

De nouveaux critères de sélection des méthodes quantitatives d'analyse fondés sur l'incertitude de mesure : Application à une méthode HPLC d'analyse des catécholamines.

Stéphane Andanson¹, Quentin Delahaye¹, Christine Ravel¹, Max H. Feinberg²

Résumé. De nombreuses études biologiques ont pour objectif de mesurer l'effet d'un stimulus ou d'un traitement sur les concentrations de biomarqueurs dans les tissus biologiques. Pour ce faire, il faut sélectionner la méthode d'analyse la mieux adaptée, capable de détecter une différence entre les concentrations avant et après traitement. Nous avons récemment publié une approche pour effectuer cette sélection. Elle s'appuie sur un critère appelé « seuil de discrimination » (*SD*). La présente publication explique son application à une méthode analytique HPLC, développée pour déterminer les teneurs plasmatiques en adrénaline et en noradrénaline des bovins, dans le cadre d'une étude de détection du stress. Pratiquement, le *SD* est dérivé de l'incertitude de mesure (*IM*) et combine la variabilité de la méthode analytique et le niveau de réponse du biomarqueur. L'incertitude de mesure est facile à obtenir quand on connaît la fonction d'incertitude de la méthode qui s'obtient à l'issue de l'étude de validation. Les niveaux de réponse des marqueurs (ici l'adrénaline et la noradrénaline) sont modélisés à partir d'une étude bibliographique. La méthode d'analyse proposée s'avère adaptée lorsque la variation des taux plasmatiques dépasse 2 ng.ml⁻¹ pour l'adrénaline et 2.5 ng.ml⁻¹ pour la noradrénaline.

Mots clés : Seuil de discrimination, critère de sélection, incertitude de mesure, profil d'exactitude, adrénaline, noradrénaline, plasma bovin, méthode HPLC

Abstract. A lot of biological studies try to measure a stimulus effect or a treatment on biomarker concentrations in biological tissues. To do so, the analysis method would be able to detect a difference between concentrations before and after treatment. We have recently published a paper that describe the way to choice the best method. It is based upon a « threshold discrimination » criterion (*SD* in French). Now, to study stress detection, this paper tries to apply the HPLC analytical method developed to determine adrenaline and noradrenaline levels on beef plasma. The *SD* is derived from the measure uncertainty (*IM*) and combines the variability of the analytical method and the response level of biomarkers. The measurement uncertainty is easy to obtain when the uncertainty method function is known. The level responses of biomarkers (adrenaline and noradrenaline) are modelised through a bibliographic study. The proposed analytical method fits well when the variation of plasma rates go beyond 2 ng.ml⁻¹ for adrenaline and 2.5 ng.ml⁻¹ for noradrenaline.

Keywords : discrimination threshold, selection criterion, measurement uncertainty, exactness profile, adrenaline, noradrenaline, beef plasma, HPLC method

Introduction

Les méthodes d'analyse physicochimiques ou biochimiques ont un rôle majeur dans la conduite des études biologiques ou cliniques. Elles servent à mesurer des analytes, en l'occurrence appelés biomarqueurs, dont les variations permettent de quantifier l'effet d'un stimulus ou d'un traitement. Il revient à l'analyste de sélectionner une méthode, la mettre au point et décider, à l'issue de sa validation, de son adéquation aux objectifs (*fitness-for-purpose*) de l'étude. Parmi les divers objectifs assignés à une méthode, il en est deux principaux.

- Objectif 1. La méthode permet-elle de décider si les mesures faites sur un individu avant et après stimulus/traitement démontrent un effet ? Pour remplir cet objectif, un critère appelé le seuil de discrimination³

¹ Université Clermont Auvergne, INRA, Vetagro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint Genès Champanelle, France
stephane.andanson@inra.fr (auteur de correspondance)

² 100 Boulevard Kellermann, F-75013 Paris, France

³ Les termes soulignés sont définis dans le VIM (2012)

(SD) a été développé. Il a fait l'objet d'une publication (Andanson, 2018) et on reviendra sur son application.

- Objectif 2. La méthode permet-elle de décider si les mesures moyennes obtenues sur un ou plusieurs groupes d'individus avant et après stimulus/traitement permettent de dire que celui-ci a eu un effet ? on parle souvent d'étude cas-témoin. Dans ce cas, le ou les effectifs jouent un rôle important et il convient de définir leur taille minimale. L'expérimentation sur des êtres vivants répond en effet à de fortes contraintes éthiques.

Cependant, pour prendre ce type de décision, il faut tenir compte de la variabilité intrinsèque des mesures chimiques. Suite au développement de l'assurance qualité dans les laboratoires, le critère universellement conseillé pour estimer cette variabilité s'appelle l'incertitude de mesure (IM) car elle permet de tenir compte de la probabilité de distribution des mesures à travers le concept d'intervalle élargi. Le but de cet article est de montrer comment la fonction d'incertitude d'une méthode d'analyse peut être utilisée pour atteindre les deux objectifs précités.

À titre d'illustration, une méthode pour l'étude du stress animal – comme réponse à des menaces – est présentée et son aptitude à remplir les objectifs est évaluée. On sait depuis longtemps que le stress provoque divers changements physiologiques. Plusieurs transmetteurs et/ou hormones sont alors secrétés et leurs niveaux de concentration plasmatiques ou sanguins sont modifiés (Moberg et Mench, 2000). En particulier, les taux de catécholamines, comme l'adrénaline et la noradrénaline, varient car ils jouent un rôle majeur dans le fonctionnement du système nerveux autonome et les réponses hypophyso-surréaliennes. Ces analytes peuvent alors être utilisés comme biomarqueurs du stress, qu'il soit aigu ou chronique. Chez les bovins, les taux plasmatiques « normaux » de l'adrénaline et de la noradrénaline se situent vers 0,7 et 1,1 ng.ml⁻¹ respectivement. Ils peuvent atteindre 15 à 20 ng.ml⁻¹ sous l'effet de conditions stressantes.

Savoir si un animal est effectivement stressé consiste à définir un niveau au-delà duquel l'augmentation de la concentration du biomarqueur sera considérée comme une réponse positive. La méthode analytique utilisée pour le suivi doit donc être suffisamment performante pour discriminer entre un niveau initial et un niveau final. Cependant, pour correctement prendre cette décision, il faut tenir compte de l'IM de chacune des mesures. Il ne suffit donc pas que la méthode soit valide à ces niveaux de concentration, il faut aussi que son IM soit acceptable.

Par ailleurs, dans le cas où le but de l'étude est de comparer les réponses physiologiques moyennes de lots d'individus, leur nombre, c'est-à-dire le plan d'expérience, doit tenir compte de l'incertitude apportée par la méthode d'analyse. En se fixant une différence minimale à mettre en évidence, on peut calculer le nombre d'animaux nécessaires compte tenu des performances de la méthode, en particulier de l'IM qu'elle permet. Mais la décision finale doit faire intervenir d'autres considérations, comme les règles éthiques, la variabilité entre animaux ou le coût total de l'étude.

En résumé, quel que soit l'objectif proposé à l'analyste, leur point commun est qu'il dispose d'une méthode simple pour estimer l'incertitude de mesure de sa méthode. Or, un point fondamental en chimie est que l'IM varie avec la concentration. C'est pourquoi, il convient de rechercher une fonction d'incertitude plutôt qu'une estimation ponctuelle et unique.

Dans cet article, on décrit d'abord comment obtenir une fonction d'incertitude à partir des mesures collectées lors de la validation d'une méthode, en particulier les données utilisées pour construire un profil d'exactitude. Ensuite, on explique comment utiliser cette fonction pour calculer le seuil de discrimination (SD), ce nouveau critère de sélection d'une méthode analytique. Enfin, on montre comment, à partir de l'IM, déterminer la taille d'un lot expérimental afin de mettre en évidence une variation donnée de la concentration moyenne d'un biomarqueur. Une technique HPLC de quantification de l'adrénaline et de la noradrénaline dans le plasma bovin sert à illustrer ces approches. Le cas où d'éventuels biais de justesse pourraient modifier la mesure est aussi présenté, ainsi que leur impact sur le calcul du SD.

Matériels et méthodes

Méthode HPLC d'analyse des catécholamines plasmatiques bovines

La méthode HPLC utilisée est décrite dans Eriksson et Persson (1982). Il s'agit d'une chromatographie liquide en phase inverse, couplée à un détecteur électrochimique. L'appareillage utilisé est de marque Waters® avec des pompes et un passeur d'échantillons Alliance et détecteur électrochimique 2465. Le logiciel Millénium Waters® est

Le Cahier des Techniques de l'INRA 2019 (96)

utilisé pour piloter l'appareil et calculer les surfaces des pics. La colonne utilisée en C18, 3 μm de 125/3 mm est commercialisée par Macherey-Nagel. La phase mobile à pH 3.00 est préparée avec les réactifs provenant de VWR suivants ; NaH_2PO_4 (75 mM), SDS (1.7 mM), EDTA, (20 μM), KCl (2 mM), méthanol (10 % v/v), acétonitrile (5 % v/v). Les réactifs pour l'adrénaline et la noradrénaline sont de marque Sigma-Aldrich (Darmstadt, Allemagne).

Le sang est prélevé dans des flacons en plastique sur EDTA puis centrifugé pendant dix minutes à 2500 g à 4°C. Les catécholamines sont extraites du plasma bovin par adsorption sur de la poudre d'alumine. Un pool de plasma de référence homogénéisé a été fabriqué pour servir à la préparation des échantillons de validation et conservé à -80°C. Chaque jour des échantillons de validation sont préparés par ajouts dosés d'adrénaline et de noradrénaline. La procédure consistant à utiliser le plasma de référence pour 80 % du volume final et à compléter le volume restant avec différentes solutions étalons aqueuses d'un mélange d'adrénaline et de noradrénaline à des concentrations convenables. Cette procédure n'introduit pas d'effet de matrice dû aux différentes dilutions du plasma. Des courbes d'étalonnage sont également établies quotidiennement à l'aide de solutions étalons contenant un mélange d'adrénaline et de noradrénaline, par dilution d'une solution-mère. La surface de pics sert à établir la courbe d'étalonnage.

Profil d'exactitude et correction du biais

Le profil d'exactitude est un outil statistique et graphique pour la validation des méthodes d'analyse. Il consiste à tracer sur un même graphique :

- les taux de recouvrement moyens observés pour chaque niveau ;
- des intervalles de prédiction, sous la forme d'intervalles de tolérance d'espérance β (β -ETI), dont le rôle est de délimiter une proportion (notée 100 β %), appelée probabilité de couverture, de futures mesures ;
- des intervalles d'acceptabilité qui définissent la performance requise de la méthode d'analyse.

La Figure 3 illustre le profil d'exactitude obtenu pour la méthode d'analyse de l'adrénaline dans le plasma bovin. En ce qui concerne les détails de la construction d'un profil d'exactitude, il convient de se rapporter au numéro spécial de 2009 du Cahier des Techniques INRA⁴ ou aux publications de Feinberg (2009), Hubert et al. (2004, 2007a et 2007b). Une revue récente est aussi disponible dans Bouabidi et al. (2010). Il est recommandé par le Pôle d'Aide au Pilotage par le Management Qualité (APMQ) de l'INRA comme procédure de validation des méthodes.

Rappelons juste quelques notations, utiles pour la suite de cet article. Les mesures sont réalisées sur un ensemble de K matériaux, dits de validation ($3 \leq k \leq K$) sous la forme de I séries ($3 < i \leq I$), chacune regroupant J répétitions ($2 \leq j \leq J$). Ainsi, les IJ essais prévus pour chaque matériau de validation sont organisés selon un plan d'expérience qui correspond à ce qu'on appelle une condition de fidélité intermédiaire dans la norme ISO 5725-1. Chaque matériau de validation est de concentration connue ; il peut s'agir d'un échantillon enrichi ou d'un matériau de référence certifié ou interne.

Soit Y la valeur d'une mesure et \bar{Y} la moyenne générale des IJ mesures réalisées sur un matériau de référence de concentration connue X ; son β -ETI est alors exprimé comme :

$$[\bar{Y} - k_M \times s_{TI}; \bar{Y} + k_M \times s_{TI}] \quad (1)$$

Où k_M est un facteur d'élargissement du β -ETI qui définit une probabilité de couverture des mesures notée β %, et s_{TI} est l'écart-type de cet intervalle de tolérance. Rappelons que la probabilité de couverture n'a rien à voir avec un niveau de confiance, comme celui qui est utilisé pour un intervalle de confiance : en fait c'est une proportion de futures mesures que l'on peut prédire à partir de mesures déjà effectuées.

Un complément intéressant du profil d'exactitude est de pouvoir estimer un facteur de correction lorsque la méthode comporte un biais de justesse. En fait, deux types de biais sont identifiables. La justesse mesurée peut alors être considérée comme une fonction qui relie les concentrations retrouvées après application complète de la méthode d'analyse Y aux valeurs de référence X , comme le montre la Figure 1

⁴ Téléchargeable sur https://www6.inra.fr/cahier_des_techniques/Les-Cahiers-parus/Les-N-Speciaux/Validation-des-methodes

$$Y = b_0 + b_1X + e \quad (2)$$

En chimie, il est classiquement requis que cette fonction soit une droite ; on parle ainsi de linéarité de la justesse (à ne pas confondre avec la linéarité de la fonction d'étalonnage). Pour une méthode qui serait non biaisée, on aurait la pente $b_1 = 1$ et l'ordonnée à l'origine $b_0 = 0$.

Le biais, noté b_1 , qui modifie la pente, on l'appelle souvent biais proportionnel, tandis que l'autre, noté b_0 , est un biais de translation, car il modifie l'ordonnée à l'origine. En chimie analytique, pour qualifier b_0 , on peut parler de « blanc ». Son origine est multiple : blanc réactif, concentration endogène, interférence, etc. Le biais global, noté plus loin dans le texte δ , est la résultante des biais proportionnel et de translation éventuels. Pour la plupart des méthodes, ces deux types de biais peuvent être présents.

Par contre, il est aussi possible de considérer le blanc comme négligeable et de simplifier le modèle qui devient :

$$Y = b_1X + e' \quad (3)$$

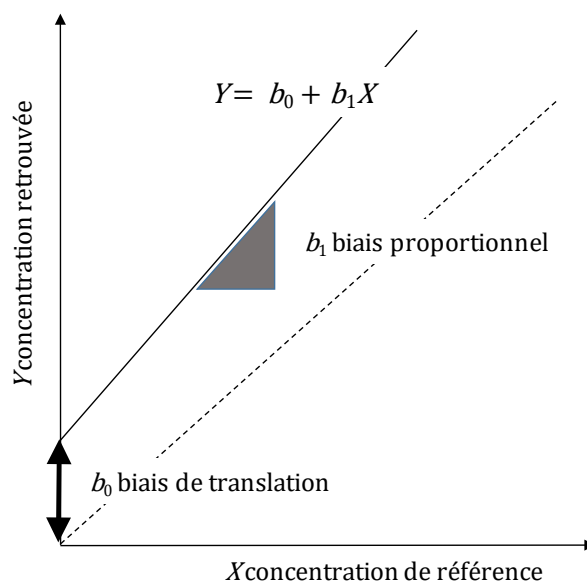


Figure 1. Modélisation de la justesse. Une relation linéaire entre la concentration récupérée et sa valeur de référence. b_1 – biais proportionnel ; b_0 – biais de translation.

Modélisation de la fonction d'incertitude

Pour noter l'incertitude de mesure (IM), nous utilisons les préconisations du GUM (2008), où $u(Y)$ est l'incertitude-type de la quantité Y , et $U(Y)$ son incertitude élargie, avec :

$$U(Y) = k_{IM} \times u(Y) \quad (4)$$

Le facteur d'élargissement $k_{IM} = 2$ suppose une probabilité de couverture de 95 % c'est-à-dire qu'on prévoit qu'une proportion de 95 % des mesures se situe dans l'intervalle élargi qui représente la façon recommandée pour exprimer une mesure et son IM :

$$[Y - U(Y); Y + U(Y)] \quad (5)$$

Pour une utilisation pratique en chimie, il est commode d'introduire $U\%(Y)$ l'incertitude élargie relative à la valeur mesurée. Si on prend une probabilité de couverture de 95 %, on a :

$$U\%(Y) = 2 \times \frac{u(Y)}{Y} = \frac{U(Y)}{Y} \quad (6)$$

Le Cahier des Techniques de l'INRA 2019 (96)

Dans la procédure générale d'estimation de l'IM, le GUM demande de définir le modèle de mesure. En chimie analytique, on peut utiliser un modèle de mesure général, dérivé de celui publié dans la norme ISO 21748, 2010, à savoir :

$$Y = X + \delta + B + e \quad (7)$$

Où

- Y est le résultat de la mesure ;
- X est la valeur de référence du matériau de validation, supposée ici sans incertitude ;
- δ est un terme représentant le biais estimé, intrinsèque à la méthode de mesure ;
- B est la composante de laboratoire de l'IM, dont la variance est s_B^2 ;
- e est l'erreur aléatoire dans des conditions de répétabilité dont la variance est appelée variance de répétabilité s_r^2 .

Ce modèle est un simple polynôme additif et, toujours selon le GUM (§E.3), l'incertitude-type quadratique du mesurande, notée $u^2(Y)$, peut être obtenue en appliquant la « loi de propagation de l'incertitude ». Ce qui donne :

$$u^2(Y) = u^2(\delta) + s_B^2 + s_r^2 \quad (8)$$

L'algorithme courant utilisé pour estimer s_B^2 et s_r^2 est une analyse de variance à un facteur à effet aléatoire (ou ANOVA). Compte tenu des données recueillies lors de l'élaboration d'un profil d'exactitude, la variance de fidélité intermédiaire estimée, s_p^2 , est égale à :

$$s_p^2 = s_B^2 + s_r^2 \quad (9)$$

L'incertitude-type quadratique du biais peut alors être estimée comme suit (Feinberg et al., 2004) :

$$u^2(\delta) = \frac{s_p^2(1-\gamma+\frac{\gamma}{J})}{I} \quad (10)$$

Où $\gamma = \frac{s_r^2}{s_p^2}$ est le rapport de la variance de répétabilité (ou intra-série) à la variance de fidélité intermédiaire, c'est-à-dire le pourcentage de répétabilité dans la variance totale. Finalement, on obtient la formule suivante, où s_{TI}^2 est la variance utilisée pour calculer l'intervalle β -ETI. Finalement, l'incertitude-type correspond simplement à l'écart-type utilisé pour calculer l'intervalle β -ETI :

$$u(Y) = s_p \sqrt{1 + \frac{(1-\gamma+\frac{\gamma}{J})}{I}} = s_{TI} \quad (11)$$

| | B | C | D | E | F |
|----|---|----------|----------|----------|----------|
| 1 | Profil d'exactitude | | | | |
| 2 | Probabilité tolérance (bêta) | | 80% | | |
| 3 | Entrer la limite d'acceptabilité en % | | 30% | | |
| 4 | | | | | |
| 5 | Niveau | A | B | C | D |
| 6 | Valeur de référence | 0.50 | 0.75 | 1.00 | 2.50 |
| 7 | Moyenne niveau | 0.565 | 0.757 | 1.142 | 2.682 |
| 8 | Écart-type de répétabilité (sr) | 0.092 | 0.242 | 0.179 | 0.285 |
| 9 | Écart-type de fidélité (sFI) | 0.171 | 0.357 | 0.179 | 0.465 |
| 10 | Nombre de degrés liberté | 4.022 | 4.742 | 6.857 | 4.377 |
| 11 | Facteur de couverture (k _{cov}) | 1.592 | 1.491 | 1.418 | 1.512 |
| 12 | Écart-type du IT (sIT) | 0.188 | 0.390 | 0.190 | 0.510 |
| 13 | valeur basse intervalle tolérance | 0.276 | 0.176 | 0.872 | 1.912 |
| 14 | Valeur haute intervalle tolérance | 0.853 | 1.338 | 1.412 | 3.453 |
| 15 | Biais relatif (%) | 12.95% | 0.91% | 14.20% | 7.29% |
| 16 | Exactitude (%) | | | | |
| 17 | Valeur de référence | 0.50 | 0.75 | 1.00 | 2.50 |
| 18 | Taux de recouvrement (%) | 112.95% | 100.91% | 114.20% | 107.29% |
| 19 | Limite basse tolérance (%) | 55.22% | 23.46% | 87.22% | 76.47% |
| 20 | Limite haute tolérance (%) | 170.67% | 178.35% | 141.18% | 138.11% |
| 21 | Limite d'acceptabilité basse | 70.00% | 70.00% | 70.00% | 70.00% |
| 22 | Limite d'acceptabilité haute | 130.00% | 130.00% | 130.00% | 130.00% |
| 23 | Incertitude | | | | |

Figure 2. La ligne contenant les estimations de l'IM pour l'adrénaline qui servent à établir la fonction d'incertitude est mise en évidence sur cet extrait de la feuille de calcul INRA.

D'un point de vue pratique, l'IM peut donc être simplement dérivée du profil d'exactitude de la méthode analytique. Pour la plupart des méthodes chimiques ou biochimiques d'analyse, on constate que l'IM n'est pas constante mais varie avec la concentration, si on considère une gamme suffisante. En fait, il existe une relation fonctionnelle entre $u(Y)$ et Y . Il s'agit d'une véritable « fonction d'incertitude » qui peut prendre différentes formes mais n'implique aucune causalité ; il s'agit d'un modèle empirique. En chimie analytique, le modèle qui semble le mieux adapté est la fonction puissance :

$$u(Y) = bY^c \quad (12)$$

La régression par la méthode des moindres carrés ordinaire permet d'estimer les deux coefficients b et c qui, une fois connus, définissent totalement la fonction d'incertitude. Il est alors loisible de prédire l'incertitude de mesure pour toute valeur de Y . Par exemple, comme une incertitude élargie relative, exprimée en pourcentage, qui est souvent la forme préférée des analystes :

$$U\%(Y) = 2 \times bY^{c-1} \quad (13)$$

Tous les calculs pour construire le profil d'exactitude et la fonction d'incertitude ont été effectués à l'aide de feuilles de calcul Microsoft Excel® disponibles sur : <https://intranet.inra.fr/qualité/Outils/Validation-de-methodes>. La Figure 2 illustre les résultats obtenus avec cette feuille de calcul et les éléments retenus pour estimer la fonction d'incertitude dans le cas de l'adrénaline.

Seuil de discrimination, définition et calcul (SD)

Le seuil de discrimination (SD) a été introduit comme critère permettant de savoir si une méthode est capable de mettre en évidence une différence entre deux concentrations d'un même analyte. Il est défini comme suit dans le VIM : « La plus grande variation d'une valeur d'une grandeur mesurée qui n'entraîne aucun changement détectable de l'indication correspondante » (VIM 2012, §4.16). Une première publication de cette démarche appliquée à un dosage ELISA du cortisol plasmatique bovin pour conduire des études sur le stress est disponible (Andanson et al. 2018). Le SD dépend donc de la variation mesurée, mais on cherche la valeur la plus élevée, il faut tenir compte de l'incertitude de cette mesure. C'est pourquoi, d'un point de vue pratique, pour obtenir l'IM de la variation on va utiliser la fonction d'incertitude de la méthode d'analyse.

Si on note Y_{init} la teneur initiale du biomarqueur et Y_{fin} la teneur finale après le stimulus/traitement, la variation de la concentration du biomarqueur est :

Le Cahier des Techniques de l'INRA 2019 (96)

$$C_Y = Y_{fin} - Y_{init} \quad (14)$$

Si on applique la loi de propagation des variances, son incertitude-type $u(C_Y)$ vaut :

$$u(C_Y) = \sqrt{[u^2(Y_{fin}) + u^2(Y_{init})]} \quad (15)$$

La plus grande variation non détectable, c'est-à-dire le *SD*, peut être définie comme le demi-intervalle élargi de C_Y , avec une probabilité de couverture de 95 %, soit :

$$SD = 2 \times u(C_Y) = U(C_Y) \quad (16)$$

Pour qu'une méthode soit apte à mettre en évidence une variation C_Y donnée, il faut que le *SD* soit inférieur à cette variation. En d'autres termes que l'IM de la variation soit inférieure à la variation elle-même. Ce qui se traduit par la condition suivante :

$$SD < 2 \times u(C_Y) \quad (17)$$

Taille minimale du lot expérimental

Le *SD* permet de répondre à l'objectif 1 des études cliniques et de savoir si une méthode est capable de mettre en évidence la variation de concentration d'un biomarqueur chez un individu. En ce qui concerne l'objectif 2, le raisonnement est un peu différent car il s'agit de mettre en évidence un changement moyen entre deux lots d'individus, ayant ou non subi un traitement. Il existe diverses situations, soit on a deux lots de tailles identiques ou différentes, soit un seul lot contrôlé avant et après. Pour simplifier les calculs, on va considérer le cas où il s'agit d'un seul lot expérimental. La question est alors de calculer le nombre minimum d'animaux n qui doit permettre de mettre en évidence une différence significative après traitement. C'est un problème statistique classique qui a fait l'objet d'une revue exhaustive, dans le cas des études cliniques, par Lachin (1981).

La quantité C_Y sa définition, en notant qu'il s'agit là de la différence entre les moyennes des réponses avant et après stimulus/traitement :

$$C_Y = Y_{fin} - Y_{init} \quad (17)$$

Pour appliquer les formules de calcul de n proposées dans la littérature, il est nécessaire de connaître la variance de C_Y . Une solution directe consiste à utiliser son incertitude-type élevée au carré, soit $u(C_Y)^2$, facile à calculer à l'aide de la fonction d'incertitude. La taille n du lot vaut approximativement :

$$n \approx \frac{(z_{1-\alpha} + z_{1-\beta})^2 \times u(C_Y)^2}{C_Y^2} \quad (18)$$

Avec $z_{1-\alpha}$ et $z_{1-\beta}$ les quantiles de la loi normale standardisée correspondant respectivement au niveau de confiance $1 - \alpha$ et à la puissance $1 - \beta$. Pour faire le lien avec le chapitre précédent, on peut aussi le noter :

$$n \approx \frac{(z_{1-\alpha} + z_{1-\beta})^2 \times \left(\frac{SD}{2}\right)^2}{C_Y^2} \quad (19)$$

Si on choisit $1 - \alpha = 1 - \beta = 95\%$, alors $z_{1-\alpha} = z_{1-\beta} = 1,96$, et cette formule devient :

$$n = \frac{3.84 \times SD^2}{C_Y^2} \quad (20)$$

Il est aisé de voir que si C_Y diminue, la taille n augmente et qu'il est presque toujours possible de mettre en évidence une différence, à condition d'accroître la taille du lot et ne pas tenir compte du coût expérimental. C'est pourquoi, cette valeur doit être considérée comme indicative. Il convient aussi de tenir compte de l'aspect éthique,

de la variabilité individuelle des animaux et de divers indicateurs physiologiques ou environnementaux, mais surtout des contraintes économiques. Dans ce cas, les seules performances de la méthode ne permettent pas de répondre totalement à l'objectif 2. Par contre, elles fournissent de précieuses indications sur les paramètres d'une étude sur du matériau vivant. L'expertise des expérimentateurs est de toute façon indispensable pour établir le protocole définitif.

Résultats

Profils d'exactitude de l'adrénaline et de la noradrénaline

Le plan d'expérience de validation établi pour valider la méthode étudiée, comprenait :

- $I = 4$ séries de mesures réparties en 4 jours non consécutifs ;
- $J = 2$ répétitions par série ;
- $K = 7$ niveaux de concentration, soit 7 matériaux de référence dopés de concentration connue.

Les échantillons de validation ont été préparés par ajouts dosés, de façon à obtenir des concentrations nominales de 0.5, 0.75, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 et 20.0 ng.ml⁻¹. Par ailleurs, les courbes d'étalonnage quotidiennes contenaient 0, 0.2, 1.0, 2, 5, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0 ng.ml⁻¹ par dilution d'une solution-mère. Au total, 56 mesures ont été recueillies pour chaque catécholamine. Comme, il a été impossible de trouver un plasma de référence libre de catécholamines, un échantillon de validation supplémentaire « sans ajout », formé uniquement du plasma dilué dans 20 % d'eau pure, a été préparé et mesuré pour chaque série, afin d'estimer les concentrations endogènes du plasma de référence. La réponse moyenne obtenue pour ce « sans ajout » a été soustraite de chaque valeur de mesure, effectuée sur les matériaux de validation. Ces valeurs corrigées ont été utilisées pour établir les profils d'exactitude. Finalement, pour chaque niveau de concentration, huit mesures ont été utilisées pour calculer les différents paramètres nécessaires à la construction d'un profil, comme la moyenne retrouvée, le biais moyen, l'écart-type de fidélité, les limites des β -ETI, l'IM, etc.

Les limites d'acceptabilité ont été choisies d'après les recommandations de la FDA pour les méthodes bio-analytiques, c'est-à-dire $\pm 30\%$, et de $\pm 50\%$ à partir de 2.0 ng.ml⁻¹. Les profils d'exactitude obtenus sont illustrés par la Figure 3 et la Figure 4. Il est facile de voir qu'ils ne sont pas satisfaisants car la méthode présente un biais négatif important pour les deux analytes. En l'état, ces méthodes ne sont pas validées. Un facteur de correction a été estimé, selon la procédure proposée, à partir de la pente de la droite de justesse. Cette pente était de 0,71 pour l'adrénaline et 0,72 pour la noradrénaline. Pour simplifier, on a choisi un facteur de correction unique égal à $1/0,7 = 1.43$. De nouveaux profils d'exactitude ont été recalculés après correction. On obtient la Figure 5 et la Figure 6 qui permettent de conclure à la validité de la méthode. Désormais, toutes les mesures obtenues par cette méthode seront corrigées par ce facteur, afin d'obtenir une détermination plus exacte de la concentration des catécholamines dans le plasma. Après calcul de la LOQ, le domaine de validité pour les deux analytes, s'établit ainsi :

| | | |
|---------------|--------------------------|---------------------------|
| Adrénaline | 0,81 ng.ml ⁻¹ | 20,00 ng.ml ⁻¹ |
| Noradrénaline | 1,10 ng.ml ⁻¹ | 20,00 ng.ml ⁻¹ |

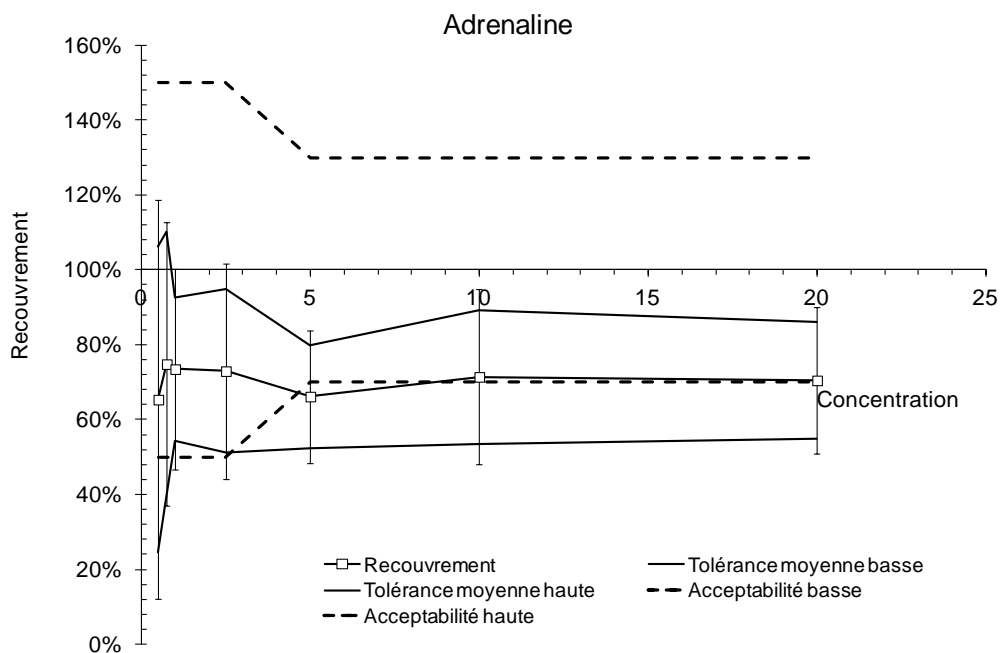


Figure 3. Profil d'exactitude de la méthode HPLC d'analyse de l'adrénaline plasmatique bovine en ng.ml⁻¹, avant correction.

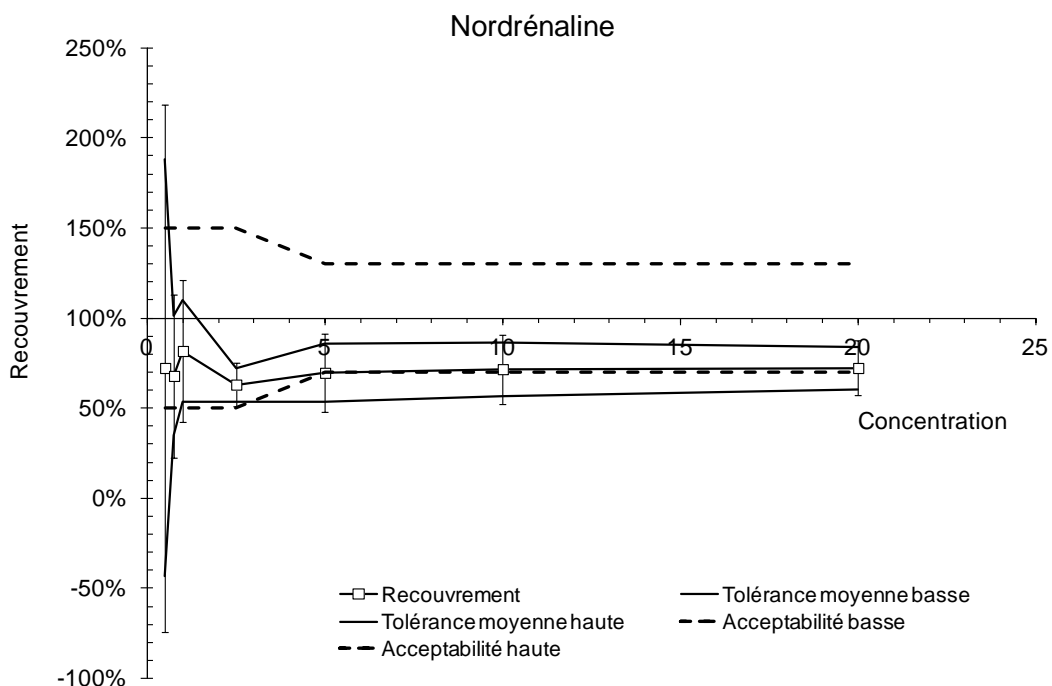


Figure 4. Profil d'exactitude de la méthode HPLC d'analyse de la noradrénaline plasmatique bovine en ng.ml⁻¹, avant correction.

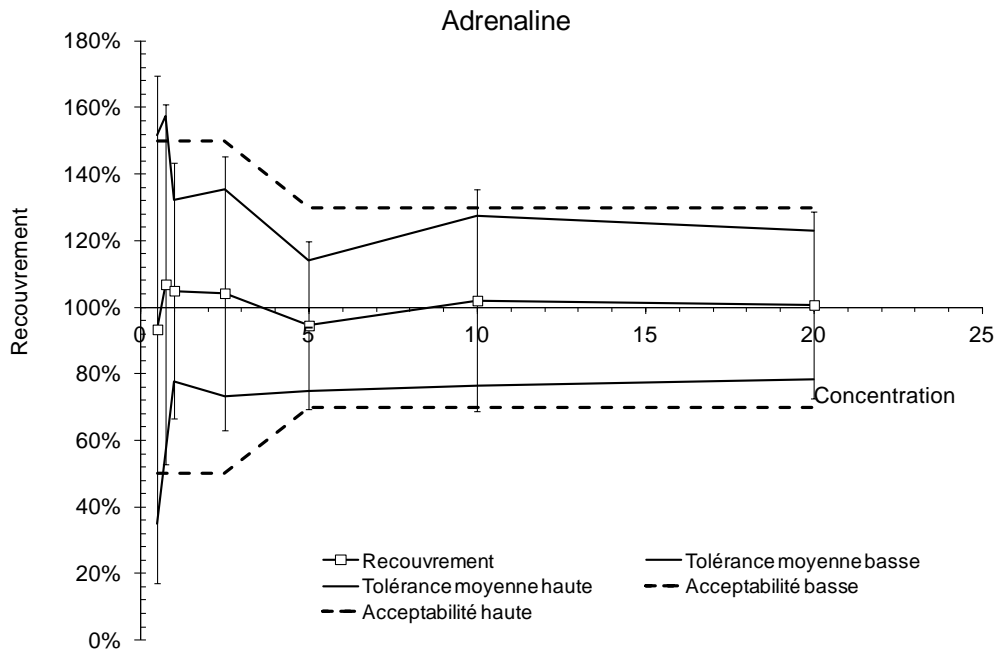


Figure 5. Profil d'exactitude de la méthode d'analyse HPLC de l'adrénaline plasmatique bovine en ng.ml⁻¹ après application du facteur de correction.

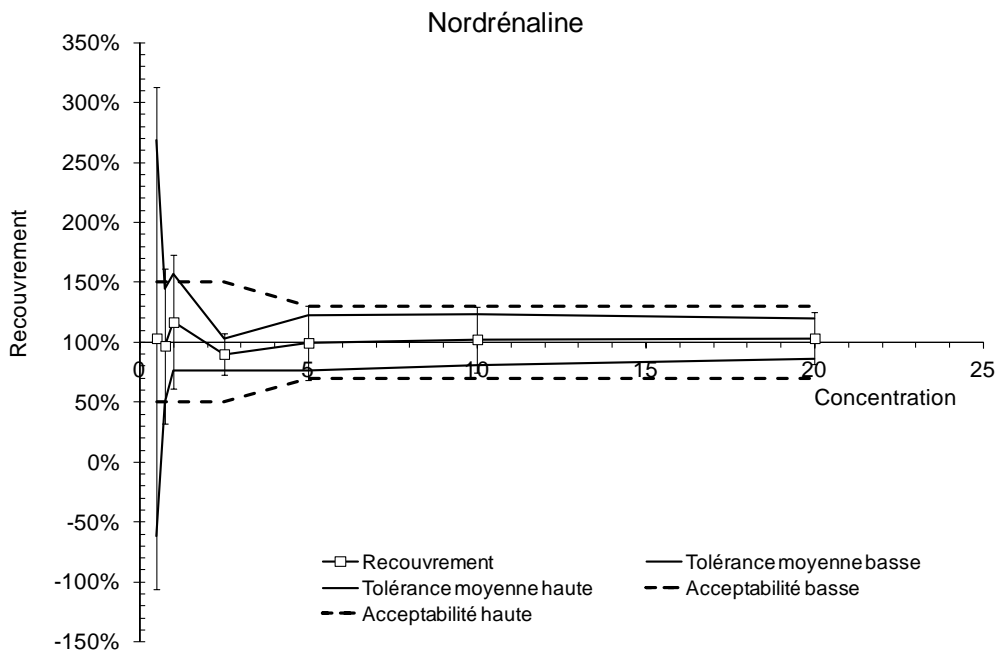


Figure 6. Profil d'exactitude de la méthode d'analyse HPLC de la noradrénaline en ng.ml⁻¹ après application du facteur de correction.

Comme décrit dans la section Matériels et méthodes, la fonction d'incertitude élargie relative est obtenue à partir des résultats du profil d'exactitude. Cette relation qui relie incertitude de mesure et la concentration est fondamentale pour déterminer le SD (Figure 7 et Figure 8). Selon la notation proposée, Y représente la concentration de catécholamines mesurées en ng.ml⁻¹ et $U\%(Y)$ son incertitude élargie relative :

$$\text{Adrénaline} \quad U\%(Y) = 0,496 \times Y^{-0,231}$$

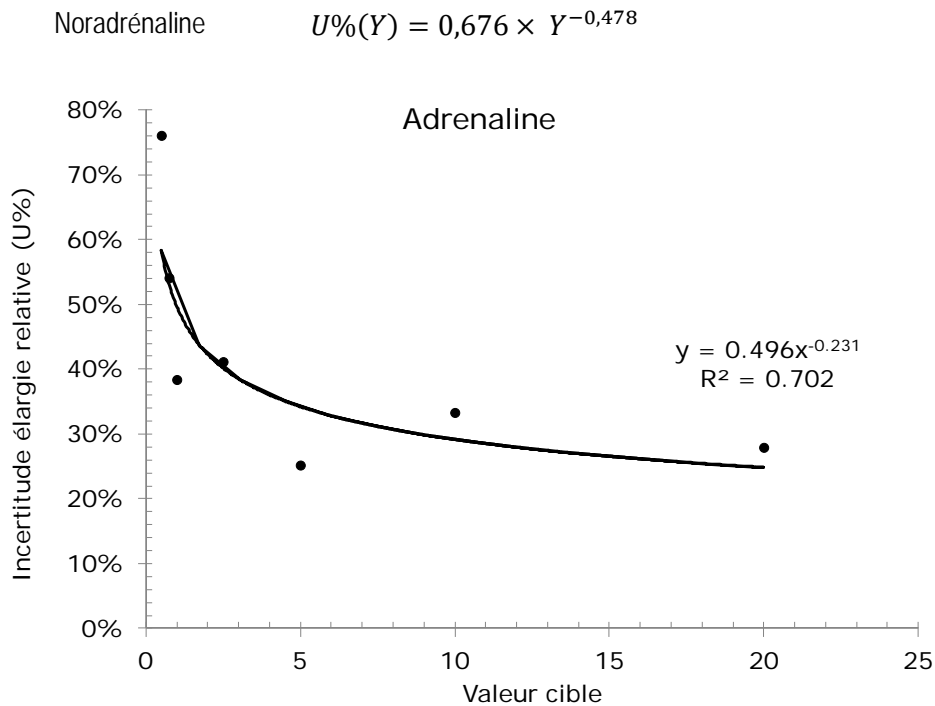


Figure 7. Incertitude relative en fonction du niveau de l'adrénaline plasmatique bovine en ng.ml⁻¹.

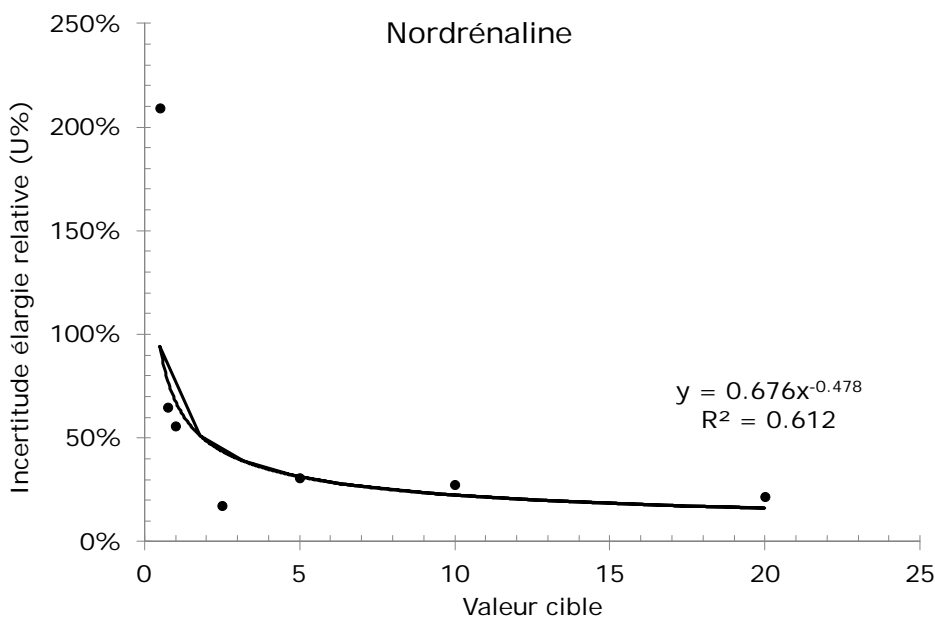


Figure 8. Incertitude relative en fonction du niveau de noradrénaline plasmatique bovine en ng.ml⁻¹.

On peut constater que l'IM de l'adrénaline est légèrement inférieure à celle de la noradrénaline. D'un point de vue strictement métrologique, l'IM obtenue selon cette approche est sans doute sous-estimée, car plusieurs sources d'incertitude ne sont pas prises en compte, telles :

- l'IM de la moyenne du « sans ajout » retranché de chaque mesure ;
- l'IM de la valeur de référence des matériaux de validation fabriqués par ajouts dosés ;
- l'IM du facteur de correction.

Ces différentes sources peuvent être assez facilement calculées et intégrées au modèle précédent. Les estimations

obtenues sont relativement peu différentes, en comparaison. De plus, seulement huit mesures sont utilisées par niveau de concentration pour effectuer ces calculs ; par conséquent, le nombre de degrés de liberté est plutôt faible et l'écart-type du β -ETI surestimé. Toutefois, étant donné qu'il existe de nombreuses procédures normalisées ou non normalisées pour l'estimation de l'IM en chimie analytique, la procédure proposée représente une tentative réaliste pour l'objectif recherché.

Application du SD à des études publiées

Pour savoir si les performances de la méthode ainsi validée sont adaptées aux études du stress, une procédure de vérification consiste à vérifier si elle aurait pu s'appliquer à des travaux déjà publiés. Un ensemble de dix publications regroupant au total seize expériences a été sélectionné, la préférence étant donnée à celles où les méthodes analytiques étaient suffisamment décrites et/ou les conditions expérimentales suffisamment bien documentées. Dans ces études retenues, trois types de stimuli sont présentés : la douleur, l'effort et les autres. Pour chaque étude, la taille du lot utilisé, les concentrations moyennes initiales et finales en catécholamines sont reportées dans les Tableau 1 et Tableau 2, ce qui permet de calculer la variation C_Y consécutive au stimulus. Les fonctions d'incertitude de chaque analyte permettent d'estimer, pour chaque couple de valeurs, c'est-à-dire pour chaque étude publiée, $u(Y_{init})$ et $u(Y_{fin})$ et enfin de calculer le SD en appliquant les formules décrites dans la partie consacrée aux méthodes. Il faut se rappeler que ces valeurs sont des moyennes alors que le SD s'applique à un individu. Mais cette approche permet de savoir si, en moyenne, la méthode est adaptée à l'objectif 1. Dans la colonne suivante, il est indiqué si la méthode est apte – oui ou non – à discriminer une telle variation sur un individu isolé. En fait, cette conclusion recouvre deux situations :

- soit, la méthode d'analyse proposée est inadaptée car la variation observée est plus faible que son incertitude ($C_Y < SD$) ;
- soit, le stimulus n'était pas stressant.

Ces résultats sont illustrés par la Figure 9 et la Figure 10, où la concentration finale Y_{fin} est corrélée à la variation due au stimulus, notée C_Y . Pour ces graphiques, la dernière ligne des tableaux n'a pas été prise en compte car elle fait état d'une étude extrême, très différentes des autres, ce qui fausserait un peu l'interprétation.

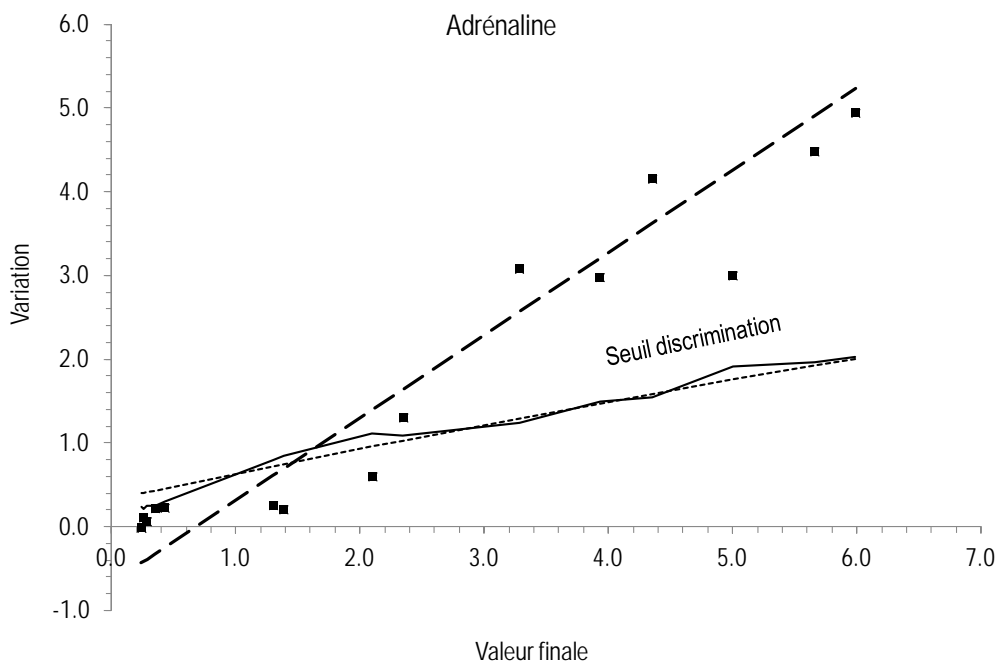


Figure 9. Relation entre la variation de concentration et la valeur finale en adrénaline. Chaque étude apparaît comme un carré et la courbe brisée continue indique les variations du SD. La ligne en pointillés larges indique la variation moyenne et la courbe en pointillés fins le SD pour cette moyenne. La méthode est considérée comme adaptée pour les études situées au-dessus du SD. Voir le texte pour les explications.

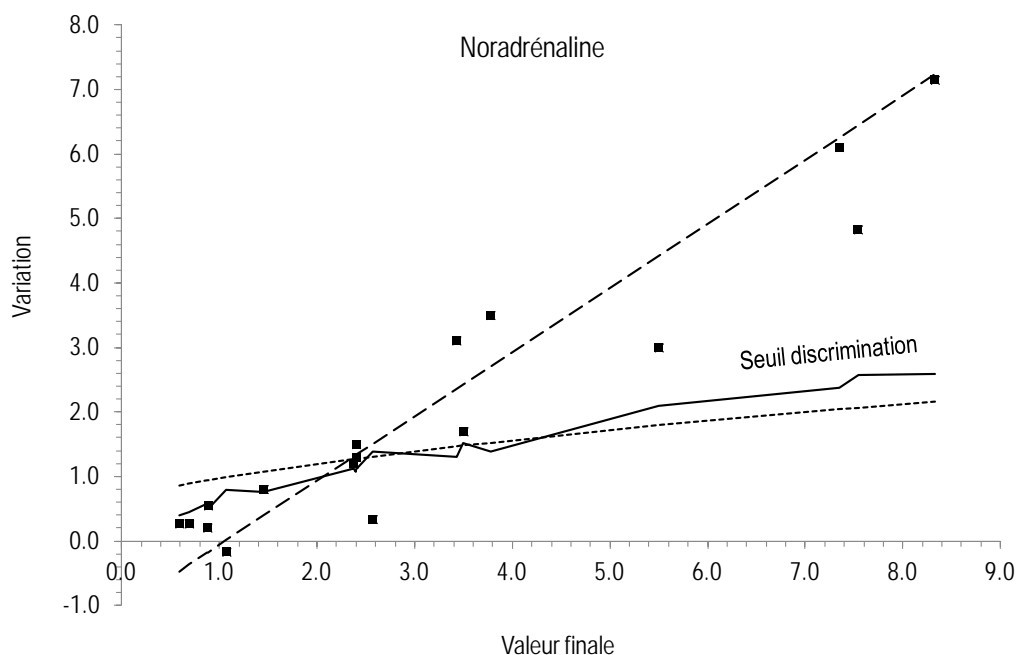


Figure 10. Relation entre la variation de concentration et la valeur finale en noradrénaline. Voir la Figure 9 pour la légende.

Parmi les trois catégories de stimuli identifiés, c'est la douleur à l'abattoir pendant la saignée qui a induit les variations les plus significatives avec méthode. Pour le stress chronique et aigu d'intensité modérée ainsi que l'effort, les conclusions sont plus sujettes à caution. Par ailleurs, d'après ces données, les taux plasmatiques initiaux moyens en l'absence de stress varient entre 0.13 et 2.00 ng.ml⁻¹ pour l'adrénaline et entre 0.27 et 2.71 ng.ml⁻¹ pour la noradrénaline. Selon notre expérience, plusieurs de ces valeurs initiales sont très élevées et peuvent être considérées comme probablement surévaluées. Par exemple, le plasma de référence utilisé pour la validation et prélevé sur des animaux non stressés avait comme teneur moyenne 0.20 ng.ml⁻¹ pour l'adrénaline et 0.30 ng.ml⁻¹ pour la noradrénaline.

Afin de « lisser » ces données, des modèles de régression linéaire ont été ajustés par la méthode des moindres carrés et apparaissent sous la forme de pointillés larges sur la Figure 9 et la Figure 10. Ils ont la forme suivante :

$$\text{Adrénaline} \quad C_Y = -0.671 + 0.985 Y_{fin}$$

$$\text{Noradrénaline} \quad C_Y = -1.057 + 0.995 Y_{fin}$$

Il est à noter qu'on peut ainsi obtenir des variations négatives, ce qui conforte la remarque sur le fait que certaines valeurs initiales sont trop fortes puisque, paradoxalement, des animaux peuvent être moins stressés après un stimulus. Ces modèles permettent quand même de calculer une valeur moyenne de la variation pour une valeur finale donnée et, ainsi, de recalculer un SD moyen qui apparaît sur les figures sous la forme d'une courbe en pointillés fins. La zone située au-dessus de cette courbe peut ainsi être définie comme l'ensemble des situations où il sera possible de conclure qu'un individu est stressé, en utilisant la méthode d'analyse décrite ici comme outil de diagnostic.

Ainsi, pour l'adrénaline, lorsque la variation observée est inférieure à 1,0 ng.ml⁻¹ et la valeur finale est de 2,1 ng.ml⁻¹ il sera difficile de mettre en évidence un effet de stress avec la méthode utilisée. Pour la noradrénaline, ce seuil existe pour une valeur de variation de 1,1 ng.ml⁻¹ et une valeur finale de 3,0 ng.ml⁻¹.

À titre d'exemples plusieurs intervalles élargis des valeurs initiales et finales, tirées des données de l'étude bibliographique, sont reportés dans le Tableau 3. Il apparaît que pour chaque analyte, pour des teneurs inférieures à 1 ng.ml⁻¹, l'incertitude relative élargie est proche de 100 %. Il n'est donc pas surprenant que la méthode ne soit pas discriminante dans cette zone de concentrations. Par contre, pour des concentrations supérieures à 5 ng.ml⁻¹ la méthode est tout à fait performante. L'incertitude élargie est alors aux environs de 25 %. La Figure 7 et la Figure 8 confirment graphiquement ces valeurs.

Afin d'illustrer le rôle de la taille minimale du lot à mettre en œuvre pour conduire ce type d'étude, dans la colonne

« Prob. » du Tableau 1 et du Tableau 2, est reportée la probabilité associée à un test d'hypothèse nulle de Student sur l'égalité des concentrations moyennes initiales et finales. Son intérêt est de prendre compte l'effectif réel N de l'étude, ce qui n'a pas été fait jusque-là. Mise à part l'étude de Hickey et al. (2003) sur l'adrénaline, toutes ces études permettent de conclure que les moyennes sont statistiquement différentes, et de façon très significative. Cependant, en l'absence d'une définition, de ce qu'on peut appeler une variation indicatrice d'un stress, on ne peut pas calculer la puissance de ces tests.

Dans la colonne suivante, on a calculé la taille minimale n du lot qui aurait pu être utilisé pour mettre en évidence la variation observée, en appliquant la formule proposée. Grâce à la différence $n - N$, il est facile de voir si le lot sélectionné était trop important ou correctement choisi. On s'aperçoit que, dans plusieurs cas, le nombre d'animaux a été excessif ce qui se traduit par une différence négative élevée.

Discussion

Lors de la conception d'une étude biologique ou clinique, le choix de la méthode d'analyse qui servira à quantifier l'effet d'un traitement ou d'un stimulus est fondamental. Il revient à l'analyste en charge des mesures de sélectionner la méthode adaptée aux objectifs d'une telle étude. En chimie analytique, cette contrainte est désignée sous le nom général de « adéquation à l'objectif » ou « fitness-for-purpose » en anglais. Le critère du seuil de discrimination (SD) qui est proposé ici permet de réaliser cette recherche d'adéquation à partir des performances de la méthode établies lors de sa validation. Son calcul passe par l'estimation de l'incertitude de la mesure de l'effet dû au stress, exprimée sous sa forme élargie (U) avec une probabilité de couverture de 95 %. Il peut être considéré comme un nouveau critère complémentaire d'une validation.

Pour cette publication, une méthode d'analyse de l'adrénaline et de la noradrénaline par HPLC destinée à évaluer le stress chez des bovins, a servi d'exemple. En effet, ces deux catécholamines sont très classiquement choisies pour suivre l'effet de stress suite à stimulus. Le SD a été calculé à l'aide de la fonction d'incertitude de la méthode qui se déduit directement des données de validation obtenues pour la construction d'un profil d'exactitude. Afin de vérifier l'applicabilité de la méthode et de ce critère, les taux plasmatiques de différents lots d'animaux déjà soumis à divers stress ont été regroupés à partir d'une compilation de la littérature et présentés dans le Tableau 1 et le Tableau 2.

Le SD a pu être obtenu pour une quinzaine de situations expérimentales, tant pour l'adrénaline que la noradrénaline. On peut ainsi conclure que la méthode mise au point convient à la détection du stress chez un bovin, à condition que les changements de réponses individuelles mesurés dépassent $2,1 \text{ ng.ml}^{-1}$ et $3,0 \text{ ng.ml}^{-1}$ pour l'adrénaline et la noradrénaline, respectivement comme l'illustrent la Figure 9 et la Figure 10. De telles valeurs se rencontrent presque toujours dans le cas de l'abattage, mais plus rarement après un stimulus d'intensité modérée chronique ou aigu. Pour les futurs projets d'étude, où l'adrénaline et la noradrénaline seraient sélectionnées comme biomarqueurs d'intérêt pour un individu, le calcul d'un SD spécifique à chaque analyte permettra de décider facilement si la méthode est adaptée à l'objectif.

À côté de l'utilisation du SD comme critère pour des mesures faites sur un individu, la fonction d'incertitude permet aussi de calculer l'effectif minimum d'un lot pour mettre en évidence une variation donnée des taux plasmatiques moyens en catécholamines d'un groupe d'individus. En complément, partant de l'hypothèse que les différentes études compilées auraient pu utiliser notre méthode HPLC, il a été possible de calculer pour chaque étude un nombre minimum théorique et de le comparer à l'effectif réellement employé. Généralement, l'effectif employé est assez largement supérieur à ce qu'il aurait pu être. Cette approche complémentaire confirme ainsi l'intérêt et l'applicabilité de la méthode proposée pour l'étude du stress pour une vérification de la pertinence du protocole expérimental choisi.

Pour évaluer l'adéquation d'une méthode d'analyse au suivi d'un biomarqueur, en plus des considérations métrologiques relatives à la méthode, un certain nombre de sources d'incertitude liées à l'échantillonnage sont importantes à considérer. Elles se traduisent par une variabilité individuelle du taux plasmatique initial. Ce taux peut en effet prendre des valeurs très différentes, sans pour autant que les animaux soient soumis à un stimulus stressant, comme le démontre l'amplitude des valeurs initiales de l'étude bibliographique. Cette variabilité a bien sûr une origine physiologique interindividuelle naturelle, mais aussi les conditions environnementales dans lesquelles se fait le prélèvement. Par exemple, la température ambiante influence le métabolisme énergétique, la

Le Cahier des Techniques de l'INRA 2019 (96)

proximité de la dernière prise alimentaire, sa composition, l'habitation préalable des animaux aux prélèvements sanguins qui permet d'obtenir des taux très bas ou la durée totale nécessaire au prélèvement peuvent favoriser la libération de catécholamines. Enfin, les conditions de traitement des prélèvements doivent aussi être standardisées, comme un refroidissement dans la glace pilée, un temps d'attente fixe avant centrifugation, une température de congélation constante et une réduction des effets de décongélation successifs.

Lors de l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales, il est essentiel d'utiliser le plus petit nombre possible d'animaux pour mettre en évidence les effets d'un traitement. Cette exigence constitue le premier R de la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) (Russel et Burch, 2013). Le mode de calcul de l'effectif minimum à partir de l'incertitude que nous proposons offre cette possibilité. Il donne également une certaine garantie sur le fait qu'à la fin de l'expérience, les résultats seront interprétables, ce qui a une incidence directe sur le coût de la recherche.

La fonction d'incertitude peut être considérée comme un outil complémentaire d'aide à la décision qui facilite l'évaluation de la performance d'une méthode d'analyse sur l'effet d'un stimulus ou d'un traitement. Son calcul peut être recommandé pour évaluer la faisabilité *a priori* d'une étude clinique ou, de façon plus générale, lors de la mise en place de tout projet de recherche qui comporte des mesures quantitatives.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA).



<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue «Le Cahier des Techniques de l'INRA», la date de sa publication et son URL).

Références bibliographiques

- Andanson S, Veissier I, Feinberg MH (2018) The discrimination threshold : A selection criterion for analytical methods based on measurement uncertainty – Application to animal stress studies. *Anal Chim Acta* 1020: 9-16.
- Bouabidi A, Rozet E, Fillet M, Ziemons E, Chapuzet E, Mertens B, Klinkenberg R, Ceccato A, Talbi M, Streeb B, Bouklouze A, Boulanger B, Hubert P (2010) Critical analysis of several analytical method validation strategies in the framework of the fit for purpose concept. *J Chromatogr A* 1217 : 3180-3192.
- Bozzo G, Barrasso R, Marchetti P, Roma R, Samoilis G, Tantillo G, Ceci E (2018) Analysis of stress indicators for evaluation of animal welfare and meat quality in traditional and Jewish slaughtering. *Animals* 8, 43.
- Cahier des Techniques INRA, numéro spécial 2009, téléchargeable sur :
https://www6.inra.fr/cahier_des_techniques/Les-Cahiers-parus/Les-N-Speciaux/Validation-des-methodes
- Ericksson BM et Persson BA (1982) Determination of catecholamines in rat heart tissue and plasma samples by liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* 612 : 1-5.
- Feinberg M (2009) Labo-Stat. Guide de validation des méthodes analytiques. Edition Lavoisier, Paris, 362 p.
- Feinberg M, Boulanger B, Dewé W, Hubert P (2004) New advances method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. *Anal Bioanal Chem* 380 : 502-514.
- GUM (2008) Bureau International des poids et mesures, Evaluation of Measurement Data : Guide for the Expression of Uncertainty of Measurement, JCGM 100 : 2008, GUM 1995 with minor corrections.
http://www.bipm.org/utls/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf (accédé 11-17-2017)
- Hagenmaier JA, Reinhardt CD, Bartle SJ, Henningson JN, Ritter MJ, Calvo-Lorenzo MS, Vogel GJ, Guthrie CA, Siemens MG, Thomson DU (2017) Effect of handling intensity at the time of transport for slaughter on physiological response and carcass characteristics in beef cattle fed ractopamine hydrochloride. *J Anim Sci* 95 : 1963-1976.
- Hickey MC, Drennan M, Earley B (2003) The effect of abrupt weaning of suckler calves on the plasma

concentrations of cortisol, catecholamines, leukocytes, acute-phase proteins and in vitro interferon-gamma production. *J Anim Sci* 81 :2847-2855.

Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C, Valat L (2004) Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedure A SFSTP proposal – Part I. *J Pharmaceut Biomed Anal* 36 : 579-586.

Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C, Valat L (2007a) Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedure A SFSTP proposal – Part II. *J Pharmaceut Biomed Anal* 45 : 70-81.

Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Valat L, Rozet E. (2007b) Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedure A SFSTP proposal – Part III. *J Pharmaceut Biomed Anal* 45 : 82-96.

ISO 21748 Guidance for the Use of Repeatability, Reproducibility and Trueness Estimates in Measurement Uncertainty Estimation, 2010 (Geneva, Switzerland).

Lachin JM (1981) Introduction to sample size determination and power analysis for clinical trials. *Contr Clin Trials* 2 : 93-113.

Lay DC, Friend H, Randel RD, Bowers CL, Grissom KK, Jenkins OC (1992) Behavioral and physiological effects of freeze or hot-iron branding on crossbred cattle. *J Anim Sci* 70 : 330-336.

Ley SJ, Waterman AE, Livingston A (1996) Measurement of mechanical thresholds, plasma cortisol and catecholamines in control and lame cattle : A preliminary study. *Research Vet Sci* 61 : 172-173.

Mellor DJ, Stafford KJ, Todd SE, Lowe TE, Gregory NG, Bruce RA, Ward RN (2002) A comparison of catecholamine and cortisol responses of young lambs and calves to painful husbandry procedures. *Aust Vet J* 80 : 228-233.

Moberg GP, Mench JA (2000) The biology of animal stress. Basic principles and implications for animal welfare. *Cabi International* : 377 p.

Odore R, Badino P, Giovanni R, Barbero R, Cuniberti B, D'Angelo A, Girardi C, Fraccaro E, Tarantola M (2011) Effects of housing and short-term transportation on hormone and lymphocyte receptor concentrations in beef cattle. *Research Vet Sci* 90 : 341-345.

Olson DP, Ritter RC, Papasian CJ, Gutenberger S (1981) Sympathoadrenal and adrenal hormonal responses of newborn calves to hypothermia. *Can J comp Med* 45 : 321-326.

Rulofson FC, Brown DE, Bjur RA (1988) Effect of blood sampling and shipment to slaughter on plasma catecholamine concentrations in bulls. *J Anim Sci* 66 : 1223-1229.

Russel WMS, Burch RL (2013) The principles of humane experimental technique, URL : http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc (last visit june 6 2013)

VIM (2012) Bureau International des poids et mesures, Vocabulaire International de Métrologie. *JCGM* 200 :2012.

http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_200_2012.pdf (accédé 11-17-2017)

Tableaux

Tableau 1. Données bibliographiques pour l'adrénaline

| Stimulus | Référence | Type | <i>N</i> | Valeur initiale | Valeur finale | Variation | Seuil discrimination | Apte | Prob | <i>n</i> | <i>n - N</i> |
|----------|----------------------|------------------|----------|-----------------|---------------|-----------|----------------------|------|---------|----------|--------------|
| autre | Hickey MC., 2003 | veaux | 36 | 0.26 | 0.24 | -0.02 | 0.24 | Non | 42.933% | 865 | 829 |
| douleur | Mellor DJ., 2002 | veaux | 30 | 0.14 | 0.25 | 0.11 | 0.21 | Non | 0.000% | 13 | -17 |
| autre | Hickey MC., 2003 | veaux | 36 | 0.22 | 0.28 | 0.06 | 0.24 | Non | 0.334% | 56 | 20 |
| autre | Odore R., 2011 | veaux | 16 | 0.13 | 0.35 | 0.22 | 0.24 | Non | 0.000% | 5 | -11 |
| autre | Bozzo G., 2018 | taurillons | 60 | 0.20 | 0.43 | 0.23 | 0.30 | Non | 0.000% | 7 | -53 |
| douleur | Ley SJ., 1996 | vaches laitières | 78 | 1.04 | 1.30 | 0.26 | 0.79 | Non | 0.000% | 37 | -41 |
| effort | Hagenmaier JA., 2017 | bœufs | 80 | 1.18 | 1.38 | 0.21 | 0.85 | Non | 0.004% | 65 | -15 |
| douleur | Lay DC., 1992 | veaux | 30 | 1.50 | 2.10 | 0.60 | 1.11 | Non | 0.000% | 13 | -17 |
| effort | Hagenmaier JA., 2017 | bœufs | 80 | 1.05 | 2.35 | 1.30 | 1.09 | Oui | 0.000% | 3 | -77 |
| douleur | Bozzo G., 2018 | taurillons | 60 | 0.20 | 3.28 | 3.08 | 1.24 | Oui | 0.000% | 2 | -58 |
| autre | Olson DP., 1981 | veaux | 17 | 0.95 | 3.93 | 2.98 | 1.50 | Oui | 0.000% | 2 | -15 |
| douleur | Bozzo G., 2018 | taurillons | 60 | 0.20 | 4.35 | 4.15 | 1.54 | Oui | 0.000% | 2 | -58 |
| douleur | Lay DC., 1992 | veaux | 9 | 2.00 | 5.00 | 3.00 | 1.91 | Oui | 0.001% | 2 | -7 |
| douleur | Hagenmaier JA., 2017 | bœufs | 80 | 1.18 | 5.66 | 4.48 | 1.96 | Oui | 0.000% | 2 | -78 |
| douleur | Hagenmaier JA., 2017 | bœufs | 80 | 1.05 | 5.99 | 4.94 | 2.03 | Oui | 0.000% | 2 | -78 |
| douleur | Rulofson FC., 1988 | bœufs | 5 | 0.22 | 14.89 | 14.67 | 3.96 | Oui | 0.008% | 2 | -3 |

Légende: *N* : Effectif initial ; Prob : probabilité associée à un test d'égalité des moyennes initiales et finales ; *n* effectif minimum théorique

Stéphane Andanson, Quentin Delahaye, Christine Ravel, Max H. Feinberg

Tableau 2. Données bibliographiques pour la noradrénaline (Légende: voir Tableau 1)

| Stimulus | Référence | Type | <i>N</i> | Valeur initiale | Valeur finale | Variation | Seuil discrimination | Apte | Prob | <i>n</i> | <i>n - N</i> |
|----------|----------------------|------------------|----------|-----------------|---------------|-----------|----------------------|------|--------|----------|--------------|
| autre | Bozzo G., 2018 | taurillons | 60 | 0.32 | 0.59 | 0.27 | 0.39 | Non | 0.000% | 8 | -52 |
| autre | Odore R., 2011 | veaux | 16 | 0.42 | 0.69 | 0.27 | 0.45 | Non | 0.024% | 11 | -5 |
| autre | Hickey MC., 2003 | veaux | 36 | 0.67 | 0.88 | 0.21 | 0.58 | Non | 0.014% | 30 | -6 |
| douleur | Mellor DJ., 2002 | veaux | 30 | 0.33 | 0.88 | 0.55 | 0.50 | Non | 0.000% | 3 | -27 |
| effort | Hagenmaier JA., 2017 | bœufs | 80 | 1.24 | 1.07 | -0.17 | 0.78 | Non | 0.025% | 84 | 4 |
| autre | Hickey MC., 2003 | veaux | 36 | 0.65 | 1.45 | 0.80 | 0.75 | Non | 0.000% | 3 | -33 |
| effort | Hagenmaier JA., 2017 | bœufs | 80 | 1.18 | 2.37 | 1.19 | 1.12 | Non | 0.000% | 3 | -77 |
| autre | Olson DP., 1981 | bœufs | 6 | 0.90 | 2.40 | 1.50 | 1.07 | Oui | 0.102% | 2 | -4 |
| autre | Olson DP., 1981 | bœufs | 6 | 1.10 | 2.40 | 1.30 | 1.11 | Oui | 0.225% | 3 | -3 |
| douleur | Ley SJ., 1996 | vaches laitières | 78 | 2.23 | 2.57 | 0.34 | 1.38 | Non | 0.004% | 64 | -14 |
| douleur | Bozzo G., 2018 | taurillons | 60 | 0.32 | 3.43 | 3.11 | 1.30 | Oui | 0.000% | 2 | -58 |
| douleur | Lay DC., 1992 | veaux | 9 | 1.80 | 3.50 | 1.70 | 1.52 | Oui | 0.015% | 3 | -6 |
| douleur | Bozzo G., 2018 | taurillons | 60 | 0.27 | 3.78 | 3.50 | 1.39 | Oui | 0.000% | 2 | -58 |
| douleur | Lay DC., 1992 | veaux | 30 | 2.50 | 5.50 | 3.00 | 2.10 | Oui | 0.000% | 2 | -28 |
| douleur | Hagenmaier JA., 2017 | bœufs | 80 | 1.24 | 7.35 | 6.11 | 2.37 | Oui | 0.000% | 2 | -78 |
| autre | Olson DP., 1981 | veaux | 17 | 2.71 | 7.54 | 4.83 | 2.58 | Oui | 0.000% | 2 | -15 |
| douleur | Hagenmaier JA., 2017 | bœufs | 80 | 1.18 | 8.33 | 7.15 | 2.59 | Oui | 0.000% | 2 | -78 |
| douleur | Rulofson FC., 1988 | bœufs | 5 | 0.32 | 22.97 | 22.65 | 5.53 | Oui | 0.005% | 2 | -3 |

Tableau 3. Exemples d'application de l'incertitude relative élargie (U%)

| Molécule | Référence | Y_{init} | | | Y_{fin} | | | Conclusion possible |
|---------------|----------------------|------------|---------------------------------|-------------------|-----------|---------------------------------|-------------------|---------------------|
| | | Valeur | Incertainitude élargie relative | Intervalle élargi | Valeur | Incertainitude élargie relative | Intervalle élargi | |
| adrénaline | Bozzo G., 2018 | 0.20 | 95% | [0.01 à 0.39] | 0.43 | 75% | [0.11 à 0.75] | non |
| adrénaline | Hagenmaier JA., 2017 | 1.18 | 55% | [0.53 à 1.83] | 5.66 | 34% | [3.72 à 7.6] | oui |
| noradrénaline | Bozzo G., 2018 | 0.32 | 113% | [0 à 0.68] | 0.59 | 84% | [0.09 à 1.09] | non |
| noradrénaline | Hagenmaier JA., 2017 | 1.24 | 59% | [0.51 à 1.97] | 7.35 | 25% | [5.5 à 9.2] | oui |