qui peut être quantifiée avec une précision suffisante	$10 \sigma_Y / b $	Limite de blanc, pour $\alpha = 7,6 \times 10^{-24}$ Limite de détection*, pour $\alpha = \alpha' = 2,9 \times 10^{-7}$
Cofrac GTAO4 (6)	Limite de détection [§]	Plus petite concentration qui peut être distinguée avec une probabilité donnée d'un blanc de réaction réalisé dans les mêmes conditions	$m + 3s$ en l'absence de bruit de fond	Limite de blanc, pour $\alpha = 0,13 \%$ Limite de détection*, pour $\alpha = \alpha' = 6,7 \%$
	Limite de quantification [§]	Plus petite concentration mesurée fournie avec un niveau de fiabilité acceptable et d'incertitude connue	$m + 10s$ en l'absence de bruit de fond	Comparable à la définition de l'ICH
VIM (9)	Limite de détection	Valeur mesurée, obtenue par une procédure de mesure donnée, pour laquelle la probabilité de déclarer faussement l'absence d'un constituant dans un matériau est α' , étant donnée la probabilité α de déclarer faussement sa présence		

Tableau 1 - Formules proposées par les instances (suite)

On note σ l'écart-type des mesures de la grandeur physique utilisée pour le dosage, b la pente de la droite d'étalonnage; m la moyenne de n valeurs des concentrations mesurées sur un échantillon blanc, s l'écart-type associé (en divisant par $n - 1$); s_M l'écart-type de n' valeurs des concentrations mesurées sur un échantillon de concentration réelle supposée proche de la limite de détection. Le risque associé à la limite de blanc est noté α , celui associé à la limite de détection α' — dans la majorité des cas, on aura $\alpha = \alpha'$. On note enfin u_α le quantile d'ordre α d'une loi normale centrée, réduite et $t_{\alpha, n}$ le quantile d'ordre α d'une loi de Student à ν degrés de liberté.

Les formules sont données dans l'hypothèse d'une distribution gaussienne des valeurs des concentrations mesurées (pour une concentration réelle fixée), sans troncature (valeurs négatives des résultats de mesure possibles). Les définitions s'entendent toutes « avec un risque fixé ».

* : résultat valable en supposant un écart-type constant et les deux risques, α et α' , égaux; \hat{s} : résultat valable en postulant que $m = 0$, soit l'absence de bruit de fond.

Cofrac : Comité français d'accréditation; ICH : International Council for Harmonisation; IFCC : International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; GTA : guide technique d'analyse; CLSI : Clinical Laboratory Standard Institute; NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards (ancêtre du CLSI).