HAL open science

Validation de la méthode de quantification de l'azote par analyseur élémentaire méthode Dumas et détermination des conditions d'utilisation d'après son incertitude de mesure et son seuil de discrimination

David Alvarez, Stéphane Andanson, Sibille Perrochon, Jacques Le Gouis, Catherine Ravel

To cite this version:

David Alvarez, Stéphane Andanson, Sibille Perrochon, Jacques Le Gouis, Catherine Ravel. Validation de la méthode de quantification de l'azote par analyseur élémentaire méthode Dumas et détermination des conditions d'utilisation d'après son incertitude de mesure et son seuil de discrimination. Cahier des Techniques de l'INRA, 2021, 105, pp.13-33. hal-03184227

HAL Id: hal-03184227

https://hal.inrae.fr/hal-03184227v1

Submitted on 7 Apr 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

Validation de la méthode de quantification de l'azote par analyseur élémentaire méthode Dumas et détermination des conditions d'utilisation d'après son incertitude de mesure et son seuil de discrimination.

David Alvarez1, Stéphane Andanson2, Sibille Perrochon1, Jean Le Gouis1, Catherine Ravel1

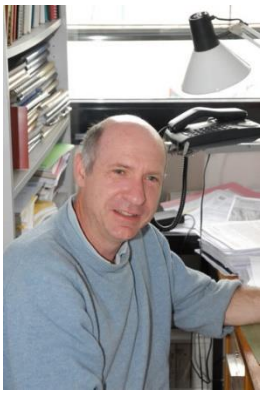
David ALVAREZ
Formation - Baccalauréat sciences et techniques agronomiques (1991), BTSA Technique et Gestion des industries du lait et des viandes (1993).
J'ai commencé à travailler à INRAE sur le site de Theix en 2002. J'étudiais les mycotoxines dans l'alimentation du bétail, autant sur la stabilité des toxines dans l'aliment que le devenir des toxines une fois ingérées par l'animal.
Depuis 2011 j'ai rejoint l'unité GDEC sur le site de Clermont-Ferrand. Je travaille dans l'équipe Qualigrain sur la qualité du blé et tout particulièrement sur les protéines du gluten, les gliadines et les gluténines, dans des conditions de stress thermique, hydrique ou nutritionnel ou encore sur leurs effets santé.

Stéphane Andanson
J'ai commencé ma carrière à l'INRA sur le site de Theix en 1993. Je suis titulaire d'un BTS en analyses biologiques et biotechnologiques et je suis ingénieur d'études « analyste ». Mon métier consiste à développer des méthodes d'analyse au service d'une thématique scientifique.
Je le pratique aujourd'hui au sein de l'unité PIAF sur le site de Crouël pour quantifier des composés chimiques nécessaires à la compréhension de l'adaptation des arbres aux contraintes environnementales.
Dès mes premiers développements de méthodes, j'ai intégré une approche métrologique dans ma démarche pour fiabiliser mon travail. Cette expérience m'a amené à proposer un nouveau critère de chimiométrie ; le « seuil de discrimination » qui permet

[1] *UMR GDEC, Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), Université Clermont Auvergne, 5 Chemin de Beaulieu, 63000 Clermont-Ferrand, France, david.alvarez@inrae.fr (auteur de correspondance)*
[2] *UMR PIAF, Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), Université Clermont Auvergne, 5 Chemin de Beaulieu, 63000 Clermont-Ferrand, France*

de définir les conditions d'utilisation d'une méthode d'analyse pour atteindre l'objectif analytique d'un projet de recherche. Je partage cette expérience dans mes missions qualité en proposant un appui aux « analystes » du centre Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes et au niveau INRAE avec le réseau M^3 développé par DIAGONAL.

Sibille Perrochon
Formation : DUT Biologie Appliquée (Clermont-Ferrand, 1994), MST « Techniques Bio Industrielles (Orléans, 1996), DESS « conception, valorisation, analyse du médicament » (Rennes, 1997).
Après un début de carrière dans une entreprise de biotechnologies en tant que biochimiste en purification de protéines recombinantes exprimées dans le système plante, j'ai intégré INRAE en 2006 comme assistante ingénieur biologie. J'ai débuté mon travail au sein d'une plateforme de protéomique, avant de me spécialiser dans l'analyse de la composition des protéines de réserve du blé, les gliadines et les gluténines, protéines responsables de la formation du gluten. Je travaille aujourd'hui dans l'équipe QualiGrain pour différents programmes de recherches impliqués dans la qualité des protéines du grain de blé, ainsi que leurs effets santé, notamment dans la digestibilité du gluten.



Jacques LE GOUIS
Formation – Diplôme d'ingénieur agronome (1988), Doctorat en génétique et amélioration des plantes (1992).
J'ai commencé à travailler à l'INRA en Picardie à Estrées-Mons en 1993. D'abord impliqué dans des études sur la résistance au virus de l'orge, j'ai ensuite étudié la variabilité génétique pour la tolérance au stress du blé tendre.
J'ai rejoint l'unité GDEC sur le site de Clermont-Ferrand en 2007 pour travailler plus particulièrement sur la concentration en protéines et l'utilisation de l'azote, toujours sur le blé tendre. Je suis responsable de l'équipe QualiGrain qui a pour objectif de développer des connaissances et des outils pour faciliter la sélection de variétés de blé tendre répondant aux critères de qualité et adaptées aux nouveaux contextes de production.

Catherine RAVEL
Formation – Diplôme d'ingénieur agronome (1987), Doctorat en génétique et amélioration des plantes (1997).
Recrutée à l'INRA en 1989, j'ai commencé ma carrière comme sélectionneuse du ray grass anglais à la station d'amélioration des plantes de Clermont-Ferrand appelée aujourd'hui GDEC. C'est dans cette station que j'ai travaillé ensuite sur la symbiose Poacées-endophytes symbiotiques du genre *Neotyphodium* puis sur la synthèse des protéines de réserve (protéines du gluten) chez le blé tendre.
Je travaille aujourd'hui dans l'équipe Qualigrain animée par J. Le Gouis où je m'intéresse tout particulièrement aux facteurs qui influencent la composition en protéines de réserve pour en améliorer la qualité technologique et la qualité santé, notamment la digestibilité.

Résumé De nombreuses études biologiques ont pour objectif de mettre en évidence des différences de concentration pour un analyte donné entre des individus ou entre des traitements expérimentaux. Pour répondre à cet objectif, il faut disposer d'une méthode d'analyse adaptée, capable de détecter ces différences. La validation de méthode mise en œuvre dans la politique qualité INRAE permet de modéliser et d'évaluer l'incertitude de mesure et de calculer le seuil de discrimination des méthodes analytiques. Dans le travail présenté ici, nous avons appliqué ces techniques de validation à une méthode de dosage de l'azote dans de la farine de blé par analyseur élémentaire. Nous avons modélisé l'incertitude de mesure dans trois conditions de répétitions techniques (RT) c'est-à-dire en obtenant la valeur des échantillons de validation à partir d'une, deux ou trois répétitions de mesure. L'augmentation du nombre de RT permet d'améliorer l'incertitude de mesure de la méthode et sa capacité à discriminer des teneurs proches. Les résultats obtenus permettent de mieux connaitre la méthode utilisée et de définir *a priori* les conditions de son utilisation en matière de nombre de mesures qu'il lui faut effectuer, en définissant la taille minimale du lot expérimental ou le nombre de RT, qui lui permettront de détecter une différence potentielle à mesurer entre deux lots expérimentaux et, par conséquent, de conseiller objectivement un commanditaire sur le schéma expérimental à suivre.

Mots clés Analyseur élémentaire méthode Dumas (CNS), azote (N), incertitude de mesure (IM), seuil de discrimination.

Abstract Many biological studies aim to reveal differences in concentration for a given analyte between individuals or between experimental treatments. To meet this objective, a suitable analytical method capable of detecting the desired differences is required. The method validation implemented in the INRAE quality policy allows to establish a measurement uncertainty curve and to calculate the discrimination threshold of analytical methods. In the work presented here, we have used these validation techniques for a method used to quantify nitrogen in wheat flour using an elemental analyser. We modelized the measurement uncertainty in three conditions based on technical repetitions i.e. by quantifying validation samples once, twice or three times. Increasing the number of technical repetitions is a way to improve the measurement uncertainty of the method and to make it able to discriminate closer measurements. The results obtained therefore allow a better knowledge of the method used. Consequently, a client can be advised objectively concerning the analyses to be carried out according to the desired level of discrimination.

Keywords Discrimination threshold, Dumas method (CNS), Nitrogen (N), measurement uncertainty (MI)

Introduction

Les méthodes d'analyse présentent toutes des performances analytiques spécifiques et différentes qu'il est nécessaire d'évaluer et de prendre en compte *a priori* notamment pour définir les conditions de leur utilisation en fonction d'un objectif analytique à atteindre dans le cadre d'une étude scientifique. Ce travail revient à l'analyste responsable de la méthode d'analyse et se compose de deux niveaux d'action. Le premier consiste à valider la méthode d'analyse pour définir ses performances en matière d'incertitude de mesure (IM) et d'exactitude puis à vérifier si les valeurs de ce critère sont inférieures à des limites d'acceptabilité qui sont définies par les futurs utilisateurs. Ces limites peuvent également être proposées en fonction de leur famille analytique comme le fait la Food and Drug Administration (FDA) pour les méthodes bio-analytiques. Il est défini par cette vérification une forme de conformité de la méthode d'analyse d'après des performances requises pour un principe analytique. Le second niveau consiste, en fonction des performances de la méthode, à définir ses conditions d'utilisation. Dans le cas où elle est utilisée pour quantifier des biomarqueurs pour mettre en évidence des différences entre génotypes ou entre des traitements expérimentaux, il est fondamental d'évaluer également *a priori* son seuil de discrimination (SD), c'est-à-dire sa capacité à détecter ces différences de valeurs. Le SD est un nouveau critère de chimiométrie proposé par Stéphane Andanson (Andanson *et al.* 2018) calculé à partir de l'IM. Il correspond à la plus petite différence de concentration entre deux échantillons détectables par une méthode d'analyse et dans le cas de détection de changements moyens observés avant et après un traitement sur plusieurs individus ou entre deux lots expérimentaux, il permet le calcul de la taille minimale de ces lots à partir de laquelle la différence observée sera significative (Andanson *et al.* 2019). Cet effectif minimal correspond aux répétitions de mesures nécessaires pour pallier le défaut de fiabilité de la méthode d'analyse et définit ainsi les conditions de son utilisation à respecter pour qu'elle puisse jouer le rôle analytique prévu. L'analyste dispose avec ce critère et avec le programme de

réalisation d'un profil d'exactitude[3] développé par Max Feinberg (Feinberg, 2009, 2010), (pour la mise en œuvre, consulter numéro spécial de 2009 du Cahier des Techniques de l'INRA[4]) qui modélise et calcule automatiquement l'IM, d'outils pour valider une méthode, calculer son IM et proposer les conditions de son utilisation dans le cadre d'une étude scientifique. Cette démarche d'ensemble permettra au responsable d'un projet de recherche, de définir à son tour les conditions de réalisation de son étude en ajoutant par exemple à l'effectif minimal, un nombre de répétitions supplémentaires pour pallier la variabilité biologique du phénomène étudié et obtenir un effectif définitif pour valider ou invalider ses hypothèses scientifiques.

Dans cette étude, nous présentons la démarche complète de validation et de définition des conditions d'utilisation dans le cas de la méthode d'analyse de l'azote (N) de la farine de blé par analyseur élémentaire selon la méthode Dumas (Dumas 1831). Elle a été développée au laboratoire pour détecter des changements de concentration de l'N contenu dans la farine lorsque le blé est soumis à différents facteurs environnementaux ou pour comparer des différents génotypes. Dans l'objectif de disposer d'une possibilité supplémentaire pour pallier l'IM de notre méthode avec l'utilisation d'un effectif minimal, nous avons réduit la taille de l'IM en répétant la mesure du même échantillon ce qui correspond à exécuter des répétitions techniques (RT) pour en obtenir une valeur moyenne plus fiable et par voie de répercussion augmenter la capacité à discriminer de la méthode d'analyse. Nous avons réalisé jusqu'à trois RT ce qui est complètement possible au laboratoire. A partir de là, nous avons construit trois modélisations différentes de l'IM. D'abord, nous avons considéré les valeurs obtenues pour les échantillons de validation d'une seule RT. Ensuite, la modélisation a pris en compte la moyenne de deux RT et enfin la moyenne des trois RT. Elles ont été réalisées à partir d'échantillons de validation dont l'amplitude des teneurs correspond à l'étendue possible des teneurs d'N des futurs échantillons à analyser, selon la préconisation de Feinberg *et al.* (2004). Des études récentes ont montré que le pourcentage d'N pour des farines obtenues à partir d'un panel diversifié de variétés de blé, cultivées dans différents environnements variait de 1.5 % à 2.8 % N environ. Cependant des études plus anciennes à partir d'essais conduits en conditions de faible fertilisation azotée ont montré des teneurs en N de 0.5 % minimum (Plessis *et al.* 2013). Les modélisations de l'IM ont donc été réalisées sur une gamme allant de 0.5 à 3.0 % d'N.

Nous présentons dans cette étude, la démarche de validation de notre méthode d'analyse par le profil d'exactitude, puis la démarche de définition de son utilisation dans l'objectif de mesurer un changement de la teneur en N de la farine issue de deux variétés de blé ou d'une même variété de blé soumise à deux traitements. Nous comparons les trois modélisations de l'IM, et proposons au travers d'exemples, le calcul des SD et des tailles minimales des échantillons expérimentaux à utiliser correspondants pour définir les conditions d'utilisation de la méthode en regard d'une différence potentielle à détecter.

---

[3] Téléchargeable sur https://intranet.inrae.fr/qualite/Outils/Validation-de-methodes

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

Matériels et méthodes

Méthode d'analyse et matériel de validation

Méthode Dumas d'analyse de l'azote du blé

La méthode Dumas, mise au point en 1831, est une méthode analytique qui permet de doser l'N total dans les composés organiques (Dumas 1831). Nous utilisons un analyseur élémentaire de marque Thermo modèle Flash EA 1112 Séries (Thermo Finnigan, USA) qui est un appareil de chromatographie gazeuse. Cet appareil suit la norme « ISO 16634-2 : 2016 », sur la « Détermination de la teneur en N total par combustion selon le principe Dumas et calcul de la teneur en protéines brutes - Partie 2 : Céréales, légumineuses et produits céréaliers de mouture ». Rapidement, pour cet appareil, la méthode consiste à provoquer, grâce à un apport d'oxygène, une « flash combustion » de l'échantillon qui passe alors sous forme gazeuse. Transporté au travers d'un circuit de colonnes par de l'hélium (gaz vecteur inerte), il subit des réactions d'oxydoréductions qui le décomposent en carbone (C), azote (N) et soufre (S). En fin de circuit, une colonne chromatographique sépare ces éléments qui sont ensuite détectés par un catharomètre (détecteur à conductibilité thermique) et convertis en chromatogramme. Les recommandations du constructeur sont suivies pour la configuration de l'appareil (Tableau 1) et pour les réactifs utilisés qui diffèrent selon les éléments à doser.

Left furnace	950°C	Gas flow Carrier	140 ml/min
Right furnace	750°C	Oxygen	130 ml/min
Oven	40°C	Reference	160 ml/min
Cycle (Run Time)	310 s		
Sampling Delay	15s		
Oxygen Injection End	10s		

Tableau 1. Paramètres de l'analyseur CNS Thermo modèle Flash EA 1112 Séries

La combustion de l'échantillon se déroule dans un premier four (« furnace »), chauffé à 950°C, où nous retrouvons le réacteur avec un catalyseur d'oxydation (réf thermo : 33840000). Puis les gaz passent dans un second four, chauffé à 750°C, où nous retrouvons une colonne en Quartz avec des grains de cuivre (réf Thermo : 33835300). Après être passé dans un piège à eau, les éléments sont séparés sur la colonne de chromatographie GC CHNS (réf thermo :26008215) placée dans un autre four (« oven ») à 40°C.

Cet appareil permet de doser l'N total de n'importe quelle poudre homogène (comme la farine) sans effet matrice. Selon les recommandations du fabriquant, la prise d'essai maximum est d'environ 5 mg, d'où l'importance de l'homogénéité de l'échantillon.

Préparation des échantillons

Pour le blé, les grains sont réduits en farine à l'aide d'un broyeur à billes. Ce broyeur est un prototype que nous avons fait fabriquer sur mesure par la SARL « Falaise » (Saint-Sylvestre-Pragoulin, 63). Il permet de broyer simultanément jusqu'à 90 échantillons. Le broyage est réalisé dans des tubes de 30 ml (Sarstedt) résistants aux chocs contenant 2 à 3 grammes de grains et deux billes en acier de 15 mm de diamètre. La durée du broyage pour obtenir une farine *a priori* homogène varie de quatre à six minutes (deux ou trois séries de 120 secondes), selon la résistance des échantillons.

La prise d'essai pour l'analyse est pesée avec une balance de précision (Mettler Toledo, XP26, précision 0.001 mg), posée sur un marbre. Elle est introduite dans une petite capsule en étain (8 x 5 mm ou 9 x 5 mm selon la marque) et sa masse, qui doit être comprise entre 4.3 et 5.2 mg, est notée. En général, une seule répétition est réalisée. La matière sèche des échantillons est aussi mesurée le jour de la pesée. Elle servira à corriger les résultats d'N pour les exprimer par rapport à la matière sèche.

Mode opératoire du dosage

Tout d'abord, la méthode de dosage doit être étalonnée. Pour cela, une gamme est préparée avec des étalons de teneur connue en N. Cette gamme doit encadrer les valeurs des échantillons à analyser. Deux étalons sont utilisés, le BBOT, un produit du commerce dont la teneur en N est garantie autour de 6.5 % selon les lots, et une poudre de maïs à 1.28 %, certifiée par l'USRAV INRAE à Bordeaux. Pour chaque analyse CNS, dix points de gamme sont réalisés, la moitié au début de la série et l'autre moitié en fin de série. Une équation de calibration est obtenue pour mettre en relation les surfaces de pic et les quantités théoriques calculées d'N, ce pour chaque point de la gamme. Ensuite, les points de gamme sont traités comme des échantillons inconnus. Leurs surfaces sont entrées dans l'équation de calibration pour obtenir leur concentration. On calcule ensuite le coefficient de variation (CV) des concentrations entre tous les points du même type de standard. L'analyse est jugée correcte si les coefficients de variation sont inférieurs à 5 %.

Finalement, la gamme obtenue servira à calculer la quantité d'N (en µg) dans l'échantillon étudié en tenant compte de la masse de la prise d'essai. Cette quantité d'N sera aussi exprimée en pourcentage (%N) par rapport à la matière sèche (il faudra donc tenir compte de la masse de la prise d'essai corrigée par la matière sèche de l'échantillon).

Mise en œuvre de la validation

- **Echantillons de validation**

Pour valider la méthode d'analyse de l'N dans le blé, sachant que nous travaillons dans une gamme allant de 0.5 % à 3.0 % d'N environ, nous avons constitué des échantillons de validation pour couvrir cette plage de valeurs. Pour

cela, nous avons choisi à partir de résultats obtenus précédemment six lots de grains dont la teneur en N variait de 1.43 à 2.87 %. Les farines obtenues après broyage ont été certifiées par l'USRAV. Comme attendu, leur teneur en N varie régulièrement de 1.43 % à 2.87 % (1.43 %, 1.64 %, 2.07 %, 2.26 %, 2.79 % et 2.87 %). Faute de grains, nous n'avons pu opérer de la même façon pour les teneurs en N plus faibles (entre 0.50 et 1.43 %). Par conséquent, pour ces faibles teneurs, nous avons utilisé la poudre de maïs certifiée utilisée pour la réalisation des gammes de calibration. La méthode n'ayant pas d'effet matrice, nous avons fait varier les prises d'essai de la poudre de maïs comme nous le faisons pour la gamme. Pour ajouter deux niveaux inférieurs à 1.43 % d'N, nous avons effectué une prise d'essai de 5/8 (entre 2.8 et 3.2 mg) de la prise d'essai habituelle et une autre de 1/4 (entre 1.1 et 1.3 mg), simulant ainsi des concentrations d'N de 0.80 % et 0.32 %, respectivement. De même pour bien encadrer les valeurs supérieures du pourcentage d'N de la farine de blé, nous avons utilisé le BBOT à 6.51 % d'N avec une prise d'essai de 2/3 (entre 3.0 et 3.4 mg) de la prise d'essai habituelle pour mimer une concentration de 4.34 % N.

Pour la suite du travail, nous avons retenu sept échantillons de validation parmi les neuf dont nous disposions (deux poudres de maïs, six farines de blé et un BBOT), à savoir les deux poudres de maïs (0.80 et 0.32 % d'N), quatre farines de blé (1.43, 1.64, 2.26 et 2.79 % d'N) et le BBOT à 4.34 % d'N.

- **Répétitions techniques**

Les RT permettent de calculer une valeur moyenne de mesure d'un échantillon qui est normalement plus fiable car obtenue à partir de répétitions de mesure, et donc de réduire l'IM. Dans notre cas, l'individu expérimental est constitué de 5 mg d'une farine. Cette farine est produite par plusieurs grains, récoltés sur plusieurs plantes. Cet individu peut cacher une certaine hétérogénéité, ce qui représente une source de variabilité supplémentaire à l'IM. Dans ces conditions, on peut donc se demander quelle est l'influence de répéter plusieurs fois la mesure (doser plusieurs échantillons de 5 mg d'une même farine donc procéder à des RT) sur la taille de l'IM et donc sur le seuil de discrimination (SD). Pour cela, nous avons réalisé systématiquement trois fois la mesure de chaque échantillon de validation lors d'un dosage, soit trois RT (notées chacune RT1, RT2 et RT3). A partir de ces trois RT, nous avons pu constituer trois conditions de validations, CV1, CV2 et CV3, correspondant pour la première aux résultats RT1, pour la deuxième aux moyennes entre RT1 et RT2 et pour la troisième aux moyennes entre RT1, RT2 et RT3.

- **Schéma de validation**

Pour déterminer les profils d'exactitude et la fonction d'incertitude, appréhender l'influence des RT et *in fine* répondre à nos questions concernant la discrimination de mesure, nous avons analysé chaque échantillon de validation cinq fois par jour en réalisant pour chacun trois RT (Fig. 1). Ces cinq répétitions journalières ont nécessité 15 pesées (les trois analyses pour les RT sont réalisées successivement) par échantillon de validation. Tous les échantillons sont identifiés correctement. Ces analyses sont refaites cinq jours différents par deux manipulateurs.

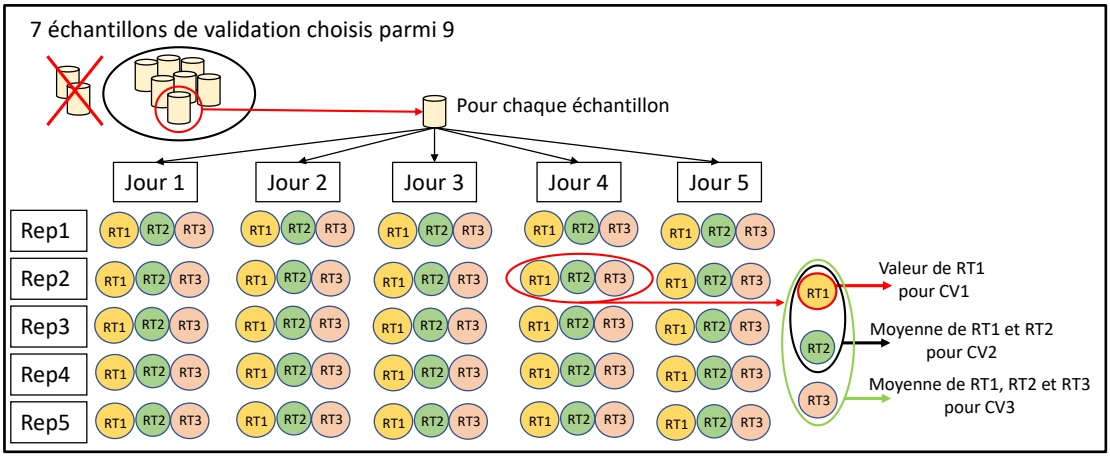


Figure 1. Schéma de validation

Les résultats des analyses sont saisis dans les feuilles de calculs de l'outil Excel disponibles sur https://intranet.inrae.fr/qualite/Outils/Validation-de-methodes et visualisés. L'utilisation de ces feuilles de calcul est recommandée par le Pôle d'Aide au Pilotage par le Management Qualité (APMQ) d'INRAE comme procédure de validation des méthodes d'analyse. Tous les détails de leur construction sont disponibles dans un numéro spécial de 2010 du Cahier de Techniques de l'INRA ou dans les publications de Feinberg (2009) et Hubert *et al.* (2004, 2007a et 2007b).

Formules et définitions des outils de validation

Profil d'exactitude et fonction d'incertitude

Le profil d'exactitude a été établi comme décrit dans Andanson *et al.* (2019). Rapidement, pour établir ce profil, le taux de recouvrement moyen (qui, exprimé en pourcentage, correspond au rapport de la moyenne des mesures réalisées sur la valeur de référence attendue, ce pour un échantillon donné) est tracé en fonction de la concentration en N des sept échantillons de validation. Il représente le biais de la méthode d'analyse. Des intervalles de tolérance et d'acceptabilité sont définis pour chacune de ces sept valeurs. Les limites de tolérance calculées à partir de l'IM obtenue pour chaque échantillon de validation représentent l'erreur aléatoire de la méthode d'analyse. Elles ont été fixées à 80 % représentant un intervalle de prédiction dans lequel il est probable de retrouver 80 % des futurs résultats de mesure. Les limites de l'intervalle d'acceptabilité ont été fixées à 30 % d'après les recommandations de la Food and Drug Administration (FDA) pour les méthodes bio-analytiques et représentent la performance souhaitée de la méthode d'analyse en matière d'erreur de mesure.

La relation entre les IM exprimées sous la forme d'une incertitude type notée $u(Y)$ des échantillons de validation dérivée du profil d'exactitude et leur concentration Y est modélisée d'après une fonction puissance qui semble être le modèle le plus adapté en chimie analytique :

$$u(Y) = bY^c \ (1)$$

Les deux coefficients b et c sont estimés par une régression par la méthode des moindres carrés. Cette modélisation permet le calcul de l'IM pour toute valeur Y comprise dans le domaine de validation de la méthode d'analyse.

Tous les calculs pour construire le profil d'exactitude et la fonction d'incertitude sont réalisés à l'aide des feuilles de calcul Microsoft Excel® disponibles en suivant le lien https://intranet.inrae.fr/qualite/Outils/Validation-de-methodes

Seuil de discrimination

Le SD permet de déterminer si une méthode peut détecter une différence entre deux concentrations d'un même analyte. Il est défini comme « 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) et correspond à la plus grande variation non détectable.

Pour le calculer, nous avons utilisé la méthode rapportée dans Andanson *et al.* (2019). Il correspond à l'incertitude élargie de l'IM de la valeur du changement de concentration. Cette incertitude élargie est notée $U(C_Y)$ pour un changement noté C_Y entre une valeur initiale d'un biomarqueur Y_{init} et sa valeur finale Y_{fin} après application du traitement expérimental. La valeur de ce changement est :

$$C_Y = Y_{fin} - Y_{init} \ (2)$$

Le SD de la méthode est obtenu avec un facteur d'élargissement de l'incertitude type du changement notée $u(C_Y)$ égal à 2 pour obtenir une probabilité de couverture de 95 % :

$$SD = 2 \times \ u(C_Y) = U(C_Y) \ (3)$$

La méthode détectera un changement de concentration entre Y_{init} et Y_{fin} lorsque :

$$SD < 2 \times \ u(C_Y) \ (4)$$

La valeur de $u(C_Y)$ dans la formule (3) est obtenue à partir de l'incertitude type $u(Y)$, de chacune des valeurs à comparer :

$$u(C_Y) = \sqrt{\left[u^2(Y_{fin}) + u^2(Y_{init})\right]} \quad (5)$$

Les valeurs de ces incertitudes type sont obtenues à partir des feuilles de calcul de l'outil Excel du profil d'exactitude à l'onglet bilan. Il est calculé pour une valeur donnée son incertitude élargie relative $U\%(Y)$ ainsi que les bornes inférieure et supérieure de son intervalle de couverture qui garantissent dans cette zone la présence de la valeur mesurée à 95 %. Les valeurs de ces bornes sont obtenues en retranchant ou en ajoutant à la valeur mesurée *(Y)* la valeur de l'incertitude élargie $U(Y)$, qui correspond au double de l'incertitude type $u(Y)$. Il est donc possible par le calcul de déduire de la valeur de ces bornes les incertitudes types $u(Y)$ des deux valeurs à comparer.

Dans le cadre de l'étude où le schéma expérimental consiste à comparer des changements moyens observés entre deux lots expérimentaux, le calcul du SD ne représente pas un critère définitif de sélection de la méthode, mais une étape nécessaire dont le résultat est utilisé pour définir la taille minimale de l'effectif (n) à utiliser.

Taille minimale du lot expérimental

Que l'on souhaite mesurer un changement de la teneur en N de la farine issue de deux variétés de blé ou d'une même variété de blé soumise à deux traitements, nous comparons dans les deux cas les moyennes d'échantillons statistiques. Elles sont obtenues à partir de répétitions biologiques, le nombre de répétitions biologiques correspondant au nombre de parcelles sur le terrain d'où proviendront les échantillons de grains à analyser individuellement. L'IM se manifeste sous la forme d'une dispersion des résultats de mesure qui peut masquer la différence à observer entre les échantillons biologiques. Cet effet négatif peut être compensé par une augmentation du nombre de répétitions biologiques. Il est proposé dans Andanson *et al.* (2019) une formule de calcul qui permet d'évaluer la taille minimale du lot expérimental pour pallier ce défaut. Elle est basée sur le changement potentiel à observer *a priori* C_Y, puis sur le SD. Ce critère est obtenu à partir de l'IM qui est entre autres fonction du nombre de RT. Puisque nous avons réalisé les analyses selon trois conditions de RT, nous obtenons trois valeurs de SD différentes et donc le calcul de la taille minimale du lot expérimental conduit aussi à trois valeurs différentes. Dans le cas du blé, une variété est une entité génétiquement homogène. Nous avons choisi de raisonner dans le cas d'échantillons appariés en utilisant la formule suivante, n'étant le nombre de répétitions biologiques :

$$n = \frac{3.84 \times SD^2}{{C_Y}^2} \quad (6)$$

Le coefficient 3.84 est obtenu à partir des quantiles de la loi normale standardisée, $z_{1-\propto}$ et $z_{1-\beta}$, qui correspondent respectivement au niveau de confiance $1 - \alpha$ et à la puissance $1 - \beta$. Il a été choisi, $1 - \alpha = 1 - \beta = 95\%$, alors $z_{1-\propto} = z_{1-\beta} = 1{,}96$. Le détail de ce calcul est donné dans Andanson *et al.* (2019).

Dans la situation d'échantillons non appariés, c'est-à-dire de comparaison de moyennes issues d'échantillons indépendants, le nombre de répétitions biologiques (n dans la formule précédente) doit être multiplié par un

coefficient qui varie de 2 lorsque les lots ont un effectif équilibré à plus de 6, lorsque l'effectif des lots est très déséquilibré (Lachin 1981). A titre d'exemples pour illustrer ces situations, nous avons réalisé des calculs complémentaires de taille minimale de lot expérimental pour des valeurs moyennes à comparer provenant de deux variétés de blé et nous avons fixé ce coefficient à 4.

Résultats

Profils d'exactitude en fonction du nombre de répétitions des mesures ou répétitions techniques

Dans le cadre du premier niveau d'action de notre démarche, nous pouvons conclure que la méthode d'analyse est validée en regard des conditions d'acceptabilité fixées à ± 30 % pour l'erreur de mesure. Pour la méthode étudiée d'après les trois conditions de RT, le profil d'exactitude (Fig. 2) montre que le taux de recouvrement décroit en fonction du pourcentage d'N contenu dans les échantillons et se stabilise autour de 100 % à partir de 1,4 % d'N. Un léger biais de justesse positif (les mesures obtenues sont en moyenne surestimées) est observé en dessous de 2 % d'N. Son influence est limitée, il ne décale pas les valeurs obtenues hors des limites d'acceptabilité et n'est donc pas à corriger. Pour chaque échantillon de validation, un intervalle de tolérance, qui permet d'obtenir un intervalle de couverture à 80 % contenant 80 % des futures valeurs observées est calculé pour chaque condition de RT. Quelles que soient ces conditions, la largeur de cet intervalle ,qui représente l'IM exprimée sous sa forme relative, diminue quand la teneur en N augmente ce qui permet d'obtenir des résultats de mesure dans des intervalles de couverture exprimés en valeur relative, plus étendus pour les mesures d'échantillons à faibles concentrations en N. Le nombre de RT diminue la largeur de l'intervalle de tolérance car l'IM suit la même évolution ce qui démontre qu'augmenter le nombre de RT améliore la fiabilité de la méthode.

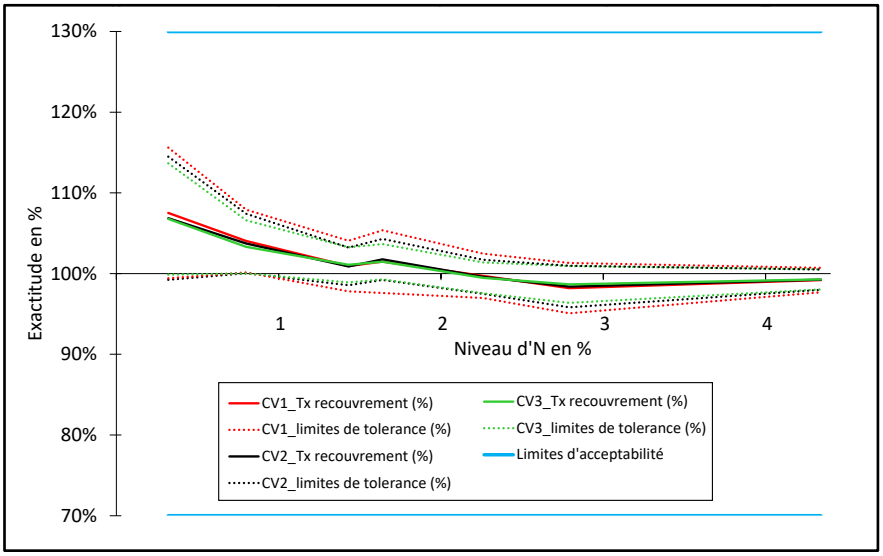


Figure 2. Profil d'exactitude de la méthode Dumas pour le dosage d'N exprimé en % de la matière sèche, avec une probabilité de tolérance de 80 % et une limite d'acceptabilité de 30 %. Les limites d'acceptabilités sont tracées en bleu. En rouge, condition avec une RT (CV1), en noir condition avec deux RT (moyenne de RT1 et RT2, CV2) et en vert condition avec trois RT (moyenne de RT1, RT2 et RT3, CV3). Les traits pleins correspondent au taux de recouvrement, les lignes discontinues aux limites de tolérance basse et haute.

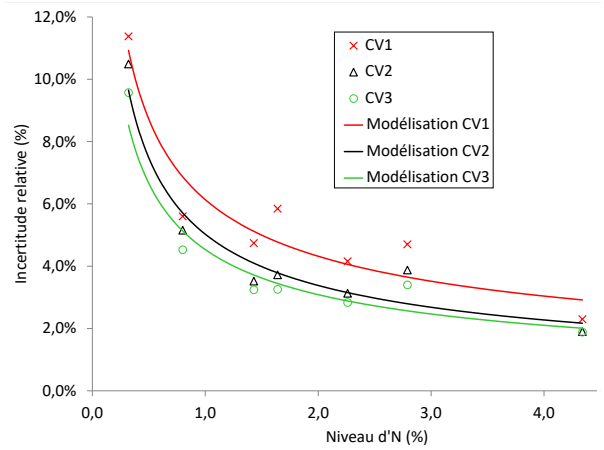
Fonction d'incertitude

La fonction d'incertitude proposée par le programme de réalisation d'un profil d'exactitude[5] développé par Max Feinberg (Feinberg 2009, 2010) est obtenue à partir de la valeur de l'incertitude élargie relative de chaque échantillon de validation. Nous obtenons une courbe par condition de RT (Fig. 3), ce sont des hyperboles modélisées d'après des fonctions puissances inverses. Le terme multiplicatif et l'exposant pour la courbe avec une seule RT sont de 0,0614 et de -0,506, respectivement. L'interprétation de l'évolution de l'IM exprimée sous cette forme relative permet de dire qu'elle augmente dans les trois conditions de RT lorsqu'on tend vers les faibles teneurs en N. Il est également observé que pour une RT, elle varie de 12 % de la valeur de la mesure pour les teneurs en N les plus faibles à un peu plus de 3 % pour les teneurs les plus élevées alors que les mesures observées sont de 8 % et 2 % environ pour les mêmes teneurs respectivement pour trois RT. L'étude de la fonction d'incertitude élargie relative confirme donc que l'augmentation du nombre de RT conduit à une diminution de l'incertitude élargie relative confirmant que la précision de la méthode peut être ainsi améliorée.

Il est important de rappeler que l'IM est couramment exprimée sous une forme relative et qu'il est nécessaire pour bien appréhender la fiabilité d'une méthode d'analyse de se représenter l'IM également sous sa forme absolue. A l'inverse de l'IM relative, l'IM sous sa forme absolue augmente en fonction de la concentration. A titre d'exemple,

[5] Téléchargeable sur https://intranet.inrae.fr/qualite/Outils/Validation-de-methodes

prenons la condition avec une RT et des concentrations de 0.5 % N et 3 % N. Les incertitudes élargies relatives sont respectivement de 8.7 % et 3.5 %, donc plus élevée pour la concentration la plus basse. Exprimées en valeurs absolues, les incertitudes élargies correspondantes sont respectivement de 0.044 et 0.105 %, donc plus faible pour la concentration la plus basse.



Les équations des courbes sont :
CV1 : $y = 0{,}0614x^{-0{,}506}$
CV2 : $y = 0{,}0503x^{-0{,}572}$
CV3 : $y = 0{,}0453x^{-0{,}554}$

Figure 3. Incertitude élargie relative en fonction de la concentration en N de la farine de blé pour trois conditions de validation basées sur une, deux ou trois RT. En rouge, noir et vert, la méthode appliquée à une RT (CV1), à la moyenne de deux RT (CV2) et à la moyenne de 3 RT (CV3), respectivement. Les différents symboles représentent les valeurs de l'incertitude relative élargie calculée selon les conditions de validation (croix, triangle, cercle pour CV1, CV2 et CV3, respectivement). Les courbes correspondent aux modélisations obtenues selon une fonction puissance dont les équations sont indiquées à droite.

Applications aux calculs du seuil de discrimination et de la taille minimale du lot expérimental

Les répétitions techniques augmentent le pouvoir discriminant

L'IM augmente en fonction du pourcentage d'N de l'échantillon et, à niveau équivalent de teneur en N, elle est moins élevée quand le nombre de RT augmente. Par conséquent, le pouvoir de discrimination de la méthode sera plus important pour des teneurs en N plus basses et/ou avec une augmentation du nombre de RT.

Deux mesures sont discriminées si leur différence est supérieure au SD qui leur correspond (équation 4).

Objectif 1 : discriminer les farines de blé de 2 échantillons respectivement à 1.8 % N et 2.0 % N
Regardons si on peut discriminer une farine de blé à 1.8 % d'N d'une seconde à 2.0 % d'N soit un écart de 0.2 %. Avec une seule RT, les incertitudes types sont 0.0410 pour 1.8 % d'N et 0.0432 pour 2 % d'N. Le SD d'après les formules (3) et (5) est donc de : $2 * \sqrt{(0.0410)^2 + (0.0432)^2}$ soit 0.1191 % d'N, inférieur à l'écart entre nos deux concentrations (0.2 %). Nos deux valeurs sont donc discriminées. Une seule RT suffit pour atteindre l'objectif.

Objectif 2 : discriminer les farines de blé de 2 échantillons respectivement à 1.9 %N et 2.0 %N

Regardons si on peut discriminer une farine de blé à 1.9 % d'N d'une seconde à 2.0 % d'N soit un écart de 0.1. Avec une seule RT, les incertitudes types valent 0.0420 pour 1.9 % d'N et 0.0432 pour 2 % d'N. Le SD d'après les formules (3) et (5) est donc de : $2 * \sqrt{(0.0420)^2 + (0.0432)^2}$ soit 0.1206 % d'N, supérieur à l'écart entre nos deux concentrations (0.1 %). Nos deux valeurs ne peuvent donc pas être discriminées. Avec deux RT, les incertitudes types pour les teneurs en N de 1.9 et 2 % d'N sont, respectivement, de 0.033 et 0.034 conduisant à un SD d'après les formules (3) et (5) est donc de : $2 * \sqrt{(0.033)^2 + (0.034)^2}$ soit 0.0948 % d'N, inférieur à 0.1 %. Les deux valeurs peuvent donc être déclarées différentes. La méthode avec deux RT sera nécessaire pour atteindre l'objectif.

Les répétitions techniques diminuent la taille minimale du lot expérimental

Dans le cas de comparaison de deux valeurs moyennes obtenues avec plusieurs échantillons, le calcul de l'effectif minimal (nombre de répétitions biologiques) est nécessaire pour prévoir l'expérimentation. Il faut l'évaluer aussi en fonction des conditions de RT. Ce calcul va permettre de pallier à l'IM de notre méthode et d'être sûr que la dispersion ne nuise pas à la mise en évidence d'une différence souhaitée (par exemple une différence de 0.1 % d'N pour une variété de blé cultivée dans deux conditions de nutrition azotée différentes). Les échantillons de cette première comparaison (comparer une même variété de blé cultivée dans deux conditions) proviennent de plantes génétiquement identiques, on peut donc les considérer comme appariées. En prenant comme exemple deux concentrations moyennes C1=1.9% et C2=2.0%, (celles de la variété de blé cultivées dans deux conditions de fertilisation), l'effectif minimal calculé à partir de la formule (6) serait de six (5.6) répétitions biologiques pour une RT, et de trois (2.85) pour trois RT. Dans le premier cas, on procède à six analyses contre neuf dans le second cas.

Pour des teneurs de 1.9 et 2.0 % d'N, l'utilisation de la formule pour des échantillons non appariés (comparaisons de farines provenant de deux variétés de blé différentes) conduit à un effectif de 23 (22.4) en utilisant le coefficient multiplicateur de 4 dans le cas d'un schéma expérimental déséquilibré et avec une RT, contre 12 (11.4) avec trois RT. Ce qui se traduit en termes d'analyse à 23 analyses au total en condition de 1 RT contre 36 en condition de 3 RT. Le nombre de répétitions biologiques est dans les deux cas réduit de moitié grâce aux RT, mais l'augmentation du nombre de RT conduit à effectuer plus d'analyses.

Discussion - Conclusion

Cette démarche de validation et de détermination des conditions d'utilisation de notre méthode d'analyse de l'N de la farine de blé pour détecter des changements de teneurs de ce composé sous l'influence de traitements expérimentaux, nous permet de répondre positivement au premier niveau d'action en proposant dans les conditions environnementales de notre laboratoire, une méthode d'analyse valide en regard des performances requises par la FDA pour des méthodes bio-analytiques. Les résultats que nous avons obtenus le démontrent, ces performances

reportées dans les trois profils d'exactitude sont bien supérieures à ces exigences (tracées sous forme de limites d'acceptabilité à 30 % dans les profils d'exactitude). Elle est en ce sens validée, cela correspond à une forme de conformité en regard de ce qui est exigé pour les méthodes bio-analytiques. Le second niveau d'action a consisté à évaluer *a priori*, son adéquation au besoin scientifique de détection de changements de teneurs en N de la farine du blé entre les moyennes de deux échantillons biologiques. Dans l'exemple que nous proposons, la différence à observer de 0.1 % d'N bien que très faible par rapport à ce qui a été observé dans le cadre d'autres études scientifiques, est détectable par notre méthode d'analyse dans les conditions analytiques de deux RT.

La modélisation de l'IM dans trois conditions de RT associée à la disponibilité des formules du calcul des SD et des tailles minimales des lots expérimentaux correspondants nous permet désormais dans le cas de demandes scientifiques d'analyses de répondre à leur faisabilité et aussi de définir les conditions minimales de RT ou de taille des lots expérimentaux à respecter pour palier à l'IM de la méthode en fonction d'un changement moyen d'N à détecter. L'ensemble de cette démarche est de la responsabilité de l'analyste et il revient au responsable de l'étude scientifique de proposer une valeur de changement potentiel à détecter, puis de définir *a priori* la variabilité biologique du phénomène étudié. Dans notre cas, cela lui permettra dans chacune des trois conditions de RT de calculer l'effectif définitif de ces lots expérimentaux pour significativement observer l'effet de son traitement expérimental. Pour certains sujets d'étude, la valeur de la différence à observer n'est pas toujours évidente à définir *a priori*, et la disponibilité d'une bibliographie très fournie sur certains sujets d'étude permet d'obtenir un modèle de prédiction de la valeur de ce changement en fonction des traitements appliqués comme réalisé dans Andanson *et al*. (2018, 2019). Dans cette étude, le calcul de l'IM dans trois conditions de RT apporte bien sûr une possibilité supplémentaire de sélectionner la méthode d'analyse, sachant que l'augmentation du nombre de RT diminue l'IM, accroissant donc la capacité à discriminer de la méthode. Moduler le nombre de RT offre également au responsable d'une étude scientifique, un élément supplémentaire d'ajustement des schémas expérimentaux. En effet, la définition de la taille définitive des lots expérimentaux d'une étude scientifique doit être réalisée en tenant compte de l'IM de la méthode et de la variabilité biologique tout cela en fonction d'un changement potentiel à observer, mais il faut y intégrer également les IM des autres méthodes analytiques utilisées pour quantifier d'autres indicateurs. La connaissance de l'IM dans trois conditions de RT apporte lors de la définition de conditions expérimentales d'une étude scientifique une forme de souplesse car il s'agit d'une possibilité d'action supplémentaire, sans avoir à agir strictement sur la taille du lot expérimental pour atteindre l'objectif. L'influence des conditions de RT est très importante sur la taille du lot expérimental, le réduisant de 50 % lorsque l'on passe de 1 à 3 RT.

Dans ce travail, nous avons appliqué la validation de méthode au dosage de l'N par analyseur élémentaire. Nous avons montré que l'IM peut être réduite par l'augmentation des RT. Réduire cette incertitude réduit aussi le SD, ce qui rend donc la méthode plus performante. La conséquence directe de ce travail est de permettre de faire un choix avisé quant au nombre de répétitions techniques ou biologiques en fonction du niveau de discrimination souhaité,

des possibilités logistiques et des coûts d'analyse. Réaliser des RT revient à doser un certain nombre de fois un même échantillon. La répétition biologique revient à produire plusieurs échantillons de chaque variété étudiée ce qui doit être prévu dès la mise en place de l'expérimentation sur le terrain. Nos résultats montrent qu'augmenter le nombre de RT augmente le pouvoir discriminant de la méthode et offre donc une possibilité de diminuer le nombre de répétitions biologiques. C'est donc une façon de réduire le coût de l'étude si la réalisation de répétitions biologiques est plus onéreuse que la réalisation de RT, ce qui est souvent le cas. Le dosage de l'N par analyseur élémentaire peut être mis en œuvre pour d'autres matrices (feuilles et des tiges de blé, pain, lentilles, sol) dont la teneur en N peut sortir de la gamme étudiée. Ainsi, pour anticiper d'éventuelles demandes, nous avons utilisé un échantillon de validation supplémentaire, le BBOT du commerce certifié à 6.51 % N avec une prise d'essai classique (données non montrées). L'ajout de cet échantillon confirme la tendance mise en évidence (diminution de l'incertitude relative de mesure quand la teneur en N augmente), cette incertitude variant de 2.5 à 1.5 % de la mesure en passant d'un réplica technique à trois.

L'utilisation de témoins de validation de différente nature peut constituer une éventuelle faiblesse du travail réalisé. En effet, le dosage de trois réplicas techniques des farines de blé montre une plus grande dispersion des mesures réalisées que pour ceux de BBOT. Ces différences de variabilité peuvent s'expliquer par une certaine hétérogénéité des farines probablement liée au broyage. Une étude complémentaire devra être réalisée afin de vérifier cette hypothèse.

Pour conclure, la validation de méthode est un outil qui permet à la fois de mieux connaitre nos méthodes et de mieux les utiliser, et qui peut aussi permettre de mettre à jour certains défauts (Fig. 4). C'est un outil qui permet le réglage de la méthode en permettant d'estimer l'IM. Mais connaitre cette erreur de fiabilité ne doit pas faire oublier l'erreur liée aux variations du phénomène biologique étudié qui peut conduire à une augmentation du nombre de répétitions biologiques. Avoir suffisamment de puissance lors de comparaisons statistiques pour être capable de distinguer des différences nécessite de bien intégrer toutes les sources de variations (Lachin *et al.* 1981).

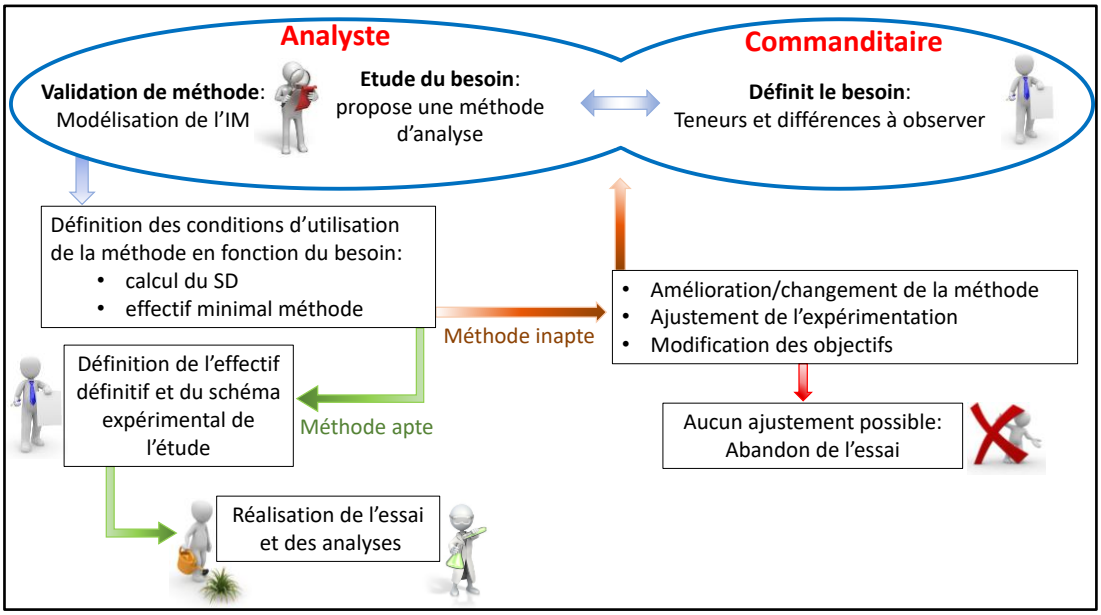


Figure 4. Démarche de définition des conditions d'utilisation d'une méthode d'analyse d'après son incertitude de mesure et son seuil de discrimination en fonction du besoin analytique d'une étude scientifique.

Pour terminer, si des travaux précédents ont clairement établi que la méthode Dumas est une méthode rapide tout à fait satisfaisante et stable dans le temps pour doser l'N dans des céréales (Beljkaš *et al.* 2010), il nous fallait établir ses performances au niveau de notre laboratoire. C'est ce que nous avons voulu faire dans cette étude en cherchant à régler au mieux le dosage de l'N, que nous effectuons fréquemment, pour doser les protéines de farines de blé, l'N étant un élément constitutif important des protéines. Un facteur de conversion appelé facteur de Jones (1941) égal à 5.7 pour l'albumen du blé (le tissu du grain qui, après mouture, donne la farine) est utilisé pour passer de la quantité d'N aux protéines. Ce facteur est utilisé de façon usuelle bien que des publications plus récentes aient montré qu'il pouvait varier de 5.43 (Sarwar *et al.* 1983) à 5.59 (Tkachuk 1969) pour la farine de blé. La teneur en protéines du blé est un élément primordial de qualité. En effet, une large partie de ces protéines déterminent la qualité technologique de la pâte (Shewry *et al.* 2002). De plus, sachant que les produits issus du blé sont à la base de l'alimentation humaine (le blé couvrant environ 20 % de nos besoins en énergie et en protéines), elles sont aussi liées à la qualité nutritionnelle (Shewry and Hey 2015). Dans le contexte actuel d'une alimentation durable, l'importance des protéines végétales devrait croitre d'où l'importance de bien régler les méthodes qui contribuent à leur dosage.

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).

Remerciements

Les auteurs remercient le Pôle d'Aide au Pilotage par le Management Qualité (APMQ) d'INRAE et le groupe formation VDM centre ARA.

Bibliographie

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. Analytica Chimica Acta 1020: 9-16.

Andanson S, Delahaye Q, Ravel C, Feinberg M (2019) 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. Cahier des Techniques de l'INRA, 96 : 1-19..

Beljkaš B, Matić J, Milovanović I, Jovanov, P, Misan A, Saric L (2010) Rapid method for determination of protein content in cereals and oilseeds: validation, measurement uncertainty and comparison with the Kjeldahl method. Accreditation Quality Assurance 15: 555–561. https://doi.org/10.1007/s00769-010-0677-6.

Dumas J (1831) Procédés de l'analyse organique. Annales de Chimie et Physique 2 : 198-213.

Feinberg M (2010) Principes et vocabulaire pour la validation des méthodes. Cahier des Techniques de l'INRA : numéro spécial 2010 : 13-25

Feinberg M (2009) Labo-Stat. Guide de validation des méthodes analytiques. Edition Lavoisier, Paris.

Feinberg M, Boulanger B, Dewé W, Hubert P (2004) New advances method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. Analytical and Bioanalytical Chemistry 380 : 502-514.

Feinberg M, Rudaz S (2019) De la validation des méthodes à la validation des résultats. Techniques de l'Ingénieur ref : P225 v2.

AFNOR (2016) Norme NF ISO 16634-2, sur la détermination de la teneur en azote total par combustion selon le principe Dumas et calcul de la teneur en protéines brutes - Partie 2 : Céréales, légumineuses et produits céréaliers de mouture.

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. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 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 (2007) Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedure : A SFSTP proposal – Part II. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 45 : 70-81.

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 (2007) Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedure A SFSTP proposal – Part III. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 45 : 82-96.

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

Jones, D. B. Eds. (1941) Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of protein., US Department of Agriculture - circ.83.

Plessis A, Ravel C, Bordes J, Balfourier F, Martre P (2013) Association study of wheat grain protein composition reveals that gliadin and glutenin composition are trans-regulated by different chromosome regions. Journal of Experimental Botany 64 : 3627-3644.

Revue VIM (2012) Bureau International des poids et mesures, Vocabulaire International de Métrologie. JCGM 200 :2012, §4.16, seuil de discrimination.

Sarwar G, Christensen DA, Finlayson AJ, Friedman M, Hackler LR, Mackenzie SL, Pellett PL, Tkachuk R (1983) Inter and intra laboratory variation in amino acid analysis of food proteins. Journal of Food Science 48, pp. 526-31.

Shewry PR, Halford NG, Belton PS, Tatham AS (2002) The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. Philosophical Transaction The Royal Society London B Biol Sci 357: 133-42.

Shewry PR, Hey SJ (2015) The contribution of wheat to human diet and health. Food Energy Security 4: 178–202.

Tkachuk R (1969) Nitrogen-to-Protein conversion factors for cereals and oilseed meals. Cereal Chemistry 46 : 419-23.