

**DIRECTIVES MÉTHODOLOGIQUES  
POUR LES ÉTUDES ÉCOTOXICOLOGIQUES  
AVEC DES INDICATEURS BIOCHIMIQUES**

Rapport DT-33



***DIRECTIVES MÉTHODOLOGIQUES POUR  
LES ÉTUDES ÉCOTOXICOLOGIQUES  
AVEC DES INDICATEURS BIOCHIMIQUES***

***François Gagné***

Recherche sur les écosystèmes fluviaux

Recherche sur la protection des écosystèmes aquatiques  
Sciences et technologie – Eau  
Direction générale des sciences et de la technologie  
Environnement Canada

Décembre 2007



---

## *AVANT-PROPOS*

---

Ce rapport est publié dans le cadre du Programme de recherche sur les indicateurs des effets des contaminants aquatiques. Il vise à orienter l'assistant à la recherche ou le chargé de projet sur les modalités à suivre pour mener à bien des activités de recherche en écotoxicologie aquatique en produisant des données bioanalytiques tout en respectant des lignes directrices de contrôle de la qualité adaptées à un contexte de recherche.

Le présent ouvrage fournit des conseils sur la production de données bioanalytiques dans le cadre d'activités de recherche et de développement. Il contient des critères de qualité développés dans un contexte de recherche appliquée afin mieux évaluer les méthodes d'analyse. Il fournit des recommandations sur les étapes d'archivage des données, leur génération, la détermination des variations méthodologiques et de l'essai même et sur la normalisation des méthodes d'analyse dans un contexte de recherche appliquée. D'autres recommandations seront faites pour aider l'expérimentateur à produire des données de qualité lorsque la mesure de biomarqueurs s'étend sur une longue période.



---

# **TABLE DES MATIÈRES**

---

	<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>III</b>
	<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>VII</b>
	<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>VIII</b>
	<b>DÉFINITIONS</b>	<b>IX</b>
	<b>LISTE D'ABRÉVIATIONS</b>	<b>X</b>
<b>CHAPITRE 1</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 2</b>	<b>PROTOCOLES ET PRODUCTION DE DONNÉES BIOANALYTIQUES</b>	<b>5</b>
	<b>PRODUCTION DE DONNÉES À L'ÉTAPE DE L'ANALYSE</b>	<b>5</b>
	<b>TRANSFORMATION DES DONNÉES AUX FINS D'INTERPRÉTATION</b>	<b>6</b>
	<b>CAHIER DE LABORATOIRE</b>	<b>6</b>
<b>CHAPITRE 3</b>	<b>VARIABILITÉ EXPÉRIMENTALE</b>	<b>7</b>
	<b>RÉPÉTABILITÉ DE L'ANALYSE</b>	<b>7</b>
	<b>RÉPÉTABILITÉ DE L'EXPÉRIENCE</b>	<b>8</b>
<b>CHAPITRE 4</b>	<b>NORMALISATION</b>	<b>10</b>
	<b>UTILISATION D'ÉTALONS SPÉCIFIQUES ET GÉNÉRIQUES</b>	<b>10</b>
	<b>EFFET PRODUIT PAR UNE SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE</b>	<b>11</b>
	<b>LIMITE DE DÉTECTION</b>	<b>11</b>
<b>CHAPITRE 5</b>	<b>REPRODUCTIBILITÉ</b>	<b>14</b>
	<b>ÉTALONNAGE</b>	<b>14</b>
	<b>ESSAI</b>	<b>14</b>
	<b>CONSIDÉRATIONS LORS DE L'ANALYSE DE BIOMARQUEURS</b>	<b>15</b>
<b>CHAPITRE 6</b>	<b>CONCLUSION</b>	<b>19</b>
	<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>21</b>

<b>ANNEXE 1</b>	<b>EXEMPLE D'ARCHIVAGE DE DONNÉES BRUTES</b>	22
	Évaluation de la métallothionéine dans des hépatocytes de Truite arc-en-ciel : Exposition des cellules à différentes concentrations de cadmium (CdCl <sub>2</sub> )	22
<b>ANNEXE 2</b>	<b>PROTOCOLES ET DÉTAILS MÉTHODOLOGIQUES</b>	23
	A. Évaluation de la métallothionéine selon la méthode de saturation à l'argent	23
	B. Dosage des protéines selon la méthode de Bradford	24
<b>ANNEXE 3</b>	<b>ÉTAPES DE TRANSFORMATION DES DONNÉES</b>	25
	Évaluation de la métallothionéine dans des hépatocytes de Truite arc-en-ciel : Exposition des cellules à différentes concentrations de cadmium	25
<b>ANNEXE 4</b>	<b>ÉLÉMENTS DE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ</b>	26
	Évaluation de la métallothionéine selon la méthode de saturation à l'argent	26

---

## ***LISTE DES FIGURES***

---

1	Établissement d'une limite de détection de la méthode	13
2	Variations d'un étalon ou d'un matériau de référence dans le temps	16
3	Variations dans le temps des résultats d'analyse d'un biomarqueur sur un même échantillon	17

---

## ***LISTE DES TABLEAUX***

---

1	Critères de qualité relatifs à l'analyse d'un biomarqueur	3
2	Niveaux de contrôle dans un projet de recherche	20

---

## **DÉFINITIONS**

---

- ANALYTE** Substance à analyser dans une matrice biologique ou autre.
- BIOMARQUEUR** Mesure chez un organisme, au niveau moléculaire, cellulaire, ou physiologique, de l'interaction d'un agent physique, chimique ou biologique avec une cible biologique. Cette interaction produit un effet ou un changement qui peut compromettre la santé de l'organisme.
- LIMITE DE DÉTECTION** Valeur correspondant à deux fois l'écart-type de la moyenne du bruit de fond l'appareil de mesure ou bien du plus petit étalon employé par une courbe d'étalonnage.
- VARIATIONS MÉTHODOLOGIQUES OU PRÉCISION** Dispersion des données pour un même échantillon. Cette dispersion s'exprime par l'écart-type de la moyenne si les données sont normalement distribuées ou bien par les 25<sup>e</sup> et 75<sup>e</sup> centiles de la médiane.
- VARIATIONS BIOLOGIQUES** Variations dans la réponse des organismes au cours d'un même essai ou variations observées lorsque l'expérience est répétée avec d'autres organismes.
- SPÉCIFICITÉ D'UNE MÉTHODE** Propriété d'une méthode de rendre compte de la substance analysée malgré les interférences causées par d'autres substances présentes dans la matrice où se trouve le biomarqueur.

---

## ***LISTE D'ABRÉVIATIONS***

---

<i>ADN</i>	Acide désoxyribonucléique
<i>ARN</i>	Acide ribonucléique
<i>CSL</i>	Centre Saint-Laurent
<i>MT</i>	Métallothionéine
<i>LD</i>	Limite de détection

## CHAPITRE 1

# INTRODUCTION

---

Dans les activités de recherche en écotoxicologie, des biomarqueurs sont employés pour évaluer les effets biologiques précoces des contaminants environnementaux. Ces biomarqueurs nécessitent le plus souvent des dosages chimiques sur des macromolécules biologiques, comme les polymères d'acide désoxyribonucléique et ribonucléique, d'acides aminés (c.-à-d. des protéines) et parfois leurs propriétés catalytiques dans certaines réactions biochimiques. Alors que quelques-uns de ces dosages sont identiques aux analyses chimiques, certains se distinguent par le fait que la mesure se fait sur une fonction biologique précise ou sur des molécules généralement plus complexes. Par exemple, la détermination de la sérotonine, un dérivé du tryptophane, dans le cerveau d'un poisson est un exemple de mesure typiquement chimique, alors que la mesure de l'instabilité de la macromolécule de l'ADN en milieu acide est un exemple de mesure biochimique, en ce sens qu'elle fait appel à des macromolécules ou polymères complexes. Ces mesures sont pratiquées le plus souvent dans un contexte toxicologique, c'est-à-dire dans des études destinées à caractériser les effets physiologiques négatifs d'une exposition à des xénobiotiques chez des organismes. Ces organismes sont souvent génétiquement hétérogènes et sous l'influence d'une multitude de facteurs (habitat, nutrition, température, climat, cycle reproducteur), ce qui entraîne davantage de variations biologiques ou variations des réactions des individus aux contaminants (Mayer *et al.*, 1992). Ces variations s'ajoutent aux variations mêmes de la méthode d'analyse. Il devient alors essentiel de différencier les variations méthodologiques des variations biologiques ou du plan expérimental. Pour comprendre le mieux possible les variations biologiques d'un biomarqueur, il faut connaître le plus possible le cycle de vie de l'organisme d'essai, comme sa période de reproduction, sa nutrition, son âge relatif et son habitat (Schulte et Talaska, 1995). Cette connaissance *a priori* de l'organisme est quelquefois difficile dans un contexte de recherche. En effet, certains aspects d'une recherche consistent justement à caractériser les variations naturelles des effets toxiques des contaminants.

Les études toxicologiques font parfois intervenir de nouvelles méthodes ou bien de nouvelles versions de méthodes déjà existantes. Dans la plupart des cas, ces méthodes ont été développées pour les mammifères et requièrent des adaptations pour les organismes aquatiques. Elles sont souvent conçues en laboratoire, mais ne sont pas encore suffisamment au point pour être utilisées pour un suivi. Par ailleurs, les différentes méthodes d'évaluation de certains biomarqueurs auront des avantages et des inconvénients différents. Par exemple, les métallothionéines (MT), qui sont des protéines jouant un rôle dans la protection des organismes contre les métaux, peuvent être mesurées par plusieurs méthodes, comme les essais de saturation à un métal lourd, la polarographie à impulsions, l'immunoessai sur support solide ou le dosage immunoenzymatique, la détermination des ARN messagers par hybridation d'une sonde oligonucléotidique. Ces différentes méthodes possèdent chacune des avantages et des inconvénients, qu'il s'agisse de leur rapidité, leur coût, leur sensibilité, leur spécificité ou leur reproductibilité. Il va sans dire qu'il est recommandé de n'utiliser qu'une seule méthode dans un projet. Ces essais sont la plupart du temps semi-quantitatifs et permettent de déterminer l'expression du biomarqueur d'une manière relative plutôt que de façon absolue. De plus, la valeur mesurée du biomarqueur doit être normalisée en fonction de la biomasse. Cette dernière est aussi déterminée par plusieurs approches, comme le poids humide ou sec du tissu, la quantité totale de protéines ou d'ADN, ou la quantité totale d'azote ammoniacal. Ainsi, la variable mesurée (du biomarqueur) peut être exprimée de plusieurs manières, ce qui peut compliquer les analyses comparatives entre plusieurs groupes de recherche. Dans ce domaine, il y a une pénurie de matériaux de référence pour valider la précision de la méthode, lorsque cette dernière est utilisée pour un suivi temporel.

Néanmoins, certaines précautions peuvent être adoptées pour mieux déterminer la reproductibilité de ces outils de recherche (Soares et Calow, 1993). Le présent rapport vise donc à guider, à l'aide de recommandations, l'expérimentateur ou l'assistant à la recherche dans la production de données bioanalytiques bien caractérisées afin de connaître le contexte et les limites de l'analyse. Les MT serviront d'exemple type tout au long du rapport afin de faciliter la

compréhension. L'objectif de ce rapport n'est pas de répéter les principes d'assurance et de contrôle de la qualité des analyses chimiques, mais de les adapter à des mesures biochimiques en toxicologie de l'environnement. Les méthodes de contrôle de la qualité sont similaires, mais non identiques à celles employées pour les analyses dites « normalisées » qui font appel à des matériaux de référence certifiés lors des évaluations chimiques de routine (Duval, 1995). D'une manière générale, les bonnes pratiques de laboratoire doivent être adoptées avec le plus de rigueur possible.

**TABLEAU 1**  
**CRITÈRES DE QUALITÉ RELATIFS**  
**À L'ANALYSE D'UN BIOMARQUEUR**

<b>CRITÈRES</b>	
Archivage	Fichiers et documents de données brutes
Répétabilité	Détermination des variations expérimentales d'une analyse
Normalisation	Utilisation d'étalons ou de matériaux de référence et détermination de la limite de détection
Variations expérimentales	Variations méthodologiques et variations biologiques intra- ou inter-spécimens
Contrôle de la qualité	Validation des méthodes et du plan expérimental

Dans les activités de recherche, il faut tenir compte de certains critères de qualité lors de la génération de données bioanalytiques (tableau 1). Les données doivent être archivées de manière à permettre de retrouver les données brutes et les paramètres de contrôle de la qualité. L'archivage des données est fait dans un cahier de laboratoire qui doit contenir tous les détails de la méthode utilisée ainsi que ses versions ou modifications s'il y a lieu. La répétabilité et la normalisation doivent être considérées dans toutes les études faisant appel à des données bioanalytiques. On distinguera les variations de l'analyse de celles du plan expérimental. Par la suite, des informations sur la normalisation ou l'étalonnage des méthodes devront être présentées et inclure la limite de détection des méthodes. En recherche, il peut arriver que des normes précises soient absentes.

Dans ce cas, certaines recommandations seront proposées pour permettre une certaine validation de la méthode d'analyse. Enfin, des éléments de contrôle de la qualité seront présentés en fonction des espèces, étant donné l'absence de matériaux certifiés pour certains biomarqueurs. Ces éléments permettront d'utiliser des biomarqueurs pour un suivi temporel.

## **CHAPITRE 2**

# **PROTOCOLES ET PRODUCTION DE DONNÉES BIOANALYTIQUES**

---

### **PRODUCTION DE DONNÉES À L'ÉTAPE DE L'ANALYSE**

Les données obtenues au cours de l'analyse par un instrument quelconque sont normalement identifiées comme des données brutes. Ces données comprennent la mesure du signal d'un instrument pour des blancs, des étalons et des échantillons à l'étude selon une méthode donnée. Il est important d'inclure toutes les informations requises pour transformer ces données brutes en valeurs de mesure à des fins d'analyse statistique. Par exemple, le volume des réactifs utilisé, la concentration des réactifs et des solutions tampons (pH, température d'incubation, etc.) doivent être clairement indiqués dans le cahier de laboratoire ou le fichier de saisie des données brutes. Idéalement, on devrait aussi y trouver la référence méthodologique qui décrit clairement toutes les étapes de l'essai ainsi que tout commentaire pertinent de l'expérimentateur sur la réalisation de l'essai. L'expérimentateur devra avoir en sa possession un cahier de laboratoire décrivant la préparation des solutions employées au moment de l'analyse et la procédure expérimentale, incluant le jour (date du calendrier) où l'essai a été effectué pour référence future au besoin. Un exemple de la feuille de présentation des données brutes est inclus en annexe. Cet exemple montre un dosage de MT sur des hépatocytes de Truite arc-en-ciel exposés pendant 48 heures à différentes concentrations de cadmium. Toutes les variables sont indiquées (volumes, étapes expérimentales, vitesse de centrifugation, facteur de dilution) pour permettre la transformation des données brutes en données finales relatives au biomarqueur. Ces données transformées constituent la valeur mesurée du biomarqueur et seront analysées statistiquement par la suite pour l'interprétation.

## ***TRANSFORMATION DES DONNÉES AUX FINS D'INTERPRÉTATION***

À l'aide de la courbe d'étalonnage, les données brutes sont transformées en valeurs mesurées du biomarqueur. À cette étape, les valeurs mesurées peuvent être normalisées en fonction d'un matériau de référence. Dans l'exemple précédent, les valeurs de la MT peuvent être divisées par la valeur moyenne ou médiane de la MT des témoins pour obtenir un facteur de réponse. Ce dernier peut être utile pour exprimer l'accroissement de l'expression de la MT et pour la comparaison avec d'autres études dans la documentation scientifique ou bien lors d'une répétition de l'essai dans le futur.

## ***CAHIER DE LABORATOIRE***

Les expérimentateurs doivent tenir à jour un cahier de laboratoire dans le but de conserver tous les renseignements pertinents liés à un essai. Le cahier de laboratoire est le « journal de bord » dans lequel les informations doivent être notées clairement afin que l'essai puisse être refait de la même façon par l'expérimentateur ou par un expérimentateur différent. L'information doit être rédigée chronologiquement à l'encre dans le cahier. Elle devrait inclure les observations qui peuvent être utiles pendant l'exécution des différentes étapes expérimentales. Dans un contexte de recherche, chaque expérience, ou hypothèse vérifiée, devra être inscrite avec le jour, le mois et l'année. Le cahier de laboratoire devra comporter une description sommaire de la méthode d'essai ainsi que la référence méthodologique, et inclure les observations pertinentes de l'expérience. Enfin, les résultats obtenus ou la référence au dossier des données brutes (le chemin d'accès au fichier électronique comme Excel par exemple) devront être indiqués. Le cahier devra contenir aussi l'information sur la préparation des diverses solutions (solvants, réactifs, quantités et volumes précis employés).

## **CHAPITRE 3**

# **VARIABILITÉ EXPÉRIMENTALE**

---

### **RÉPÉTABILITÉ DE L'ANALYSE**

Dans toute activité de recherche, la répétabilité doit être déterminée aux étapes de l'analyse et de l'essai. Chaque analyse de blancs, d'échantillons étalons et d'inconnus doit être répétée au moins deux fois. Le nombre de sous-échantillons variera en fonction de la variabilité ou de la précision de la méthode employée.

La répétabilité de l'analyse permet aussi de définir la variabilité de la méthode ou sa précision. La répétabilité d'un essai est évaluée à partir de la dispersion des données autour d'un point central comme la moyenne ou la médiane. Elle est souvent exprimée en coefficient de variation de la moyenne (écart-type/moyenne  $\times 100$ ), lorsque la distribution des données est normale, ou bien sous forme des 25<sup>e</sup>-75<sup>e</sup> centiles de la médiane, si les données adoptent une distribution anormale. On la détermine en refaisant plusieurs fois l'analyse d'un même échantillon pour évaluer les variations de la mesure par rapport à un point central. Le nombre d'échantillons devrait être comparable au nombre prévu d'organismes pour un projet donné. La répétabilité de l'essai aidera ensuite à déterminer la spécificité de la méthode, puisque que l'effet biologique devrait engendrer des réponses qui se différencient des variations méthodologiques. En d'autres termes, les variations chez un individu analysé devraient être plus faibles que les variations entre individus pour pouvoir déterminer un effet significatif sur les individus.

Dans l'analyse, il faut tenir compte de la séquence d'analyse des blancs, des étalons et des échantillons pour déterminer la fidélité d'un instrument de mesure. Avec les lecteurs à microplaque à 96 puits, la lecture se fait dans un intervalle de temps si court ( $< 1$  min) que les variations instrumentales sont négligeables. Si l'on répète l'analyse dans un intervalle de temps donné (par exemple une heure après), les données brutes peuvent différer de celles obtenues auparavant, parce que l'efficacité de l'instrument varie dans le temps (l'énergie de la lampe peut en effet varier dans le temps). Il devient donc essentiel d'inclure des blancs et des étalons analytiques à chaque lecture par l'instrument. Dans le cas de la

spectrométrie, l'intensité spectrale à une longueur d'onde donnée varie dans le temps, ce qui entraîne inévitablement des différences marquées de la transmittance et par conséquent de la fluorescence d'un échantillon. Donc, il est recommandé d'utiliser un blanc et des étalons au moment de l'analyse. Certains instruments sont munis d'un matériau de référence interne, ce qui permet de contrôler davantage ce phénomène.

La fidélité des instruments est encore plus importante dans le cas des instruments de mesure conventionnels où la période de lecture peut prendre plusieurs minutes, voire des heures, ce qui peut avoir des conséquences graves pour les résultats de l'analyse. En effet, si l'instrument perd 30 % de son efficacité, alors la valeur du même échantillon variera de 30 % selon le moment où il est analysé par l'instrument. Dans ce cas, il est recommandé d'analyser d'abord le blanc et les étalons, puis 5 à 10 échantillons, puis de repasser le blanc et l'étalon médian, et ainsi de suite. De cette manière, on peut contrôler et tenir compte des variations de l'efficacité de lecture de l'instrument. L'efficacité de lecture est une caractéristique propre à chaque instrument et se détermine par la relation suivante : variation du signal de l'instrument (signal de l'étalon – signal du blanc)/concentration de l'étalon. Cette caractéristique devient importante dans le cas où plusieurs analyses se feraient sur des instruments différents. En résumé, l'efficacité de l'instrument change dans le temps, et il faut évaluer cette variation à chaque analyse.

## ***RÉPÉTABILITÉ DE L'EXPÉRIENCE***

La notion de répétabilité doit aussi s'étendre à l'essai même, surtout dans un contexte de recherche. Cette approche diffère du contexte de l'analyse de routine d'un échantillon qui a recours à des étalons et des matériaux de référence de matrice similaire. Prenons un essai qui consiste à évaluer un biomarqueur (les MT par exemple) chez des populations de moules provenant de deux sites différents (un site de référence et un site contaminé). Pour commencer, huit individus ont été récoltés pour analyser la teneur en MT d'un tissu cible donné. Les dosages de MT

ont été réalisés en duplicata dans les tissus. En théorie, si les variations méthodologiques sont faibles, et le nombre d'individus, suffisant (c.-à-d. que la taille de l'échantillon est représentative de la population à ces sites), la répétition de cette expérience devrait donner des résultats similaires et aucune différence statistique entre la teneur en MT obtenue par le premier et le deuxième essai pour chacun des sites. Normalement, l'essai est répété au moins trois fois avant d'interpréter d'une manière définitive les résultats obtenus. La répétition des essais permet de vérifier la répétabilité de la méthode et la taille de l'échantillon. En d'autres termes, il faut s'assurer que les différences observées entre les deux sites ne proviennent pas de variations méthodologiques ou d'une taille insuffisante de l'échantillon, en établissant la taille de l'échantillon et le nombre de sous-échantillons de l'analyse. Une taille insuffisante et non représentative de la population entraînera des résultats peu reproductibles. Le fait de répéter l'essai permet de confirmer si l'effet observé à un site donné est reproductible chez les individus de cette population. En d'autres termes, il faut distinguer les variations méthodologiques (dosage répété sur un même échantillon) des variations biologiques ou variations entre individus.

## **CHAPITRE 4**

### **NORMALISATION**

---

La méthode utilisée doit permettre l'utilisation d'étalons et de blancs analytiques. De plus, la mesure de l'échantillon de valeur inconnue doit être incluse dans la gamme de concentrations des étalons utilisés (où il y a linéarité entre le signal de l'instrument et la concentration de l'étalon). Par exemple, si la valeur minimale et la valeur maximale de l'absorbance de la courbe d'étalonnage sont respectivement de 0,01 et 0,22 unité d'absorbance, alors l'absorbance de l'échantillon devrait être incluse dans cette gamme. Le blanc est défini comme la matrice dans laquelle le dosage est réalisé en l'absence de l'analyte. La normalisation de la méthode d'analyse permet entre autres de déterminer la limite de détection de la méthode. La limite de détection peut être établie de deux manières : 1) la valeur du plus petit étalon de la courbe d'étalonnage ou 2) le signal analytique qui correspond à deux fois l'écart-type de la moyenne du bruit de fond de l'instrument lors de la lecture d'un blanc analytique. Puisque ces deux approches ne sont pas équivalentes, il importe de préciser celle employée dans un projet donné.

#### ***UTILISATION D'ÉTALONS SPÉCIFIQUES ET GÉNÉRIQUES***

Lorsqu'il n'existe pas de biomarqueur étalon pour une espèce donnée, il est possible d'employer un biomarqueur étalon d'une autre espèce. Par exemple, la MT étalon de lapin peut être employée pour étalonner l'essai qui serait fait sur un foie de poisson. L'ajout dosé de cet étalon dans l'échantillon permettrait aussi d'étalonner la méthode. Dans cette situation, les données transformées pourront être exprimées en équivalent de l'étalon externe. Par exemple, les résultats d'une évaluation de la MT dans les branchies de moules à l'aide de la MT étalon de lapin seront exprimés en nanomoles de MT mammalienne équivalente/biomasse des branchies.

Les étalons externes peuvent être ajoutés à l'échantillon ou dans une solution séparée de l'échantillon. Si la méthode d'analyse n'est pas sensible aux

interférences de la matrice biologique, alors on peut utiliser une courbe d'étalonnage externe qui consiste à produire des solutions étalons dans une matrice simple comme la solution tampon de l'essai. Dans le cas où la matrice pourrait produire une interférence dans les résultats ou si ce phénomène est inconnu, on recommande alors d'employer un étalon interne, qui consiste en un ajout dosé de l'étalon dans l'échantillon biologique. Si la pente de la courbe d'étalonnage en présence de la matrice (par un ajout dosé dans l'échantillon) est identique à celle de la pente de la courbe d'étalonnage externe, alors l'étalonnage interne n'est plus nécessaire. Cette vérification, qui consiste à établir une équivalence entre les deux méthodes d'étalonnage, peut être réalisée au début du projet lorsque l'on fait intervenir une nouvelle matrice ou un nouvel échantillon biologique.

### ***EFFET PRODUIT PAR UNE SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE***

Dans le cas où il n'existerait pas d'étalon pour une autre espèce, il est possible de valider la méthode avec un toxique de référence qui induirait le biomarqueur chez l'espèce étudiée. Le rapport (valeur du biomarqueur induit/valeur du biomarqueur du témoin) devrait demeurer constant au cours des analyses. Cela devient particulièrement important lorsque l'on réalise des essais sur une longue période de temps. Par exemple, la MT pourrait être induite dans le foie d'un poisson en exposant le poisson à un métal inducteur comme le zinc ou le cadmium. Par la suite, le rapport entre la valeur de la MT induite et celle de la MT témoin est calculé. Il est alors possible de se servir de cet extrait, qui serait congelé à  $-85^{\circ}\text{C}$ , comme une valeur de référence et de vérifier si le rapport demeure constant tout au long de l'essai.

### ***LIMITE DE DÉTECTION***

La limite de détection d'une méthode d'analyse se détermine normalement 1) par la plus petite concentration de l'échantillon étalon employé ou 2) par la valeur qui

correspond à deux fois l'écart-type de la moyenne du bruit de fond de l'instrument. Dans ce dernier cas, une valeur moyenne de lecture qui dépasse  $2 \times$  l'écart-type de la moyenne du bruit de fond est dans la plupart des cas statistiquement significative. Lorsqu'il est possible d'obtenir un échantillon étalon, on peut avoir recours à la plus petite concentration de l'échantillon étalon. En recherche, il arrive qu'un étalon ne soit pas offert sur le marché et que sa préparation dépasse la capacité du laboratoire. Dans ce cas, on peut établir une limite de détection opérationnelle de la méthode. Revenons à l'exemple du dosage de la MT chez huit individus provenant de deux sites et posons l'hypothèse que l'étalon de la MT de cette espèce n'est pas offert sur le marché. À partir de l'extrait initial, des dilutions en série de l'extrait peuvent être réalisées. Il est alors possible de trouver la quantité minimale requise de protéines totales de l'extrait pour pouvoir détecter la substance à analyser. En effet, le rapport de la MT par unité de biomasse (protéine) devrait être constant au cours des dilutions. Lorsque l'on s'approche de la limite de détection d'une des deux méthodes (celle pour la MT et les protéines pour la mesure de la biomasse), la pente créée à partir du biomarqueur et de la biomasse changera lorsque la limite de détection sera atteinte (figure 1).

Cette analyse impose une limite inférieure de la biomasse et du biomarqueur pour normaliser le biomarqueur et l'utiliser d'une manière convenable pour chacun des sites. Cette limite de détection de la méthode permet d'établir des conditions expérimentales optimales pour mesurer la hausse ou la baisse de l'expression du biomarqueur.

Par opposition à la limite de détection de la méthode, il faut connaître si possible la limite supérieure de mesure. En effet, si la quantité du biomarqueur ou de la biomasse est trop élevée, elle peut soit dépasser la capacité des réactifs de la méthode, soit faire en sorte que l'effet de matrice (interférences) devienne plus important que le signal bioanalytique et que de fortes déviations de la pente biomarqueur-biomasse puissent aussi survenir. Normalement, ce phénomène est contrôlé en demeurant dans l'intervalle déterminé par la courbe d'étalonnage ou en demeurant dans la gamme des biomasses étudiées par le biomarqueur

(figure 1), où la pente créée par les valeurs mesurées du biomarqueur et de la biomasse reste invariable.

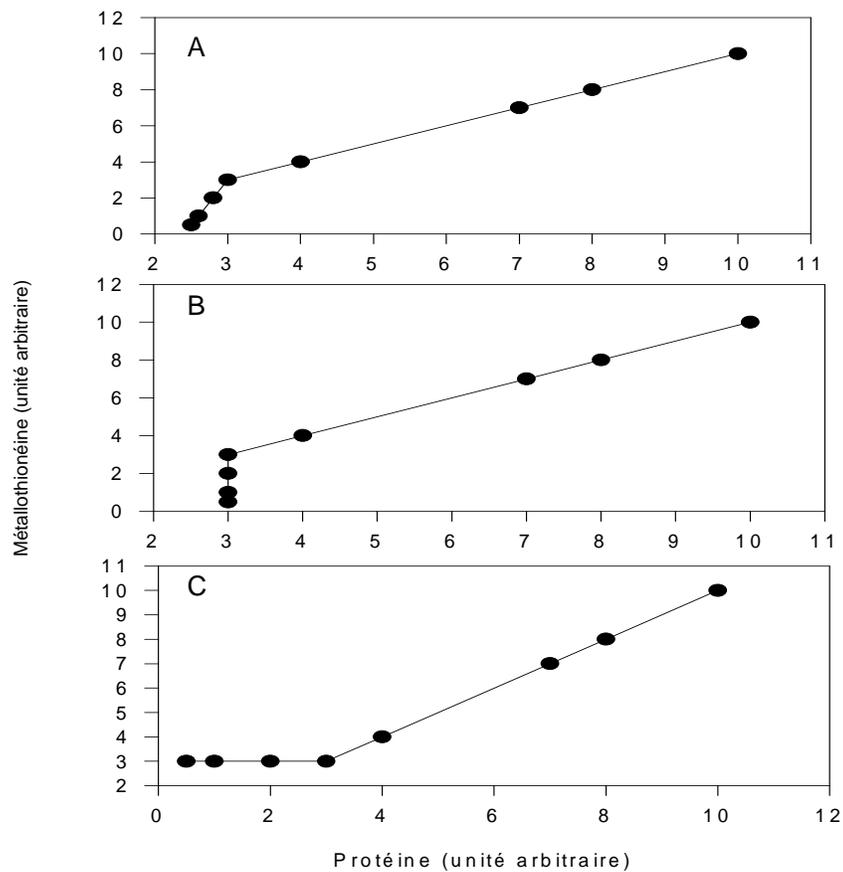
**FIGURE 1**  
**Établissement**  
**d'une limite de**  
**détection de la**  
**méthode**

À mesure que la biomasse diminue et que les valeurs s'approchent de la limite de détection de l'instrument, un changement de la pente créée par les deux variables est alors observé.

A) Exemple où la limite de détection des deux méthodes est atteinte.

B) Cas où la limite de détection de la méthode fondée sur la biomasse seulement est atteinte.

C) Cas où la limite de détection de la méthode fondée sur le biomarqueur seulement est atteinte.



## **CHAPITRE 5**

# **REPRODUCTIBILITÉ**

---

On distingue la reproductibilité de la méthode, de la reproductibilité de l'essai ou de la reproductibilité biologique. La reproductibilité de la méthode est la capacité de la méthode à générer des résultats constants dans le temps et l'espace. Par exemple, une méthode qualifiée de reproductible génère des résultats similaires à partir d'un échantillon identique, quels que soient l'expérimentateur, le temps d'analyse, l'instrument et la date de l'analyse.

### **ÉTALONNAGE**

La pente du signal analytique et de la concentration de l'étalon devrait être constante dans le temps pour une étude donnée. L'ordonnée à l'origine du signal analytique (corrigée avec le blanc analytique) d'un étalon devrait aussi être relativement constante. Ces critères sont intimement liés à la stabilité de l'échantillon à analyser et des réactifs utilisés au moment de l'analyse. À défaut de connaître ce critère, on recommande de clairement indiquer dans le cahier de laboratoire la date de préparation de l'étalon et son origine, avec le numéro de lot de la préparation commerciale si possible.

### **ESSAI**

Comme on l'a mentionné au chapitre 3, l'essai devrait être répété plusieurs fois pour confirmer que les résultats générés produisent des résultats semblables dans la mesure du possible. Par exemple, si le rapport entre la valeur moyenne mesurée de la MT du site contaminé et la valeur moyenne mesurée de la MT du site de référence est de 4, la répétition de l'essai devrait donner une valeur similaire. Dans le cas où le rapport diffère beaucoup, cela indique qu'il y a un problème dans la mesure du biomarqueur.

## **CONSIDÉRATIONS LORS DE L'ANALYSE DE BIOMARQUEURS**

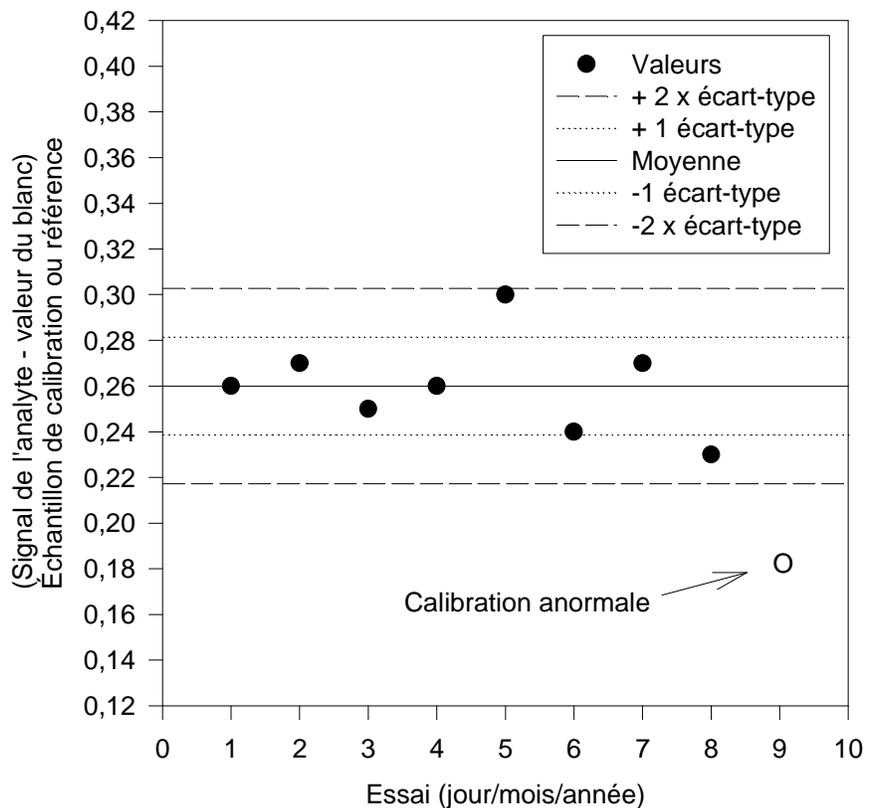
Il est recommandé que les analyses d'un projet soient faites dans les plus brefs délais pour éviter des variations autres qu'une variation temporelle de la méthode. Lorsque l'on ne connaît pas les variations temporelles d'une méthode à cause d'un manque de matériaux de référence, deux options s'offrent à l'expérimentateur. La première option consiste à considérer les rapports entre les valeurs des mesures et un site de référence. On pourrait inclure un témoin positif et un témoin négatif traités par un inducteur de référence. Par exemple, revenons à l'exemple de la mesure de la MT chez huit individus prélevés sur deux sites. Des extraits pourraient être congelés en plusieurs aliquotes pour vérifier si les valeurs mesurées aux deux sites demeurent constantes dans le temps. Les individus pourraient aussi être traités en laboratoire avec un inducteur bien connu de la MT comme le zinc ou le cadmium, et les extraits seraient congelés à  $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$  en plusieurs sous-échantillons. Ainsi, on pourrait utiliser cette référence pour vérifier si des changements surviennent dans la valeur mesurée. Cette approche consiste à se fabriquer un matériau de référence qui est propre au projet (Menditto *et al.*, 2000). En effet, un matériau de référence est utilisé pour 1) retracer les mesures dans le temps, 2) évaluer l'exactitude d'une nouvelle méthode ou d'une méthode existante et 3) évaluer la précision analytique de la méthode. Elle permet ainsi d'évaluer la performance de la méthode d'analyse dans le temps.

La deuxième option consiste à employer un étalon provenant d'une autre espèce et à vérifier si la valeur du signal corrigée par rapport au blanc demeure constante. Nous pourrions alors créer un graphique de contrôle de la mesure de l'étalon pour vérifier si la méthode demeure constante dans le temps (figure 2). Dans le cas où l'étalon différerait d'un lot à l'autre ou que la solution mère se dégraderait dans le temps, des écarts supérieurs à  $2 \times$  l'écart-type seraient observés, ce qui invaliderait la comparaison du biomarqueur aux autres valeurs préalablement mesurées. Dans ce cas, il faudrait analyser de nouveau l'étalon ou bien exclure les résultats de cette analyse de l'interprétation finale. Il serait souhaitable de cryocongeler par précaution des sous-échantillons de l'étalon provenant du même lot selon la durée prévue du projet.

La production d'un graphique de contrôle d'un étalon ou d'un matériau de référence permettrait de comparer plusieurs sites sur de longues périodes de temps. Elle assure une constance dans la calibration des résultats en tenant compte de préparations différentes de réactifs au cours des essais et de l'efficacité de l'instrument. Dans le cas où il n'y aurait pas ce type d'analyse, la comparaison des valeurs mesurées est compromise à moins que ces dernières soient normalisées avec une station de référence, et l'on comparerait des valeurs relatives et non des valeurs absolues.

**FIGURE 2**  
*Variations d'un étalon ou d'un matériau de référence dans le temps*

Graphique de contrôle du signal analytique d'un étalon dans le temps. Les huit premières journées constituent des journées où l'étalonnage est similaire (statistiquement identique), tandis qu'un écart de l'étalonnage est observé le neuvième jour.

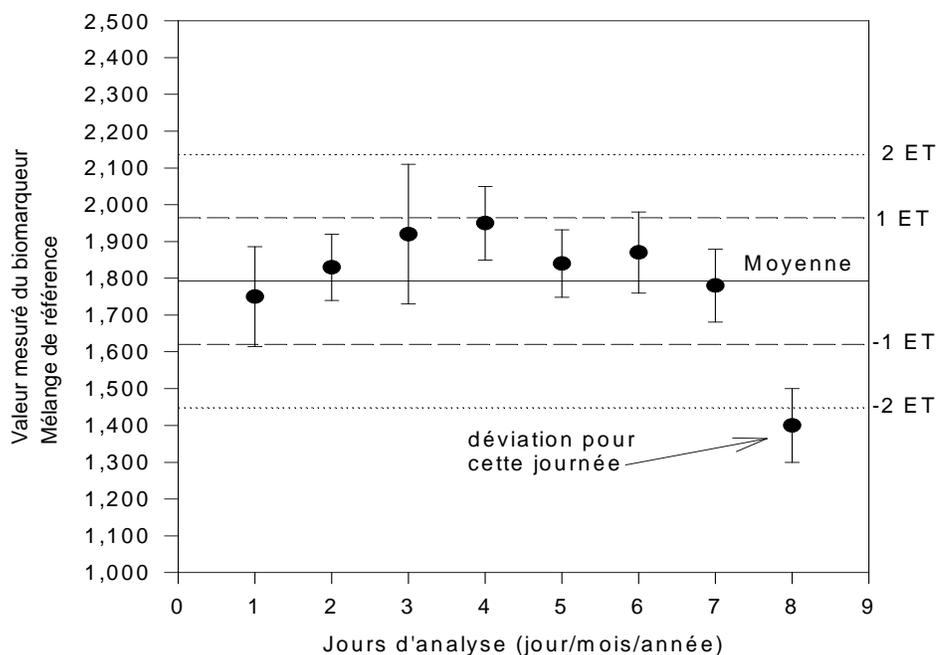


Si des mesures répétées dans le temps sont réalisées et qu'il n'y a pas d'étalons précis, une bonne manière de vérifier la reproductibilité de la méthode d'une

journée à l'autre consiste à subdiviser le nombre d'échantillons d'un mélange composite d'extraits provenant de plusieurs organismes en sous-échantillons et à doser chaque sous-échantillon du même site différents jours. Puisque les sous-échantillons proviennent du même mélange composite, il ne devrait pas avoir de différence significative entre les journées d'analyse (figure 3). La figure 3 montre que la valeur mesurée du biomarqueur (normalisée en fonction de la biomasse) est relativement stable dans le temps. Une analyse de variance permet de vérifier s'il existe une différence significative entre les journées d'analyse.

**FIGURE 3**  
**Variations dans le temps des résultats d'analyse d'un biomarqueur sur un même échantillon**

Lorsque les analyses doivent se faire sur plusieurs journées, on recommande de préparer un échantillon de référence qui sera analysé chaque journée. On observe que les sept premières journées n'entraînent pas de différence, alors que la huitième journée présente un écart significatif. Il faudrait alors reprendre les analyses de cette journée ou bien retirer ces données si le nombre d'échantillons est suffisamment élevé dans le plan expérimental. Les résultats peuvent être aussi exprimés sous forme de graphique de contrôle où la moyenne des analyses et l'écart-type (ET) sont montrés.



Dans la situation où il y aurait un ou plusieurs sites qui différeraient statistiquement, il faudrait soit exclure le site dans l'analyse finale des données ou bien répéter les analyses pour cette journée en prenant soin d'intégrer l'échantillon de référence. Idéalement, on devrait refaire le dosage sur les échantillons des journées où les résultats étaient différents, en incluant la mesure du matériau de référence pour confirmer le résultat bioanalytique. Cette procédure pourrait être adoptée lorsqu'il n'existe pas d'étalon ou de matériau de référence pour le biomarqueur. La figure 3 peut servir de graphique de contrôle, où la moyenne des analyses est en ordonnée et les journées d'analyse en abscisse. Un écart d'environ deux fois l'écart-type de la moyenne serait considéré comme une mauvaise journée d'analyse.

## **CHAPITRE 6**

### **CONCLUSION**

---

Lorsqu'une étude spatiale ou temporelle est envisagée, l'expérimentateur doit préparer un cahier de laboratoire où seront enregistrés la méthode, la préparation des solutions, les réactifs, des blancs analytiques et les étalons ainsi que la date. Il lui faudra respecter les délais de conservation des échantillons selon la méthode employée et déterminer la variabilité de la méthode qui vient d'être développée ou d'être modifiée dans le contexte de la recherche. Selon les résultats obtenus, le nombre de répétitions de l'analyse sera ensuite fixé. Les variations biologiques ou interindividuelles devront être aussi caractérisées par un échantillonnage préliminaire. Advenant l'impossibilité de connaître les variations biologiques de l'espèce à l'étude avant le début des essais, une réplication de 16 individus sera recommandée par traitement pour commencer l'étude. Notons que ces travaux sont réalisés dans un contexte de recherche et de développement de méthodes pour étudier les divers effets des contaminants aquatiques. Si les dosages doivent se répartir sur plusieurs journées, un graphique de contrôle employant un étalon ou un matériau de référence (biomarqueur induit dans le tissu cible à l'aide d'un toxique reconnu ou un échantillon composite) devra être préparé pour contrôler l'éventualité d'un dérapage méthodologique. Cependant, s'il n'existe pas de matériau de référence ou d'étalon, l'expérimentateur devra préparer un échantillon composite dont il congèlera un nombre de sous-échantillons légèrement supérieur au nombre prévu de journées d'analyse. Il devra réserver un certain nombre de sous-échantillons dans l'éventualité d'une reprise de certains essais.

Lorsqu'une méthode vient d'être développée et qu'il n'existe pas d'étalon sur le marché, l'expérimentateur pourra avoir recours à un étalon provenant d'une autre espèce pour étalonner la méthode. Advenant l'inexistence d'un étalon commercial, il est recommandé d'induire la réponse chez l'organisme d'essai à l'aide d'une substance reconnue pour provoquer la réaction recherchée et de se servir de ce témoin positif pour valider la méthode. Ainsi, le rapport entre la valeur mesurée avec l'inducteur de référence et la valeur des témoins devrait demeurer constant au cours de l'essai. L'expérimentateur produira alors un

graphique de contrôle du signal de l'étalon ou du matériau de référence pour chaque essai réalisé dans le temps. Ce graphique de contrôle permettra de valider la méthode lorsque les essais sont réalisés sur une longue période.

**TABLEAU 2**  
**NIVEAUX DE CONTRÔLE DANS UN PROJET DE RECHERCHE**

NIVEAUX DE CONTRÔLE	PARAMÈTRE	COMMENTAIRES
1. Nature du projet	- Objectifs - Hypothèse de l'étude - Protocole utilisé	À inscrire dans un cahier de laboratoire. Sauvegarde électronique des données (base de données)
2. Répétabilité	- Analyse - Expérience	Identifier les caractéristiques du concept expérimental.
3. Variations	- Méthodologiques - Biologiques	Variations intrinsèques du dosage par rapport aux variations biologiques
4. Validation	- Zone de correspondance	Délimiter la zone optimale de biomasse et du biomarqueur. Création d'un graphique qui montre la linéarité entre le biomarqueur et la biomasse.
5. Reproductibilité	- Normalisation  - Rapport entre le signal d'un étalon ou d'un matériau de référence et la concentration - Échantillon composite	Étalon correspondant Étalon externe Induction avec une substance modèle Induction par une substance. Reconnue dans la documentation scientifique comme pouvant augmenter l'expression physiologique du biomarqueur. Produire un graphique de contrôle du rapport dans le temps. Permet de normaliser la méthode dans le temps. Évaluer la concentration du biomarqueur d'un échantillon composite pour chaque journée d'analyse. Permet de confirmer que la méthode génère des résultats semblables dans le temps.

## **RÉFÉRENCES**

---

Duval, D. (1995). « Manuel d'assurance et de contrôle de la qualité ». Environnement Canada, Centre Saint-Laurent. Sections 1-14.

Mayer, F.L., D.J. Versteeg, M.J. McKee, L.C. Folmar, R.L. Graney, D.C. McCume et B.A. Rattner (1992). « Physiological and nonspecific biomarkers », dans R.J. Huggett, R.A. Kimerle, P. Mehrle, H.L. Bergman (dir.), *Biomarkers : Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers. Chapitre 1, p. 5-85.

Menditto, A., S. Palleschi, A. Minoprio, B. Rossi, A. Calibotti, F. Chiodo et M. Patriarca (2000). « Quality assurance in biological monitoring of environmental exposure of pollutants: From reference materials to external quality assessment schemes ». *Microchemical Journal*, 67 : 313-331.

Schulte, P.A. et G. Talaska (1995). « Validity criteria for the use of biological markers of exposure to chemical agents in environmental epidemiology ». *Toxicology*, 101 : 73-88.

Soares, Amadeu M.V.M. et P. Calow (1993). « Seeking standardization in ecotoxicology », *Progress in Standardization of Aquatic Toxicity Tests*. Lewis Publishers. Chapitre 1, p. 1-6.

# ANNEXE 1

## EXEMPLE D'ARCHIVAGE DE DONNÉES BRUTES

### ÉVALUATION DE LA MÉTALLOTHIONÉINE DANS DES HÉPATOCTES DE TRUITE ARC-EN-CIEL : EXPOSITION DES CELLULES À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE CADMIUM (CdCl<sub>2</sub>)

- Milieu de culture : L-15.
- Volume d'incubation : 1 mL.
- Densité cellulaire :  $0,5 \times 10^6$  cellules par millilitre.

Expérience n° 1 (jour/mois/année)

Conditions (48 h et 15 °C)

	JOUR D'ANALYSE	DENSITÉ CELLULAIRE (absorbance à 595 nm)			Ag (ng/mL)		
				MOYENNE			MOYENNE
0	xx	0,3	0,28	0,29	3	4	3,5
	xx	0,32	0,33	0,325	4	5	4,5
	xx	0,33	0,27	0,3	3	2	2,5
25 ppb Cd	xx	0,31	0,27	0,29	4	5	4,5
	xx	0,33	0,31	0,32	3	4	3,5
	xx	0,3	0,26	0,28	5	3	4
50 ppb Cd	xx	0,3	0,28	0,29	4,5	5	4,75
	xx	0,3	0,33	0,315	5	6	5,5
	xx	0,29	0,28	0,285	6	7	6,5
150 ppb Cd	xx	0,3	0,28	0,29	7	9	8
	xx	0,27	0,25	0,26	8	9	8,5
	xx	0,25	0,25	0,25	9	8	8,5
Blanc		0,2	0,18	0,19			
Étalon 1		0,3	0,25	0,275			
Étalon 2		0,34	0,37	0,355			
Étalon 3		0,4	0,42	0,41			

## ANNEXE 2

# PROTOCOLES ET DÉTAILS MÉTHODOLOGIQUES

### A. ÉVALUATION DE LA MÉTALLOTHIONÉINE SELON LA MÉTHODE DE SATURATION À L'ARGENT

Indiquer la provenance du protocole : Protocole du 15 juillet

	VOLUMES	COMMENTAIRES
Échantillons	50 µL	Directement sur les cellules resuspendues dans 100 µL de PBS
Ag ajouté	50 µL	Ag monovalent à 20 mg/L dans le tampon glycine 100 mmol, pH 8,5
Tampon	900 µL	Glycine 100 mmol, pH 8,5

Incubation de 10 min à une température de 22 °C  
Hémoglobine 50 µL 2 % (poids/volume dans l'eau)  
Incubation de 5 min à la température de la pièce  
Temps de dénaturation : 2,5 min dans l'eau bouillante  
Centrifugation : 10 000 g pendant 2 min

Répéter l'ajout d'hémoglobine, la dénaturation thermique et la centrifugation une autre fois.

Retirer 250 µL de surnageant pour l'analyse de l'argent qui reste.

Blanc 50 µL de PBS  
Étalons 1,2 et 3 µg/mL de MT de lapin dans le PBS  
Solution mère dans 1 mg de MT de lapin dans 1 mL de PBS avec 10 mmol de mercaptoéthanol  
Dosage de l'argent par absorption atomique

Diluer l'échantillon 1/20 dans l'eau.  
Étalonner l'instrument avec une courbe d'étalonnage de 0-12 ng/nL d'argent.

Modificateur de matrice : Acide ortho-phosphorique à 1 % (v/v); préparé le *jour/mois/an*  
Doser l'argent en duplicata.  
Étalons : 0, 3, 6, 9, 16 ng/mL d'argent

#### Calculs

Facteur de dilution =  $20/1$  (dilution pour l'analyse de l'argent)  $\times 1000/50$  (lors de l'essai de saturation à l'argent)  
= 400  
et on a 17 moles d'Ag monovalent par mole de MT (référence : Scheuhammer et Cherian, 1986).  
Donc,  $x$  Ag (ng/mL)  $\times 400/107,85$  (g/mol) =  $y$  nmol MT/mL.  
Équation de calibration :  $y = mx + b$   
 $r$  = coefficient de régression  
où  $y$  représente l'absorbance, et  $x$ , la concentration d'argent normalisée.

## B. DOSAGE DES PROTÉINES SELON LA MÉTHODE DE BRADFORD

*Indiquer la provenance du protocole :* Protocole du 15 juillet

	VOLUMES	COMMENTAIRES	RÉPLICATS
Échantillons	10 µL	Cellules diluées 1/10 dans l'eau	3 pour tous les échantillons
Eau	150 µL		
Réactif	40 µL	Réactif de Bradford préparé le : <i>jour/mois/an</i>	

Incubation de 10 min à 22 °C	2 % (poids/volume dans l'eau)
------------------------------	-------------------------------

Blanc	10 µL d'eau
Étalons	10, 20 et 30 µL d'albumine normalisée 200 µg/mL, préparés le : <i>jour/mois/an</i>

Mesurer avec une absorbance de 595 nm.
----------------------------------------

### Calculs

Facteur de dilution =  $10/1$  (dilution de la suspension cellulaire)  $\times 200/10$  (lors de l'essai des protéines totales)  
= 200

Équation de calibration :  $y = mx + b$   
 $r$  = coefficient de régression  
 où  $y$  représente l'absorbance, et  $x$ , la concentration d'albumine normalisée.

## ANNEXE 3

### ÉTAPES DE TRANSFORMATION DES DONNÉES

#### ÉVALUATION DE LA MÉTALLOTHIONÉINE DANS DES HÉPATOCTES DE TRUITE ARC-EN-CIEL : EXPOSITION DES CELLULES À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE CADMIUM (CdCl<sub>2</sub>)

- Milieu de culture : L-15.
- Volume d'incubation : 1 mL.
- Densité cellulaire :  $0,5 \times 10^6$  cellules par millilitre.
- Conditions (48 h et 15 °C)

	DENSITÉ CELLULAIRE (absorbance à 595 nm)			Ag (ng/mL)			MT	
		Moyenne			Moyenne		(nmol/mL)	Correction biomasse
0	0,3	0,28	0,29	3	4	3,5	<b>1,298 5</b>	<b>4,477 586 21</b>
	0,32	0,33	0,325	4	5	4,5	<b>1,669 5</b>	<b>5,136 923 08</b>
	0,33	0,27	0,3	3	2	2,5	<b>0,927 5</b>	<b>3,091 666 67</b> #DIV/0!
25 ppb Cd	0,31	0,27	0,29	4	5	4,5	<b>1,669 5</b>	<b>5,756 896 55</b>
	0,33	0,31	0,32	3	4	3,5	<b>1,298 5</b>	<b>4,057 812 5</b>
	0,3	0,26	0,28	5	3	4	<b>1,484</b>	<b>5,3</b> #DIV/0!
50 ppb Cd	0,3	0,28	0,29	4,5	5	4,75	<b>1,762 25</b>	<b>6,076 724 14</b>
	0,3	0,33	0,315	5	6	5,5	<b>2,040 5</b>	<b>6,477 777 78</b>
	0,29	0,28	0,285	6	7	6,5	<b>2,411 5</b>	<b>8,461 403 51</b> #DIV/0!
150 ppb Cd	0,3	0,28	0,29	7	9	8	<b>2,968</b>	<b>10,234 482 8</b>
	0,27	0,25	0,26	8	9	8,5	<b>3,153 5</b>	<b>12,128 846 2</b>
	0,25	0,25	0,25	9	8	8,5	<b>3,153 5</b>	<b>12,614</b>
Blanc	0,2	0,18	0,19				<b>0</b>	
Étalon 1	0,3	0,25	0,275				<b>2,040 5</b>	
Étalon 2	0,34	0,37	0,355				<b>3,524 5</b>	
Étalon 3	0,4	0,42	0,41				<b>6,307</b>	

#### Calculs

$r = 0,99$  et  $y = -0,09 + 2,04 x$  où  $y$  représente la valeur de l'étalon, et  $x$  la valeur mesurée.

Facteur de réponse :  $3,5245/2 = 1,7655$

Inscrire : *jour/mois/an*

# ANNEXE 4

## ÉLÉMENTS DE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

### ÉVALUATION DE LA MÉTALLOTHIONÉINE SELON LA MÉTHODE DE SATURATION À L'ARGENT

#### A. Nombre de répétitions ou de sous-échantillons

Analyses	2
Échantillons ou individus	3

#### B. Variations de la méthode

Valeurs mesurées dans un même échantillon (préciser sa nature)	2 1,9 2,1 1,8 2,1
Moyenne	1,98
Écart-type	0,1
Coefficient de variation	6 %

#### C. Variations biologiques

Individu n°	Moyenne des valeurs mesurées (nmol/mg protéines)
1	2
2	3
3	2,2
4	1,5
5	1,8
6	2,3
7	3,2
8	2,8

#### D. Variations temporelles du signal d'un étalon

Type d'étalon	MT de lapin de Sigma (lot n° <i>xxx</i> )
Solution mère	1 mg/mL dans 10 mmol de tris-dithiothréitol, pH 8,0, aliquotes congelées à -85 °C
Rapport (signal/blanc)	µg/mL d'étalon
15-05-00	0,25
17-05-00	0,2
28-05-00	0,27
15-06-00	0,22
17-07-00	0,28
Moyenne	0,244
Écart-type	0,03
2 écarts-types	0,06
Zone de tolérance	0,304-0,184 Moyenne + 2 écarts-types = 0,304 Moyenne - 2 écarts-types = 0,184 Toutes les valeurs sont incluses dans la zone de tolérance.