

## **Utilisation des plasmas de référence pour l'estimation de la précision des mesures des dosages radioimmunologiques**

Aline SOLARI

*Station centrale de Physiologie animale,  
INRA, 78350 Jouy-en-Josas, France.*

---

**Summary.** *The use of plasma references for estimating the variability of radioimmunoassay measurements.*

This article presents a method for estimating the variability of measurements in radioimmunoassays. Repeated assays are carried out on the same plasma used as a reference. The variances of repeatability (or intraassay) and reproducibility are calculated from the values obtained from the reference. These variances are used to calculate the agreement between two or more values obtained from unknown plasma.

Analysis of the values of the plasma reference completes information obtained from standard curves.

---

### **Introduction.**

La signification et l'analyse des teneurs hormonales, obtenues par les dosages radioimmunologiques, supposent que l'on dispose d'une estimation de la variabilité de la mesure. Ce paramètre caractérise la qualité et la validité de la méthode de dosage et sa connaissance est indispensable si l'on veut tester, par exemple, la signification de pics ou de pulsations dans un rythme de sécrétion. Il convient donc, avant toute analyse des données, de chiffrer l'erreur à caractère aléatoire qui affecte les résultats : la méthode de dosage utilisée étant d'autant plus fiable que cette partie aléatoire est plus faible.

Habituellement, la précision de la mesure est déduite de la précision de la gamme étalon. Or, lorsque la gamme et les échantillons biologiques ne sont pas traités exactement dans les mêmes conditions — extractions et chromatographies — cette méthode n'est pas rigoureuse. Une estimation indirecte de la variabilité est obtenue par l'analyse des résultats de plusieurs dosages effectués sur un même produit dit plasma de référence. Celui-ci, réparti en plusieurs échantillons aussi semblables que possible, est inclus systématiquement dans tous les dosages avec un nombre de répétitions pouvant être égal ou supérieur à deux. Les valeurs obtenues permettent de caractériser la précision des mesures par les variances de répétabilité et de reproductibilité qui sont estimées par des

techniques statistiques classiques, à savoir l'analyse de variance suivie de l'estimation des composantes de variance.

### Définition et estimation de la variance de répétabilité et de la variance de reproductibilité.

#### 1. Définition.

Même si une méthode de dosage est standardisée et même si elle est appliquée correctement, les résultats que l'on obtient fluctuent autour de la « vraie valeur ou vraie teneur inconnue  $m$  » en raison de deux sources d'erreur : — l'une caractérisant la variabilité des  $n$  mesures effectuées sur un même plasma au cours d'un dosage, — l'autre consécutive à la différence des teneurs moyennes entre les dosages.

On symbolise ce qui précède par le modèle additif suivant :

$$(1) \quad x_{ij} = m + L_j + r_{ij}$$

où  $x_{ij}$  désigne la  $i$ -ème répétition au cours du dosage  $j$  ;  $i = 2$  à  $n$  ;  $j = 1$  à  $p$  (tabl. 1a) ;

$m$  la teneur vraie, mais inconnue, de la substance contenue dans le plasma de référence ;

$L_j$  la part imputable à l'effet propre du dosage  $j$  ;  $L_j$  est une variable aléatoire de moyenne 0 et de variance  $V(L)$  ;

$r_{ij}$  l'erreur aléatoire de mesure affectant chaque répétition ;  $r_{ij}$  est une variable de moyenne 0 et de variance  $\sigma_j^2$  ; lorsque les  $p$  variances sont identiques, on symbolise la variabilité par  $V(r)$ .

Par conséquent :

$V(L)$  désigne la variance de la variable aléatoire représentant l'effet propre du dosage. Cette quantité est également appelée composante de la variance due aux dosages ; elle est d'autant plus faible que les dosages sont peu différents.

$V(r)$  appelée *variance de répétabilité* ou variance intra-dosage, représente la variance des résultats lorsque l'on effectue un grand nombre de répétitions du plasma de référence au cours d'un seul dosage.

En supposant les variables  $L_j$  et  $r_{ij}$  indépendantes, on montre que la variance totale de la variable  $x_{ij}$  est :

$$(2) \quad (1) \quad V(R) = V(L) + V(r).$$

On appelle  $V(R)$  *variance de reproductibilité* ou variance totale ; elle est toujours égale ou supérieure à la variance de répétabilité  $V(r)$ .

#### 2. Estimation de la variance de répétabilité $V(r)$ et de la variance de reproductibilité $V(R) = V(r) + V(L)$ . (Lellouch et Lazar, 1974 ; Snedecor et Cochran, 1971 ; AFNOR, 1970a,b).

Elles sont estimées par la méthode d'analyse de variance à un facteur de classi-

(1) La variance d'une variable  $x_{ij}$  s'écrit par définition  $V(x) = E(x - m)^2$  où  $E$  = espérance mathématique. D'après (1)  $V(x) = E(L + r)^2$ . En raison de l'hypothèse d'indépendance entre  $L$  et  $r$  et de la nullité des moyennes respectives de  $L_j$  et de  $r_{ij}$ , on a  $E(Lr) = 0$ , ce qui donne :  $V(x) = E(L^2) + E(r^2) = V(L) + V(r)$ .

fication (2), modèle à effets aléatoires (3). Cette méthode est caractérisée par l'équation classique suivante (tabl. 1a,b) :

$$\sum_j \sum_i (x_{ij} - \bar{x})^2 = \sum_j \sum_i (x_{ij} - \bar{x}_j)^2 + n \sum_j (\bar{x}_j - \bar{x})^2$$

où  $\bar{x}$  = moyenne générale ;  $\bar{x}_j$  = moyenne pour le dosage  $j$ ,  $j = 1$  à  $p$  ;  $n$  = nombre de répétitions par dosage.

Pour des facilités d'écriture, l'équation précédente est symbolisée par :  $Q_T = Q_r + Q_L$ .

Les degrés de liberté qui correspondent à ces sommes des carrés sont :  $np - 1 = p(n - 1) + (p - 1)$ .

Le rapport entre les sommes des carrés et les degrés de liberté donne les carrés moyens intra- et inter-dosage,  $Q_r/p(n - 1)$  et  $Q_L/(p - 1)$ , ainsi que le carré moyen total  $Q_T/(np - 1)$ .

En supposant les  $p$  variances  $s_j^2$  (4) homogènes (tabl. 1a), on montre que le carré moyen intra-dosage est une estimation sans biais de la variance de répétabilité (tabl. 1b) :

$$(3) \quad E(Q_r/p(n - 1)) = V(r)$$

On en déduit l'estimation de la variance de répétabilité, notée  $\hat{V}(r)$ , qui est égale à la moyenne des  $p$  variances observées, soit :

$$(4) \quad \hat{V}(r) = Q_r/p(n - 1) = \frac{1}{p} \sum s_j^2$$

L'espérance mathématique du carré moyen inter-dosage est égale à (tabl. 1b) :

$$(5) \quad E(Q_L/(p - 1)) = V(r) + nV(L)$$

De (5) on déduit l'estimation de  $V(L)$ , notée  $\hat{V}(L)$  :

$$(6) \quad \hat{V}(L) = \frac{1}{n} \left( \frac{Q_L}{p - 1} - \frac{Q_r}{p(n - 1)} \right)$$

En combinant la relation 2 et les relations 3 et 6, on obtient l'estimation de la variance de reproductibilité  $\hat{V}(R)$ , soit :

$$(7) \quad \hat{V}(R) = \frac{1}{n} \left( \frac{Q_r}{p} + \frac{Q_L}{(p - 1)} \right)$$

En conclusion, les carrés moyens inter-dosage et total, utilisés parfois pour chiffrer la reproductibilité des dosages, ne sont pas des estimations correctes de la précision totale des mesures. Ils diffèrent d'autant plus de  $V(R)$  que le nombre de répétitions augmente.

(2) Facteur de classification = facteur dosage.

(3) Dans le modèle aléatoire les  $p$  dosages sont considérés comme des échantillons aléatoires provenant d'une population infinie de dosages.

(4)  $s_j^2$  = variance observée par dosage, estimation de  $\sigma_j^2$ .

TABLEAU 1

Présentation générale des symboles utilisés dans l'analyse de variance

## a) Données individuelles et caractéristiques intra-dosage

Dosage	Répétitions $x_{ij}$				Total $T_j$	Moyenne $\bar{x}_j$	Variance $s_j^2$
1	$x_{11}$	$x_{21}$	$x_{i1}$	$x_{n1}$	$T_1$	$\bar{x}_1$	$s_1^2$
2	$x_{12}$	$x_{22}$	$x_{i2}$	$x_{n2}$	$T_2$	$\bar{x}_2$	$s_2^2$
...							
j	$x_{1j}$	$x_{2j}$	$x_{ij}$	$x_{nj}$	$T_j$	$\bar{x}_j$	$s_j^2$
...							
p	$x_{1p}$	$x_{2p}$	$x_{ip}$	$x_{np}$	$T_p$	$\bar{x}_p$	$s_p^2$
					$T$	$\bar{x}$	

## b) Tableau d'analyse de variance

Source de variation	Somme des carrés des écarts	Degrés de liberté	Carré moyen	Espérance mathématique des carrés moyens
Due à la différence entre les dosages (inter-dosage) <sup>(1)</sup>	$Q_L = n \sum_j (\bar{x}_j - \bar{x})^2$ $\frac{1}{n} (\sum_j T_j^2 - T^2/p)$	$p - 1$	$Q_L/(p - 1)$	$V(r) + nV(L)$
Due à la différence entre les répétitions dans les dosages (intra-dosage) <sup>(1)</sup>	$Q_r = \sum_j \sum_i (x_{ij} - \bar{x}_j)^2$ $= \sum_j (n - 1) s_j^2$	$p(n - 1)$	$Q_r/p(n - 1)$	$V(r)$
Total	$Q_T = \sum_j \sum_i (x_{ij} - \bar{x})^2$ $= \sum_j \sum_i x_{ij}^2 - T^2/np$	$pn - 1$	$Q_T/(pn - 1)$	$V(r) + \frac{n(p - 1)}{pn - 1} V(L)$ <sup>(2)</sup>

$x_{ij}$  :  $i$  ème mesure du plasma de référence obtenue dans le  $j$  ème dosage.

$T_j$  : Total des mesures du  $j$  ème dosage =  $\sum_i x_{ij}$

$T$  : Total pour l'ensemble des dosages =  $\sum_j T_j = \sum_j \sum_i x_{ij}$

$\bar{x}_j$  : Moyenne du dosage  $j = T_j/n$

$\bar{x}$  : Moyenne générale =  $T/np$

$s_j^2$  : Variance des observations dans le dosage  $j = \sum_i (x_{ij} - \bar{x}_j)^2 / (n - 1)$

Quand  $n = 2$  (2 répétitions  $x_{1j}$  et  $x_{2j}$ ),  $s_j^2 = W_j^2/2$  avec  $W_j = |x_{1j} - x_{2j}| =$  étendue.

<sup>(1)</sup> Mode de calcul des sommes des carrés.

<sup>(2)</sup> Dagnelie (1965).

### 3. Détermination du nombre de répétitions par dosage et du nombre de dosages.

La précision des estimations des variances de répétabilité et de reproductibilité dépend du nombre de répétitions (n) et du nombre de dosages (p).

Deux ou trois répétitions par dosage sont suffisantes lorsque le nombre de dosages est supérieur à 12. Par contre, pour un nombre limité de dosages, il faut envisager un plus grand nombre de répétitions du plasma de référence au cours du même dosage ( $n > 10$  quand p très faible), afin de calculer l'estimation de la variance de répétabilité (Ulmo *et al.*, 1957 ; Dagnelie, 1965 ; AFNOR, 1970a ; Vessereau, 1974). Avant d'entreprendre une série importante de dosages, il est recommandé d'effectuer un dosage préliminaire composé de 10, voire 20 répétitions du plasma de référence. L'analyse des valeurs permettra de chiffrer la variabilité relative (ou coefficient de variation = 100 écart-type/moyenne) et de comparer la distribution observée des mesures à la distribution gaussienne, dite également distribution normale (Vessereau, 1974 ; Morice, 1972). L'hypothèse gaussienne est fondamentale pour la comparaison des variances intra-dosages et pour le calcul de l'intervalle de confiance des teneurs moyennes (intervalle symétrique en valeurs et en probabilités).

TABLEAU 2

Estimation de la répétabilité et de la reproductibilité à partir de 14 dosages du plasma A  
a) Teneurs individuelles

Dosage n°	Concentrations		Moyenne $\bar{x}_j$ pg/ml	Variance $s_j^2 = \frac{W^2}{2} j$	Ecart-type $s_j$	Coefficient de variation $100 s_j / \bar{x}_j$	Ecart $W_j$
	1	2					
1	1 384	1 425	1 405	840,5	29	2,1	41
2	2 532	2 279	2 406	32 004,5	179	7,4	253
3	1 840	1 864	1 852	288,0	17	0,9	24
4	1 696	2 031	1 864	56 112,5	237	12,7	335
5	2 187	2 231	2 209	968,0	31	1,4	44
6	2 592	3 048	2 820	103 968,0	322	11,4	456
7	3 799	3 246	3 523	152 904,5	391	11,1	553
8	3 042	2 865	2 954	15 664,5	125	4,2	177
9	2 810	2 460	2 635	61 250,0	247	9,4	350
10	1 534	1 570	1 552	648,0	26	1,7	36
11	2 023	2 003	2 013	200,0	14	0,7	20
12	2 105	2 047	2 076	1 682,0	41	2,0	58
13	2 518	1 799	2 159	258 480,5	508	23,5	719
14	2 684	2 338	2 511	59 858,0	245	9,8	346

Concentration moyenne  $\bar{x} = 2 284$  pg/ml.

#### b) Analyse de variance

Source de variation	Sommes des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen
Entre les dosages	8 539 539 = $Q_L$	13	656 887,6
Intra-dosage	744 869 = $Q_r$	14	53 204,9
Total	9 284 408	27	

#### 4. Exemple.

Les quantités de testostérone contenues dans 2 plasmas (A et B) ont été mesurées au cours de 14 dosages à raison de 2 répétitions, chacune dosée en double par plasma et par dosage (tabl. 2a).

Le plasma de référence A contient en moyenne 2 284 pg/ml de testostérone. On note une hétérogénéité importante entre les dosages puisque les teneurs moyennes varient de 1 405 pg/ml à 3 523 pg/ml ; 13 dosages sur 14 présentent un coefficient de variation inférieur à 13 p. 100 (tabl. 2a). Compte tenu du faible nombre de répétitions ( $n = 2$ ), le test d'homogénéité des variances ne met pas en évidence de différences significatives entre les  $s_j^2$  (test de Cochran, cité par Vessereau, 1974).

L'estimation de la variance de répétabilité est égale au carré moyen intra-dosage (tabl. 2b), soit :

$\hat{V}(r) = 53\,204,9$  (basée sur 14 degrés de liberté) ce qui donne comme écart-type et coefficient de variation respectivement 231 pg/ml et 10 p. 100 (tabl. 3).

La variance de reproductibilité est égale à (équation 7) :

$$\hat{V}(R) = \frac{1}{2} (53\,204,9 + 656\,887,6) = 355\,046,3 \text{ (tabl. 2b) ce qui donne un}$$

écart-type de 596 pg/ml et un coefficient de variation de 26 p. 100 (tabl. 3).

TABLEAU 3

*Evolution des critères de répétabilité et de reproductibilité en fonction de la concentration du stéroïde dans le plasma*

Stéroïde	Expérimentateur	Plasma	Concentration moyenne pg/ml $\bar{x}$	Répétabilité		Reproductibilité	
				E.T. pg/ml	C.V. (%)	E.T. pg/ml	C.V. (%)
Testostérone	1 <sup>er</sup> p = 14 n = 2	A	2 284	231	10	596	26
		B	807	146	18	284	35
	2 <sup>e</sup> p = 6 n = 3	A	2 394	263	11	(a)	
		B	1 040	166	16		
Progesterone	3 <sup>e</sup> p = 1 n = 10	Brebis au 139 <sup>e</sup> jour de gestation	8 520	341	4	(a)	
		Brebis au dernier jour de gestation	3 300	297	9		
		Brebis cyclique	1 300	186	14		
		Brebis castrée	630	126	20		

p = nombre de dosages ; n = nombre de répétitions par dosage (quel que soit l'expérimentateur chaque répétition est dosée en double).

E.T. = écart-type ; C.V. = coefficient de variation = E.T./ $\bar{x}$ .

(a) Non calculée en raison du faible nombre de dosages.

Pour le plasma B, la teneur moyenne générale est de 807 pg/ml ; les moyennes par dosage varient de 450 pg/ml à 1 149 pg/ml. Quant aux coefficients de variation, ils sont compris entre 10 et 28 %. L'hypothèse d'homogénéité des variances n'ayant pas été rejetée on calcule les critères de répétabilité et de reproductibilité (tabl. 3).

Quel que soit le dosage les teneurs individuelles du plasma B sont systématiquement inférieures à celles de A. Il lui correspond également les plus faibles variances de répétabilité et de reproductibilité, par contre, les coefficients de variation sont plus élevés (tabl. 3).

Les plasmas A et B ont également servi de référence à un 2<sup>e</sup> expérimentateur. Les concentrations moyennes et critères de répétabilité sont proches des précédents (tabl. 3). Ces valeurs ont été obtenues après 6 dosages comprenant 3 répétitions par plasma.

Les estimations de la variance de répétabilité et du coefficient de variation ont été calculées par cette méthode pour un autre stéroïde : la progestérone. Un seul dosage a été effectué sur 4 plasmas de brebis à des stades physiologiques différents, à raison de 10 répétitions (en double) par plasma. Le coefficient de variation des plasmas faiblement concentrés en progestérone atteint 20 p. 100 alors qu'il est proche de 10 p. 100 lorsque les concentrations sont de 1 330 pg/ml et 3 300 pg/ml (tabl. 3).

En conclusion, la variance de répétabilité augmente avec la concentration moyenne alors que le coefficient de variation diminue ; on trouve les valeurs maximales (20 p. 100) lorsque les teneurs sont inférieures à 1 000 pg/ml quels que soient l'opérateur et le stéroïde.

### **Interprétation et utilisation pratique de la répétabilité et de la reproductibilité dans les dosages radioimmunologiques (AFNOR, 1970a et b ; Vesseureau, 1974).**

Les dosages radioimmunologiques comprennent généralement 2 ou 3 plasmas de référence (à 2 ou 3 répétitions chacun) et un grand nombre d'échantillons inconnus <sup>(5)</sup> sans répétition. L'estimation de la variabilité, pour chaque échantillon, est donc impossible mais on peut penser que cette variabilité est du même ordre de grandeur que celle trouvée dans le plasma de référence. Cette hypothèse de travail permet de calculer les limites de confiance et d'évaluer l'écart à ne pas dépasser pour que 2 ou plusieurs échantillons soient considérés comme comparables.

#### *1. Utilisation de la répétabilité.*

Si les mesures d'un plasma de référence suivent une distribution gaussienne, celles-ci se situent, avec un coefficient de confiance de 95 p. 100, dans les limites  $\bar{x} \pm 1,96 \sqrt{\hat{V}(r)}$  <sup>(6)</sup> où  $\bar{x}$  est la moyenne des mesures et  $\hat{V}(r)$  la variance de répétabilité.

<sup>(5)</sup> « Inconnus » par opposition aux plasmas de référence qui font partie de tous les dosages.

<sup>(6)</sup> C'est une relation fondamentale de la loi de Gauss. En effet, si  $x$  suit une loi de Gauss de moyenne  $m$  et de variance  $V(x)$ , nous avons une probabilité de 0,95 de trouver des valeurs de  $(\bar{x} - m)/\sqrt{V(x)}$  comprises entre les limites  $- 1,96$  et  $+ 1,96$ .

De même, si la valeur moyenne  $\bar{y}$  d'un échantillon inconnu est comprise dans les limites précédentes, elle est considérée comme une variable gaussienne de variance  $\hat{V}(r)/k$  où  $k$  représente le nombre de répétitions effectuées au cours du même dosage ( $k$  est généralement égal à 1). En fonction de la relation fondamentale de la loi de Gauss, la quantité moyenne vraie de substance contenue dans l'échantillon inconnu se situe dans les limites suivantes :

$$(8) \quad \bar{y} \pm 1,96 \sqrt{\hat{V}(r)/k}$$

ce qui permet d'affecter des limites de confiance à tous les points d'une courbe de sécrétion.

La variance de répétabilité  $V(r)$  sert également de référence pour la comparaison de 2 ou plusieurs échantillons inconnus dont les teneurs sont obtenues au cours du même dosage.

Pour que deux valeurs ( $y_1$  et  $y_2$ ) puissent être considérées comme des mesures provenant d'un même échantillon ou de deux échantillons identiques leur écart ou étendue — noté  $W = |y_1 - y_2|$  — ne doit pas être trop important. La limite à ne pas dépasser est fonction de la variance de répétabilité. En effet, la variance d'une mesure étant désignée par  $V(r)$ , celle de la différence entre deux mesures indépendantes est égale à leur somme, soit :

$$V(|y_1 - y_2|) = V(y_1) + V(y_2) = 2 V(r)$$

si les 2 mesures proviennent d'échantillons identiques on doit trouver :

$$(9) \quad \frac{W}{\sqrt{2 V(r)}} \leq 1,96, \text{ soit :}$$

$$W \leq 2,77 \sqrt{\hat{V}(r)}$$

Par conséquent, la quantité  $2,77 \sqrt{\hat{V}(r)}$  représente l'écart entre deux résultats qui, dans une longue série d'essais, ne serait dépassé que dans 5 cas sur 100 lorsque l'on applique normalement et correctement cette méthode de dosage sur le même produit.

En conclusion, si l'écart entre deux valeurs,  $y_1$  et  $y_2$ , est supérieur à  $2,77 \sqrt{\hat{V}(r)}$ , on peut rejeter au risque 0,05 soit l'hypothèse d'une répétabilité correcte, soit l'hypothèse d'homogénéité entre les deux échantillons biologiques.

Par exemple, un échantillon est significativement différent du plasma de référence A (tabl. 3) si l'écart entre les teneurs moyennes est supérieur à 640 pg/ml ( $P < 0,05$ ).

Pour considérer  $k$  mesures  $y_1, y_2 \dots y_k$ , comme issues d'un même échantillon biologique l'étendue,  $W = |y_{\max} - y_{\min}|$  (7), ne doit pas dépasser un certain seuil, à savoir :

$$(10) \quad (8) \quad W < A_n \cdot 2,77 \sqrt{\hat{V}(r)} \quad (\text{Vessereau, 1974})$$

(7) Différence entre les valeurs extrêmes.

(8) Les normes AFNOR préconisent la relation équivalente :  $W < D_n \sqrt{V(r)}$  où  $D_n = A_n \cdot 2,77$  (AFNOR, 1970a).



où  $A_n$  est une valeur déduite de la loi de distribution de l'étendue (dans le cas d'une distribution gaussienne) et qui est fonction du nombre  $k$  de résultats (tabl. 4). Si  $k = 3$  et  $\sqrt{\hat{V}(r)} = 231$ , l'écart maximum tolérable entre les valeurs extrêmes est égal à 765 pg/ml. Si l'écart observé est supérieur à cette valeur on rejette soit l'hypothèse d'une répétabilité correcte soit l'hypothèse d'homogénéité des  $k$  échantillons.

TABLEAU 4

Variation de  $A_n$  en fonction du nombre de répétitions par dosage (Vessereau, 1974)

n Nombre de répétitions	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$A_n$	1	1,17	1,28	1,36	1,42	1,47	1,52	1,55	1,53

*Application.* — Au cours du 14<sup>e</sup> dosage (tabl. 2) la testostérone contenue dans 10 échantillons de plasma de lièvre a été mesurée pour la première fois. Ils correspondent à des prélèvements effectués sur le même animal mais à des périodes différentes.

Pour chacune des 10 concentrations il s'agit de trouver les limites de confiance à 0,95 en tenant compte des coefficients de variations de répétabilité qui sont de 10 p. 100 pour le plasma A et de 18 p. 100 pour le plasma B.

Dans un premier temps les limites sont calculées pour chacune des 2 répétitions des plasmas de référence (14<sup>e</sup> dosage).

Plasma	Moyenne pg/ml	Ecart-type <sup>(9)</sup> pg/ml	Répétition 1	Répétition 2
A	2 511	251	2 684 ± 492 (3 176 ; 2 192)	2 338 ± 492 (2 830 ; 1 846)
B	1 149	207	1 247 ± 414 (1 661 ; 833)	1 051 ± 414 (1 465 ; 637)

Des résultats précédents, on déduit la valeur délimitant les intervalles de variation propre à chaque plasma de référence. Elle est approximativement égale à 1 750 pg/ml et permet un classement grossier des échantillons.

Une variabilité de 10 p. 100 est affectée aux échantillons inconnus dont la concentration en testostérone est supérieure à 1 750 pg/ml et de 18 p. 100 aux autres. Les limites de confiance sont ensuite calculées et mises en parallèle avec celles obtenues à partir de la gamme étalon du 14<sup>e</sup> dosage <sup>(10)</sup>. Les limites sont

<sup>(9)</sup> Ecart-type = moyenne du dosage × coefficient de variation de répétabilité.

<sup>(10)</sup> Le calcul des paramètres de la gamme étalon et des limites de confiance est basé sur les travaux de Finney (1978). Le programme, modifié et adapté par S. Huet (Laboratoire Biométrie, INRA), permet d'ajuster en particulier des courbes logistiques ou gaussiennes aux valeurs observées de la gamme étalon.

corrigées par les quantités de radioactivité récupérées après extraction qui, dans cet exemple, varient de 90 à 100 p. 100 (fig. 1).

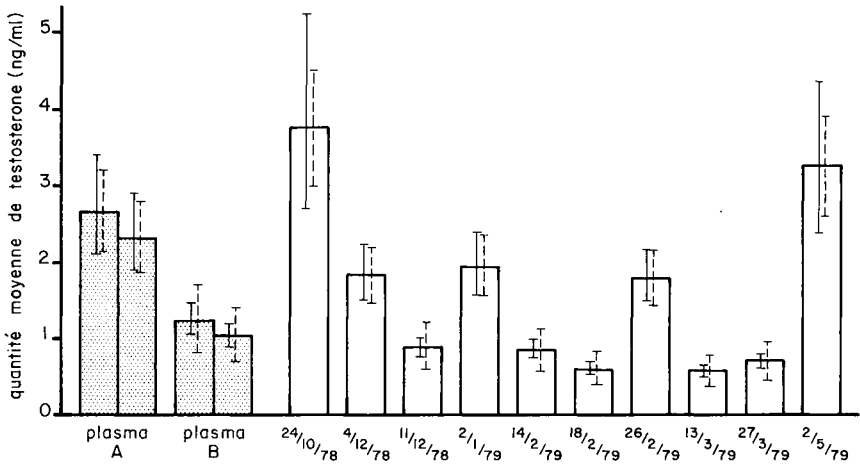


FIG. 1. — Evolution de la testostérone du 29 octobre 1978 au 2 mai 1979, pour l'animal 1.  
 - - - - limites calculées à partir du coefficient de variation de la répétabilité (14 dosages) ;  
 ——— limites calculées à partir des limites de confiance de la gamme étalon.

Le dernier dosage ne présente pas une augmentation de la variabilité puisque les intervalles de confiance sont généralement plus petits ou du même ordre de grandeur que ceux obtenus avec la variance de répétabilité. Les 2 méthodes mettent en lumière le même phénomène à savoir l'existence de 3 groupes de valeurs.

Le coefficient de variation calculé sur les 10 concentrations est de 69 p. 100, valeur supérieure à celles des plasmas de référence et qui traduit l'hétérogénéité entre les concentrations. Des tests permettant d'éliminer d'un échantillon une ou plusieurs valeurs extrêmes peuvent également être utilisés (Dixon, 1953).

## 2. Utilisation de la reproductibilité.

Pour tester la signification de l'écart entre les teneurs de deux ou de plusieurs échantillons inconnus mesurés dans des dosages différents, on doit faire intervenir la reproductibilité. Celle-ci représente l'erreur totale et confère aux résultats une généralité qu'ils n'ont pas lorsque l'on tient compte uniquement de la répétabilité. Cependant, la précision de la reproductibilité est fonction du nombre de dosages, effectués de préférence en temps limité, ce qui diminue l'intérêt de ce critère.

Les hypothèses et relations sont semblables aux précédentes mais  $\hat{V}(r)$  est remplacé par  $\hat{V}(R)$ . Les mesures sont considérées comme des variables aléatoires provenant d'une population gaussienne de moyenne  $m$  et de variance  $V(R) = V(r) + V(L)$ .

L'intervalle de confiance, à 0,95, de la concentration moyenne d'une substance contenue dans un échantillon inconnu est caractérisé par :

$$\bar{y} \pm 1,96 \sqrt{\hat{V}(R)/k}$$

où  $\bar{y}$  représente la moyenne de  $k$  mesures obtenues dans  $k$  dosages différents.

La comparaison entre deux valeurs obtenues dans deux dosages différents s'effectue également en remplaçant  $\hat{V}(r)$  par  $\hat{V}(R)$  dans la relation (10).

Ainsi la quantité  $2,77 \sqrt{\hat{V}(R)}$  représente l'écart à ne pas dépasser pour que 2 teneurs obtenues dans des dosages différents puissent être comparables. Si l'écart observé est supérieur à  $2,77 \sqrt{\hat{V}(R)}$  on pourra envisager l'existence de fluctuations dont l'origine n'est pas due au hasard.

## Conclusion.

Lorsque les échantillons biologiques et la gamme étalon ne sont pas traités exactement dans les mêmes conditions, il est possible d'obtenir une évaluation indirecte de la précision des mesures, en introduisant systématiquement dans chaque dosage les mêmes plasmas de référence. Ces derniers permettent d'estimer la variabilité intra-dosage ou variance de répétabilité, qui caractérise la dispersion des mesures au cours d'un dosage et qui englobe toutes les causes de variation incontrôlées. Son estimation nécessite soit un grand nombre de dosages pour un nombre faible de répétitions, soit un grand nombre de répétitions par dosage. Plusieurs plasmas de référence, de forte, moyenne et faible concentration (dans les limites de variation de la gamme), doivent être sélectionnés car la variance de répétabilité augmente avec la concentration moyenne. Par contre, le coefficient de variation diminue et semble constant par zone de valeurs quels que soient le stéroïde et l'opérateur : il est proche de 10 p. 100 pour des concentrations comprises entre 2 000 et 3 000 pg/ml mais atteint 20 p. 100 pour des concentrations inférieures à 1 000 pg/ml. La stabilité des coefficients de variation intra-dosage est un bon indicateur de la qualité du dosage, leur comparaison se réduit à celle des variances calculées après transformation logarithmique des mesures (Dagnelie, 1970). Les relations présentées dans cet article impliquent l'homogénéité des variances intra-dosage et la distribution gaussienne des erreurs. Des résultats aberrants, dus principalement à des causes techniques, peuvent conduire au rejet de ces hypothèses. Dans ce cas, ils sont éliminés, les tests et les estimations sont repris sur les valeurs restantes. Le nombre d'éliminations ne doit pas dépasser 10 p. 100 de l'ensemble des résultats pour que les variances de répétabilité et de reproductibilité aient un sens. Lorsque l'hétérogénéité des variances et l'écart à la distribution gaussienne ne sont pas imputables à la présence de valeurs aberrantes, il faut rechercher la cause de cette hétérogénéité en procédant à un examen critique des conditions de réalisation des dosages. Par exemple, si les dosages successifs sont réalisés par plusieurs opérateurs qui diffèrent par leur technicité, celle-ci se manifestera par l'hétérogénéité des variances intra-dosage. Pour séparer les effets des facteurs dosage et opérateur, des plans expé-

rimementaux plus complexes doivent être envisagés et analysés par l'analyse de variance à plusieurs facteurs.

*Reçu en juin 1981.  
Accepté en août 1982.*

*Remerciements.* — Je remercie la Station centrale de Physiologie animale (INRA) et le Laboratoire de Physiologie de la Lactation (INRA) qui ont fourni les résultats de dosages.

### Références

- AFNOR NF X 06-041, 1970a. *Fidélité d'une méthode d'essai. Guide pour les essais interlaboratoires.*
- AFNOR NF M07-OEE, 1970b. *Spécifications des produits pétroliers et validité des résultats d'essai en fonction de la fidélité des méthodes.*
- DAGNELIE P., 1965. *Cours de statistique mathématique*, vol. II. Association et maison des étudiants. Fac. Sci. agron. Etat, Gembloux.
- DAGNELIE P., 1970. A propos de la relation entre le coefficient de variation d'une variable aléatoire et l'écart-type de son logarithme. *Biom. Prax.*, **11**, 117-123.
- DIXON W. J., 1953. Processing data for outliers. *Biometrics*, **22**, 74-89.
- FINNEY D. J., 1978. *Statistical methods in biological assay*. 3rd ed. Charles Griffin & Co Ltd.
- LELLOUCH J., LAZAR Ph., 1974. *Méthodes statistiques en expérimentation biologique*. Flammarion ed., Paris.
- MORICE E., 1972. Tests de normalité d'une distribution observée. *Rev. Statist. appl.*, **20**, 5-35.
- ULMO J., SCHWARTZ D., VESSEREAU A., 1957. Problèmes relatifs aux échantillonnages à plusieurs niveaux. *Dev. Statist. appl.*, **5**, 57-66.
- SNEDECOR G. W., COCHRAN W. G., 1971. *Méthodes statistiques*, 6<sup>e</sup> éd., A.C.T.A. ed. Paris.
- VESSEREAU A., 1974. Essais interlaboratoires pour l'estimation de la fidélité des méthodes d'essais. *Rev. Statist. appl.*, **22**, 5-48.
-