

**Does sex matter ?**

**Or: Should we use both males and females  
in an experiment – and how ?**

Frédéric Schütz, 2025

Frederic.Schutz@sib.swiss

**An environmental factor  
that is linked to sex...**

# Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents

Robert E Sorge<sup>1,2,8</sup>, Loren J Martin<sup>1,8</sup>, Kelsey A Isbester<sup>1</sup>, Susana G Sotocinal<sup>1</sup>, Sarah Rosen<sup>1</sup>, Alexander H Tuttle<sup>1</sup>, Jeffrey S Wieskopf<sup>1</sup>, Erinn L Acland<sup>1</sup>, Anastassia Dokova<sup>1</sup>, Basil Kadoura<sup>1</sup>, Philip Leger<sup>1</sup>, Josiane C S Mapplebeck<sup>1</sup>, Martina McPhail<sup>3</sup>, Ada Delaney<sup>4</sup>, Gustaf Wigerblad<sup>4</sup>, Alan P Schumann<sup>2</sup>, Tammie Quinn<sup>2</sup>, Johannes Frasnelli<sup>5,6</sup>, Camilla I Svensson<sup>4</sup>, Wendy F Sternberg<sup>3</sup> & Jeffrey S Mogil<sup>1,7</sup>

**We found that exposure of mice and rats to male but not female experimenters produces pain inhibition.**

# L'odeur du chercheur, biais expérimental

> **Laboratoire** Rats et souris sont inquiets lorsqu'ils sont manipulés par des chercheurs de sexe masculin

> Cela pourrait influencer les résultats des expériences



Un chercheur tenant une souris de laboratoire. Les rongeurs réagissent aux hormones masculines par une diminution de leurs sensations douloureuses et une élévation de leur température corporelle. ARCHIVES

**Viviane Thivent**

«Cette publication me fait penser à un canular écrit par une bande de copains.» Marianne Amalric, du laboratoire de neurosciences cognitives de l'Université Aix-Marseille n'en croit pas ses yeux. «Pourtant, explique Sophie Pezet de l'ESPCI Paris Tech, il s'agit d'un travail tout à fait solide», de surcroît publié dans un journal très sérieux, *Nature Methods*. Mais qui, c'est vrai, jette un froid.

Car après des siècles de recherches effectuées avec des rongeurs, l'équipe de Jeffrey Mogil de l'Université McGill, à Montréal, montre que le sexe des expérimentateurs influence le résultat des expériences menées sur les rats ou les souris: par leur seule présence, les hommes stressent autant les rongeurs que trois minutes de nage forcée ou quinze passées enfermés dans un tube. Les femmes, quant à elles, ne perturbent en rien la quiétude des animaux de laboratoire.

Spécialiste de la douleur et du pavé dans la mare, Jeffrey Mogil est connu pour appuyer là où ça fait mal, continue Sophie Pezet. Ces dernières années, il n'a eu de cesse de questionner la représen-

tativité des modèles physiologiques utilisés dans les laboratoires. Il est ainsi à l'origine de nouveaux tests comportementaux comme celui, très discuté, dit de la grimace qui met en lien l'expression faciale des rongeurs et l'intensité de la douleur ressentie. «Or, pour réaliser ces tests, nous avons besoin de filmer les souris, raconte Jeffrey Mogil. Et à plusieurs reprises, des étudiants m'ont rapporté que le comportement des animaux changeait en leur présence.»

En décidant de quantifier le phénomène, le chercheur s'attendait donc à trouver un effet lié à

l'expérimentateur... «mais pas au genre de l'expérimentateur! poursuit-il. A chaque fois que des hommes s'approchaient des souris, ces dernières se mettaient à stresser. Elles se figeaient et grimaçaient moins.»

Idem en présence de mâles de cobayes, de chats, de chiens non castrés... ou d'un t-shirt porté la nuit précédente par les expérimentateurs. Une question d'odeurs. Les souris réagissent en fait aux hormones – les androgènes – sécrétées par tous les mâles de mammifères, y compris par l'homme.

Ce curieux rappel de notre con-

dition animale a-t-il pour autant des conséquences sur les si objectives mesures expérimentales? Oui. Car en poussant plus avant les tests, les chercheurs ont montré que la présence d'un expérimentateur masculin se traduisait par une hausse des hormones du stress, une diminution de la sensation de douleur et une élévation de la température interne. Autant de paramètres couramment mesurés.

Est-ce à dire que toutes les études passées sont à jeter à la poubelle? «L'ampleur du problème est difficile à évaluer, confie Jeffrey Mogil. Mais ce qui est sûr, c'est que ce genre de biais pourrait expli-

quer les difficultés qu'éprouvent les physiologistes à répliquer les résultats d'autres équipes.» «Les animaux de laboratoire sont très sensibles à leur environnement, confirme Sophie Pezet, qui n'est pas surprise par le résultat canadien. Leurs constantes physiologiques varient en fonction du moment de la journée mais aussi de la quantité de caresses qu'ils reçoivent avant l'expérience.»

Ou encore de l'intensité lumineuse de la pièce. De façon plus anecdotique, «l'odeur de certains aliments, comme les clémentines ou les oranges, peut aussi être aversive pour les rongeurs», précise la chercheuse.

Par leur seule présence, les hommes stressent autant les rongeurs que trois minutes de nage forcée

C'est pourquoi chaque équipe de recherche possède sa propre routine, transmise en interne de chercheurs en étudiants... mais pas d'un laboratoire à l'autre. Ce qui pose le problème de la reproductibilité des mesures. A ce jour, il n'existe aucun protocole standardisé pour minimiser ces biais, «même si une prise de conscience commence à émerger», insiste Sophie Pezet.

Ainsi en 2008, dans la revue *Pain*, consacrée aux recherches menées sur la douleur, Andrew Rice de l'Imperial College de Londres et des collaborateurs – dont Jeffrey Mogil – ont-ils proposé un formulaire contenant plus de 40 champs de façon à préciser les conditions expérimentales.

En attendant que ce dernier soit enfin utilisé, faut-il bouter hors des laboratoires de physiologie tous les expérimentateurs mâles? «C'est une solution, s'amuse Jeffrey. Mais on peut aussi attendre que le stress de l'animal retombe avant de procéder aux mesures [soit une demi-heure par mesure] ou, de façon plus pragmatique, noter le genre de l'expérimentateur afin de prendre en considération ce biais.» Ce qui, en la matière, semble être un minimum. **Le Monde**

## Questions sur les modèles animaux

La découverte fortuite de l'influence des odeurs sur le comportement des rongeurs a eu lieu lors de recherches sur la douleur. Ces dernières ont un point commun avec celles menées sur la dépression: le faible nombre de molécules thérapeutiques découvertes ces dernières décennies. La faute à pas de chance? Pas sûr. Un nombre croissant de chercheurs

pointe la faiblesse des modèles animaux et des tests comportementaux utilisés. «Il existe très peu de tests pour mesurer la douleur spontanée chez l'animal, celle qui est ressentie sans stimulation extérieure», explique Sophie Pezet de l'ESPCI Paris Tech. En outre, les douleurs verbalisées par les patients (migraine, douleurs dentaires ou autres) sont

bien plus variées et complexes que celles observables chez les rongeurs. Tous ces constats amènent les chercheurs à réfléchir à de nouveaux tests comme celui de la grimace. Ou celui de la préférence de place dans lequel le rongeur est «libre» de ses mouvements et doit se rendre à un endroit précis de sa cage pour voir sa douleur soulagée. **V.T.**



## Sex matters in experiments on party drug — in mice

Ketamine lifts rodents' mood only if administered by male researchers.

**Sara Reardon**

17 November 2017

Form-A

No. ....

(to be completed by the authorities)

# Application for licence to perform animal experiments

Article 18 Animal Welfare Act (TSchG),  
article 141 Animal Welfare Ordinance (TSchV),  
article 30 Animal Experimentation Ordinance (TVV)

§ 29: Experimental set-up and study design

§ 30: Rationale for the numbers of animals

*We will use only **male** animals, as **females** often show more phenotypical variability; using both males and females would double the number of animals used, which would go against the 3R (Replacement, Reduction, Refinement).*

*If the results are significant, we will plan a second experiment on **females**.*

– Adapted from one random application, a few years ago

§ 29: Experimental set-up and study design

§ 30: Rationale for the numbers of animals

*We will use only **female** animals, as **males** tend to fight more and require more cages; using both males and females would double the number of animals used, which would go against the 3R (Replacement, Reduction, Refinement).*

*If the results are significant, we will plan a second experiment on **males**.*

– Adapted from one random application, a few years ago



**You are now the  
Animal Experimentation  
(ethics) Committee.**

**What is your take on  
these arguments ?**

**A few points...**

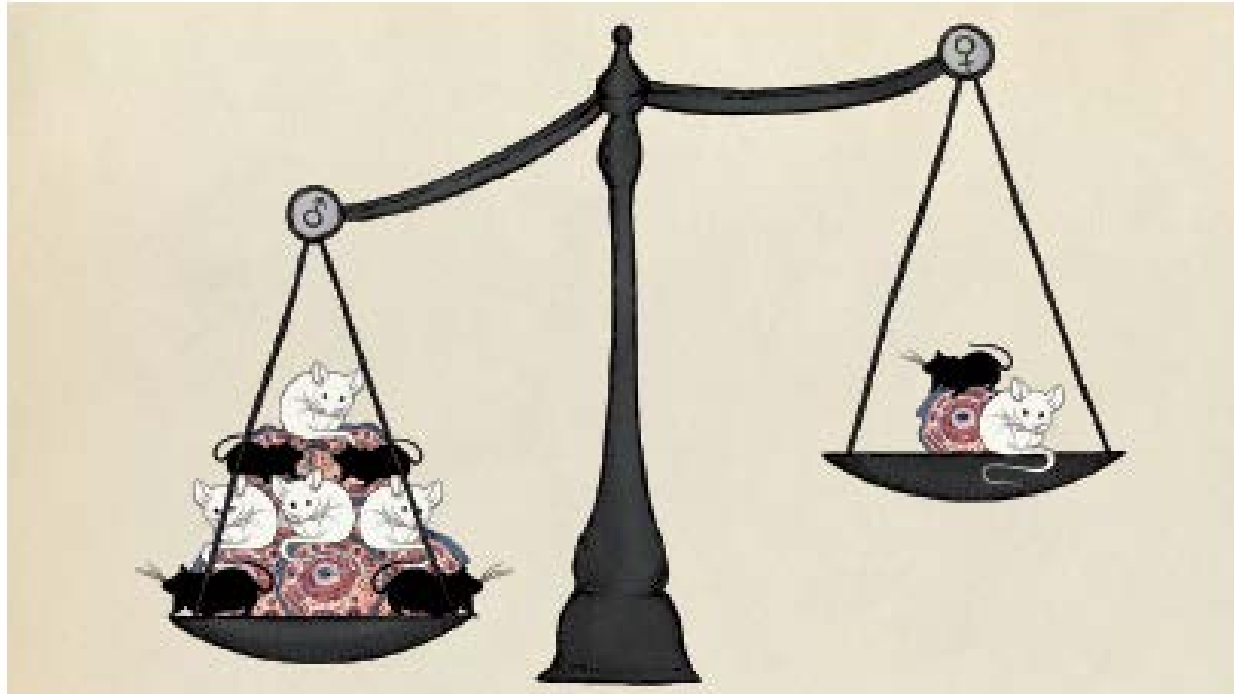


ILLUSTRATION BY ANDREW DODD

# NIH to balance sex in cell and animal studies

Janine A. Clayton and Francis S. Collins unveil policies to ensure that preclinical research funded by the US National Institutes of Health considers females and males.

## *Partial list of rodent sex differences*

anxiety

pain

aggressive behavior

stroke

food intake

depression

learning

memory

locomotor activity

response to many drugs

stress

anesthesia

neurotransmitters

brain structure

plasticity

taste

olfaction

circadian and ultradian rhythms

liver and kidney function

# Are females more variable than males in gene expression? Meta-analysis of microarray datasets

Yuichiro Itoh and Arthur P. Arnold\*

## **Abstract**

**Background:** The majority of preclinical biomedical research involves studies of males rather than females. It is thought that researchers have avoided females based on the idea that female traits are more variable than those of males because of cyclic variation in effects of ovarian hormones.

**Methods:** To test the assumption of inherently greater female variability, we analyzed 293 microarray datasets measuring gene expression in various tissues of mice and humans, comprising analysis of more than 5 million probes.

**Results:** Meta-analysis showed that on average, male gene expression is slightly more variable than that of females although the difference is small. We also tested if the X chromosome of humans shows greater variability in gene expression in males than in females, as might be expected because of hemizygous exposure of polymorphic X alleles but again found little sex difference.

**Conclusion:** Our analysis supports and extends previous studies reporting no overall greater phenotypic variability in females.

**Keywords:** Sexual differentiation, Sex bias, Gene expression

# Les tests de médicaments négligent trop souvent les femmes

**SANTÉ** Les médicaments sont principalement testés sur les hommes, pourtant les deux sexes n'y réagissent pas de la même manière. Des chercheuses lancent un appel à plus d'équité dans les études cliniques

SYLVIE LOGEAN  
@sylvie\_logean

Dès la conception, hommes et femmes sont différents. Ce n'est pas un scoop, certes. Mais il semblerait que cette affirmation ne soit pas une évidence pour tous. À commencer par l'industrie pharmaceutique et certains scientifiques, qui continuent à mener leurs études cliniques principalement sur des participants masculins. Une parfaite hérésie lorsque l'on sait que les deux sexes réagissent pas aux médicaments de la même manière.

Une recherche conduite en Allemagne en 2006 a en effet révélé que, quel que soit le principe actif testé, les femmes présentaient deux fois plus de risques d'effets secondaires que les hommes.

« Il est temps de responsabiliser les scientifiques, pour des raisons non seulement d'équité mais aussi de santé », affirme Cara Tannenbaum, professeure à la Faculté de médecine de l'Université de Montréal. La Canadienne a récemment signé, avec Janine Austin Clayton, directrice du bureau de la recherche sur la santé des femmes à l'Institut national de la santé américain (NIH), une lettre ouverte publiée dans le *Journal of the American Medical Association (JAMA)*, afin d'appeler à davantage de transparence et de sensibiliser les chercheurs à l'importance de prendre en compte le sexe et le genre des participants aux expérimentations.

## Des différences dangereuses

Mettre en exergue ces différences est d'autant plus important qu'elles se révèlent parfois dangereuses. C'est le cas avec le somnifère Zolpidem, plus connu en Suisse sous l'appellation Stilnox. À dose égale, celui-ci agit plus longuement chez la plupart des femmes. « Le matin, la concentration du médicament dans le sang est jusqu'à 40 fois plus



Une recherche conduite en Allemagne en 2006 a révélé que, quel que soit le principe actif testé, les femmes présentaient deux fois plus de risques d'effets secondaires que les hommes. (APIC IMAGES INC.)

élevée que chez les hommes, confirme Cara Tannenbaum. Cela peut affecter l'habilité à conduire, mais aussi à accomplir des tâches demandant de la concentration, de la mémoire et de la coordination. »

Autres exemples : selon une étude publiée en 2013 dans la revue *Archives of Internal Medicine*, les statines, molécules de base des traitements contre le cholestérol, augmentaient de 75% le risque de diabète chez les femmes après la ménopause. L'aspirine serait également nettement moins efficace pour diminuer le risque d'infarctus que pour les hommes, mais préviendrait mieux celui de faire un accident vasculaire cérébral.

« Il existe indéniablement une différence statistique dans la façon dont les hommes et les femmes métabolisent les médicaments, mais elle n'est pas très grande d'un point de vue clinique, tempère Thierry Budin, médecin chef de la division de pharmacologie clinique du CHUV, à Lausanne. Entre deux individus d'un même sexe, la variabilité peut être encore plus importante. On constate ainsi des différences marquées attribuables à des variations de corpulence ou de fonctionnement des organes, à des interactions avec d'autres médicaments ou encore à des traits génétiques. C'est avant tout en fonction

de ces facteurs qu'il faudra adapter la posologie d'un médicament prescrit, ce qui n'est pas toujours fait idéalement. »

## Le genre en question

Plus encore que le sexe biologique, le genre – qui englobe les interactions sociales, comportementales et culturelles, ainsi que les diverses expressions de l'identité d'une personne – représenterait un facteur déterminant dans la prise en charge d'un patient, selon des recherches récentes. Une étude canadienne, publiée début 2016 et menée sur 1000 sujets, suggère ainsi que les individus présentant des traits de personnalité traditionnellement attribués aux femmes auraient un risque accru d'écarter d'infarctus du myocarde dans les douze mois suivant le premier incident, indépendamment de leur sexe.

« On se rend compte aujourd'hui que la distinction entre les sexes n'est pas aussi nette et pertinente que ce que l'on pensait durant des siècles, estime Denis Duboule, professeur au Département de génétique et évolution de l'Université de Genève. C'est pourquoi il serait important d'introduire cette notion de genre dans les cohortes d'études cliniques, tout en faisant extrêmement attention à ne pas induire de discriminations. »

Malgré des avancées, la médecine est encore à la traîne sur la compréhension des différences hommes-femmes et leur impact sur la santé. La recherche continue trop souvent de voir le sexe masculin comme un standard de la physiologie humaine, y compris lorsqu'il s'agit d'expérimenter des traitements s'adressant aux femmes. Addyi, premier médicament mis sur le marché pour lutter contre le manque de désir féminin, a ainsi été testé sur 23 hommes et deux femmes pour déterminer ses effets lorsqu'il était pris avec de l'alcool. L'étude a révélé que la combinaison des deux augmentait l'apparition de vertiges, de battements de cœur, de pression artérielle, voire d'évanouissement. Il est donc probable que le risque soit encore plus grand chez les femmes, plus sensibles à l'alcool. Un comble !

« Il y a encore de fausses croyances sur le fait que les femmes seraient plus compliquées à étudier en raison des variations hormonales dont elles sont l'objet, s'insurge Cara Tannenbaum. Pourtant, de nouvelles publications ont démontré qu'il y avait tout autant de fluctuation de testostérone chez les hommes que d'œstrogène chez les femmes. Il est nécessaire de se mettre à jour et de changer la façon dont on conduit les recherches. »

Drugs are mainly tested on men, yet both sexes do not react to them in the same way.

Regardless of the active ingredient tested, women had twice the risk of side effects than men.

At the same dose, [the sleeping pill Stilnox] acts longer in most women. In the morning, the concentration of the drug in the blood is up to 40 times higher than in men

Statins, basic molecules in treatments against cholesterol, increase the risk of diabetes in women after menopause by 71%.

Aspirin would also be significantly less effective in reducing the risk of heart attack than for men, but would better prevent the risk of having a stroke.



§ 29: Experimental set-up and study design

§ 30: Rationale for the numbers of animals

*We will use only female animals, as males tends to fight more and require more cages; using both males and females would double the number of animals used, which would go against the 3R (Replacement, Reduction, Refinement).*

*If the results are significant, we will plan a second experiment on females.*

– Adapted from one random application, a few years ago

**Is this true ?**

**How can we take into account the  
sex variable into our design ?**

**(Assuming a simple  
F/M sex variable)**

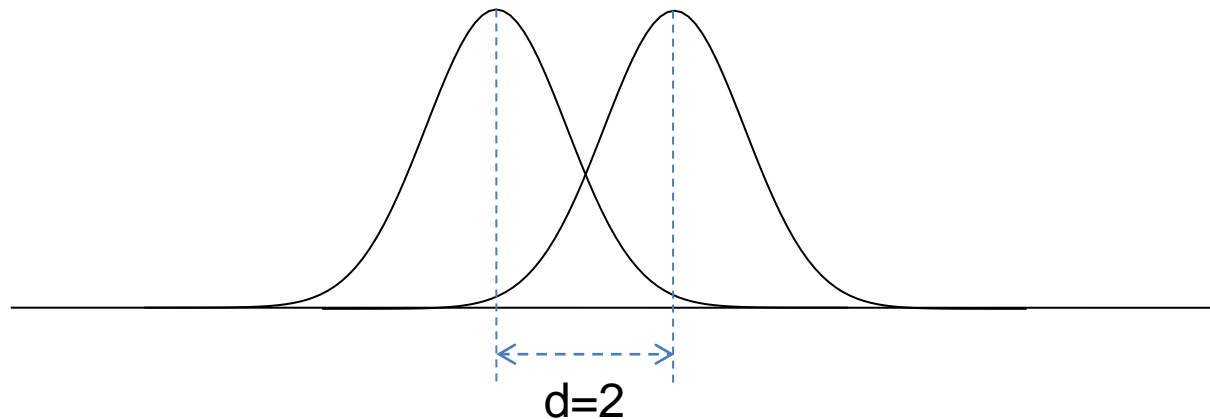
*The most common statistical test used in the life sciences:  
Student's t-test*

$n=8$  (per group), males or females only

$sd=2.45$

mean difference=2

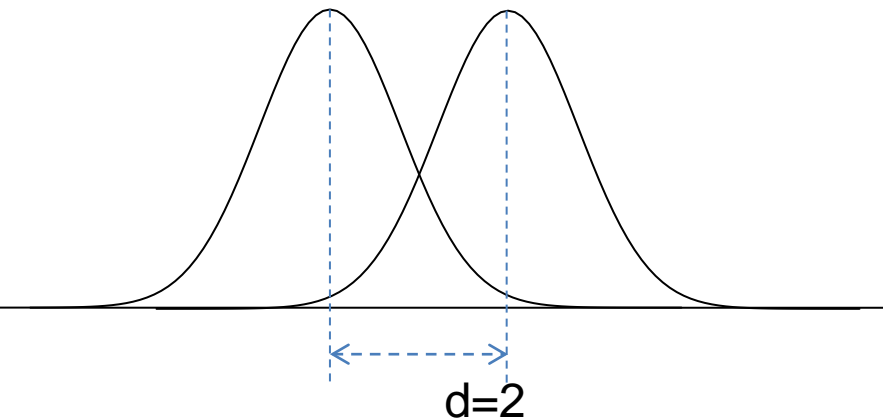
P-value= ....



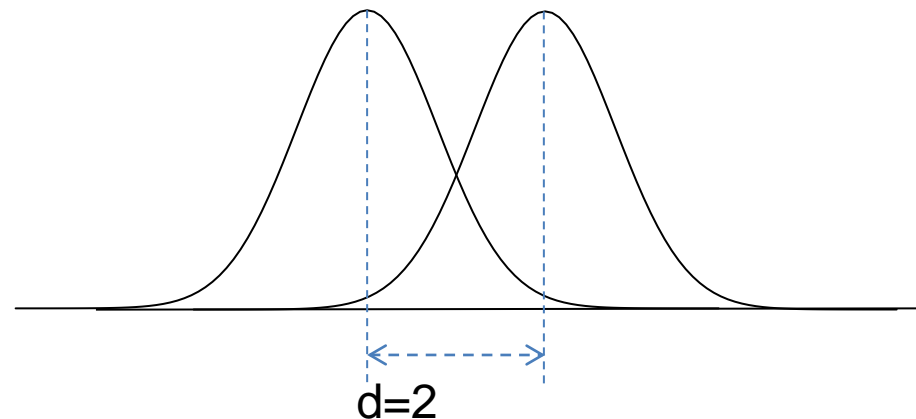
Total number of animals: 16

*The most common statistical test used in the life sciences:  
Student's t-test*

n=8 (per group), **males**  
sd=2.45  
mean difference=2  
P-value= ....



n=8 (per group), **females**  
sd=2.45  
mean difference=2  
P-value= ....

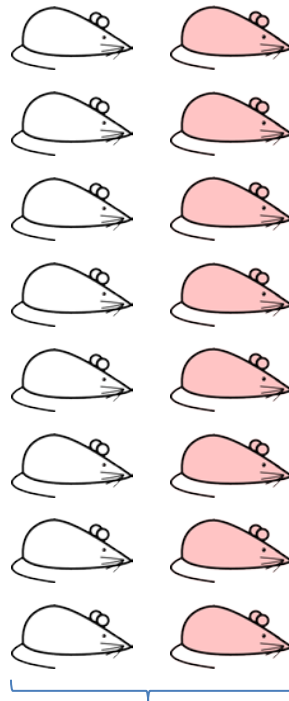


Total number of animals: **32**

*How would you design an experiment including males and females ?*

**Completely  
randomized design  
(one factor)**

Control Treated

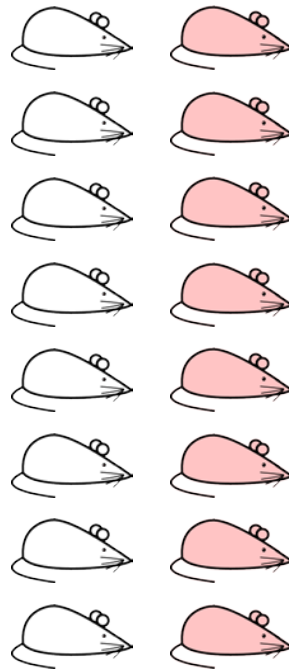


Males

# *Different ways of analyzing Control/Treated with(out) sex*

## **Completely randomized design (one factor)**

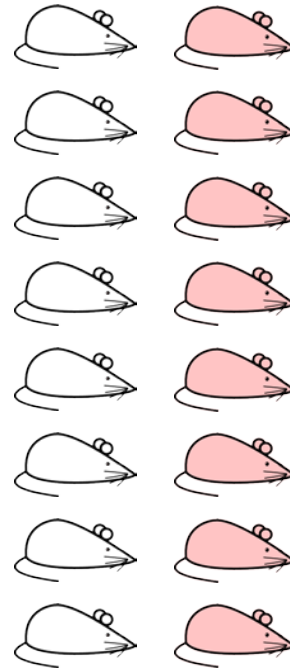
Control Treated



Males

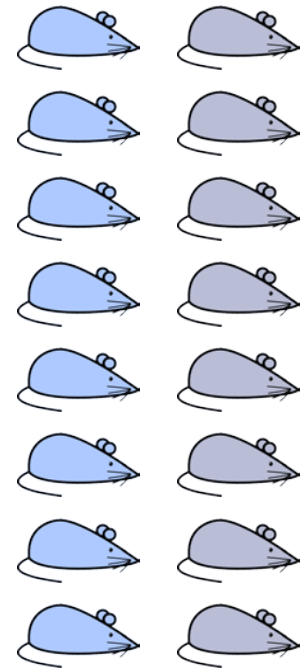
## **Two separate experiments**

Control Treated



Males

Control Treated



Females

**Can we do things  
in another way ?**

**Does sex matter ?**

**Session at the SGV  
(Swiss animal laboratory association)  
2015 meeting**

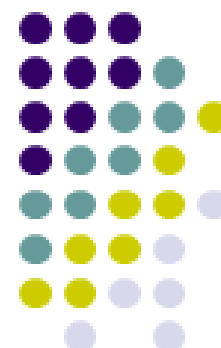


**Will we be able to reduce the  
number of animals used if both  
sexes are used in research  
projects?**

Michael FW Festing, Ph.D.,  
D.Sc., CStat.

[michaelfesting@aol.com](mailto:michaelfesting@aol.com)

[www.3Rs-reduction.co.uk](http://www.3Rs-reduction.co.uk)



## Factorial designs

(By using a factorial design) "... an experimental investigation, at the same time as it is made more comprehensive, may also be made more efficient if by more efficient we mean that more knowledge and a higher degree of precision are obtainable by the same number of observations."

Fuller, 1948

"... we should, in designing the experiment, artificially vary conditions if we can do so without inflating the error."

Cox, 1958



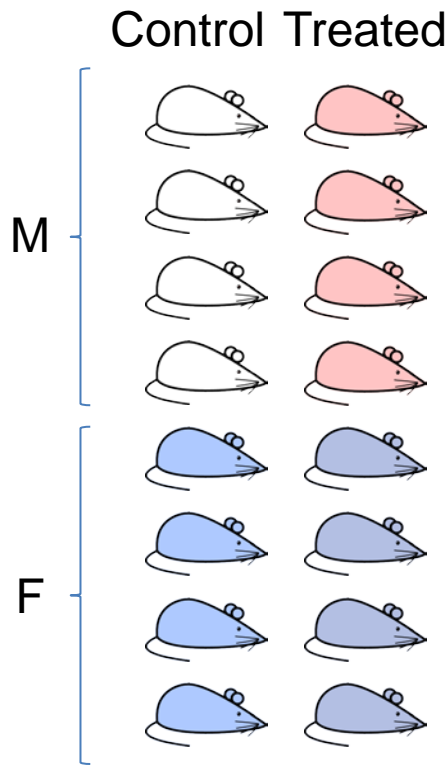
## *Betteridge's law of headlines*

**Betteridge's law of headlines** is an adage that states: "Any headline that ends in a question mark can be answered by the word *no*." It is named after Ian Betteridge, a British technology journalist who wrote about it in 2009, although the principle is much older.

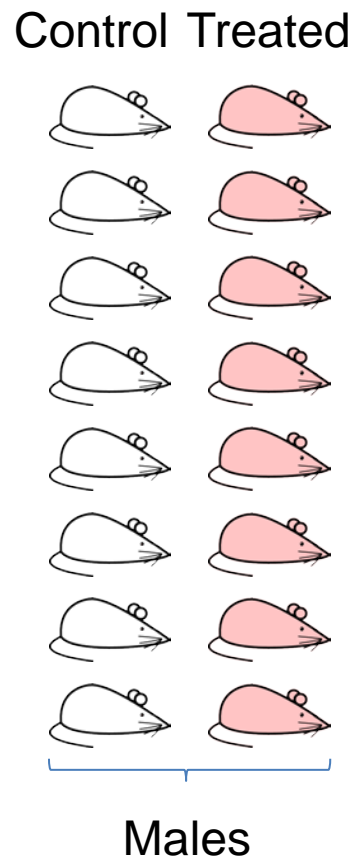
[however, that does not seem to be the case in science, according to some studies]

# *Different ways of analyzing Control/Treated with(out) sex*

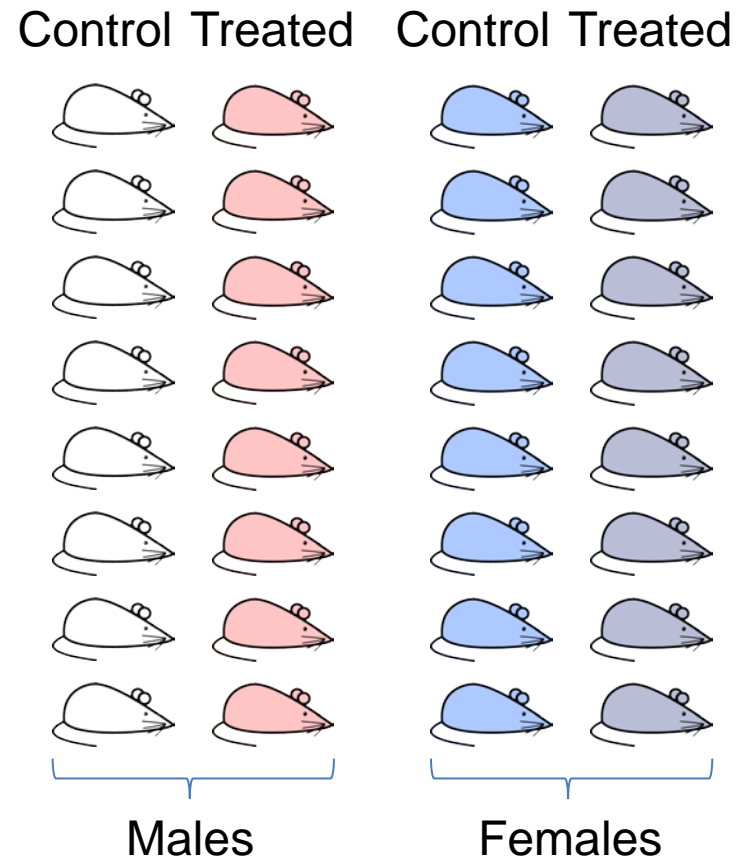
## **2x2 Factorial design**



## **Completely randomized design (one factor)**



## **Two separate experiments**



**Which design would you use ?**

**How can we know  
which design is correct ?**

**Simulations !!**

**Simulation tool: go to**

**t.ly/BTBI-**

**<https://schutz.shinyapps.io/gender/>**





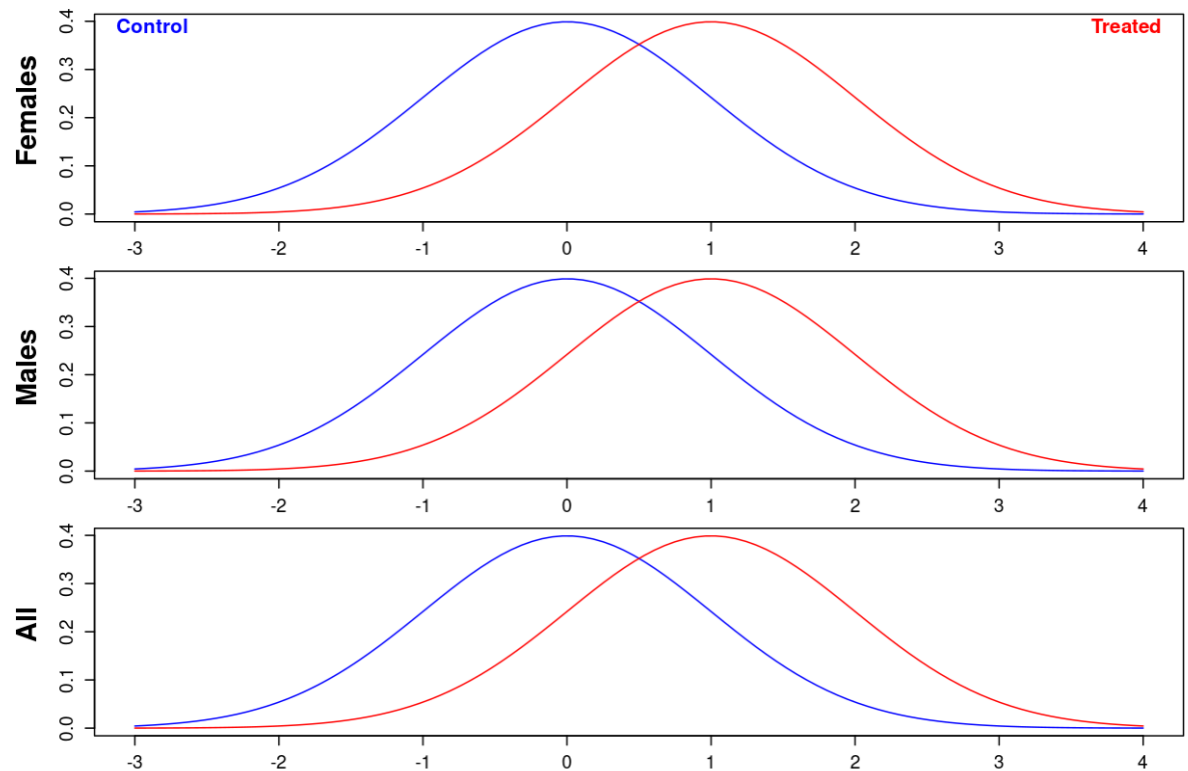
# Sex power simulations

**Treatment effect**

**Sex effect**

☐ Show advanced options

Frédéric Schütz  
(frederic.schutz@sib.swiss)



**Theoretical power** (for  $n=32$  units, all females): **0.78**. This is the baseline power.

**Power for a Student t-test** (all units included, males and females, but the sex variable is not taken into account)

Power (for  $n=32$  units): **0.8** (2.6% from the baseline)

As there is no sex effect, this should be close to the baseline

# **Case study 1 (simulation)**

**Presence of a treatment effect  
No sex effect**

**How much does it "cost" to  
take account sex in your model  
when it would not be needed ?**

## **Case study 2:**

**Presence of a treatment effect**

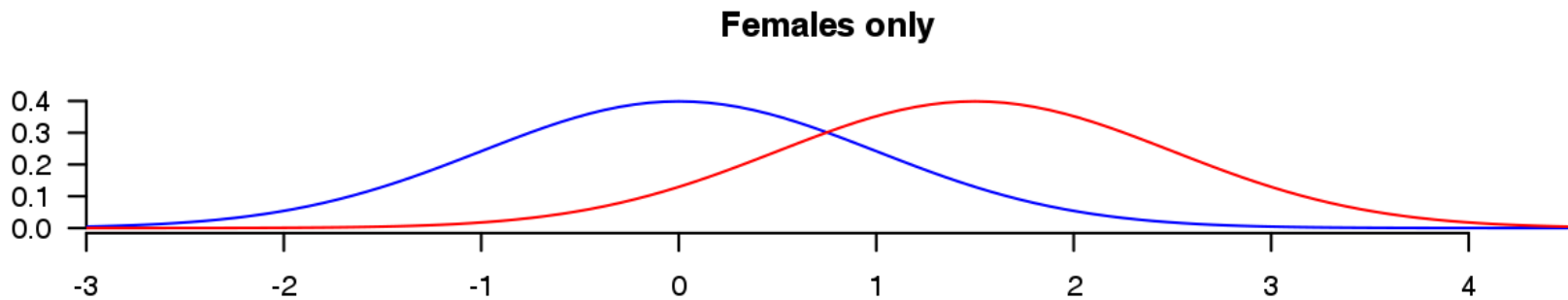
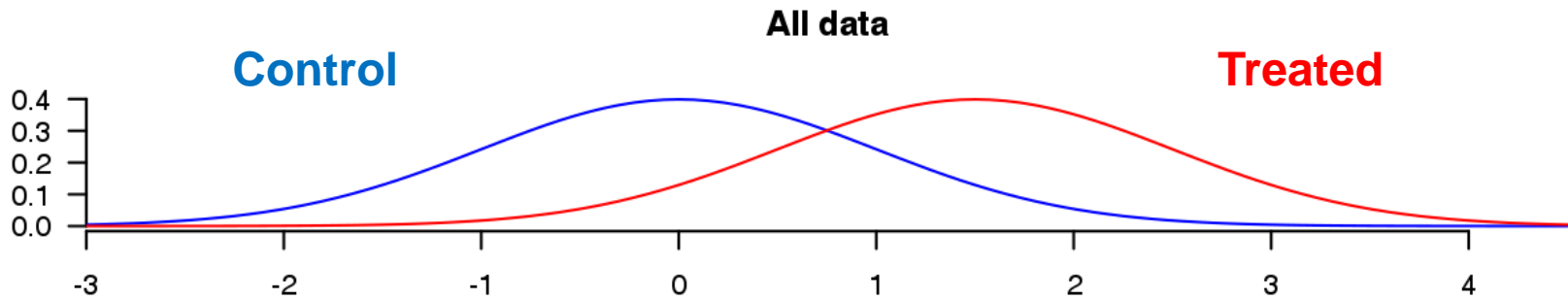
**Presence of a sex effect**



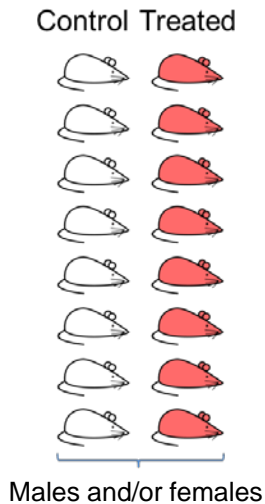
**Case study 1:  
16 mice (simulation)**

**Presence of a treatment effect  
No sex effect**

*What the populations look like*

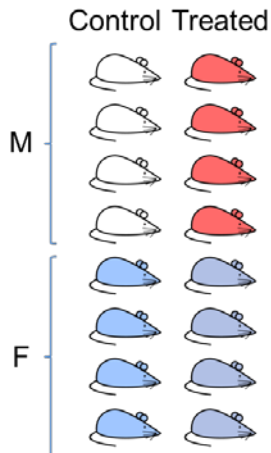


## *Difference between the two designs*



### Completely randomized design

- Analysed with a Two-sample Student t-test
- Sex is not taken into account
- Estimated power for treatment: **0.78**

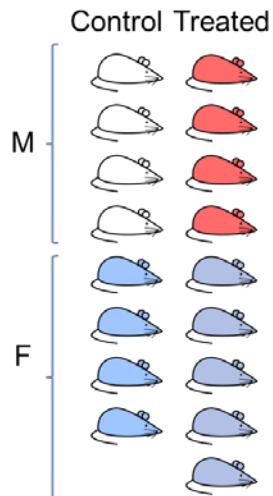


### 2x2 Factorial design

- Analysed with a Two-way ANOVA (treatment + sex + interaction)
- Sex is taken into account
- Estimated power for treatment : **0.765**

*What happens here ?*

Adding just **one** animal to the study (in any of the groups) would be enough to recover the original power (and even go a little bit beyond):



## 2x2 Factorial design

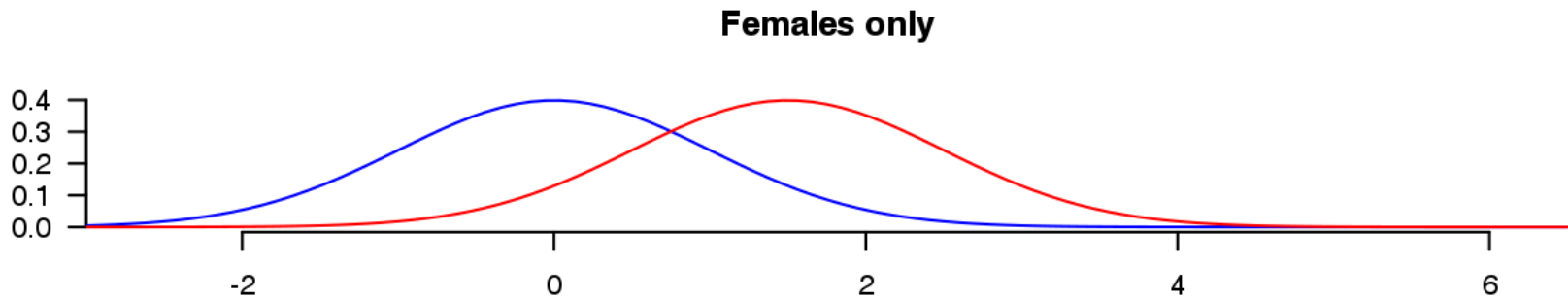
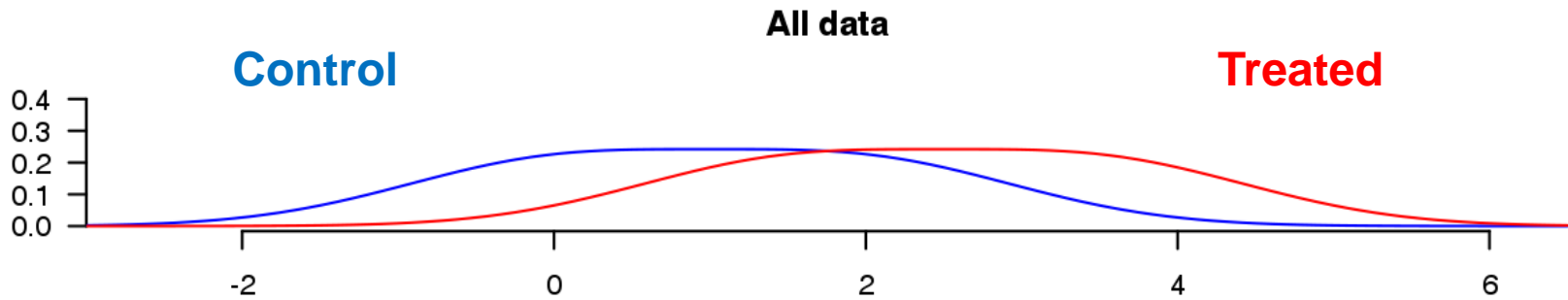
- Analysed with a Two-way ANOVA (treatment + sex + interaction)
- Sex is taken into account
- Estimated power for treatment : **0.80**



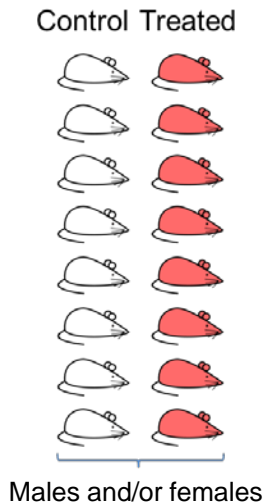
**Case study 2:**  
**16 mice (8 males, 8 females)**  
**(simulation)**

**Presence of a treatment effect**  
**Presence of a sex effect**

*What the populations look like*

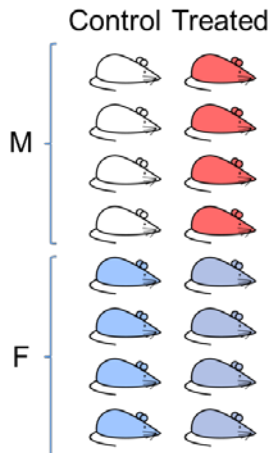


## *Difference between the two designs*



### **Completely randomized design**

- Analysed with a Two-sample Student t-test
- Sex is not taken into account
- Estimated power for treatment : **0.47**



### **2x2 Factorial design**

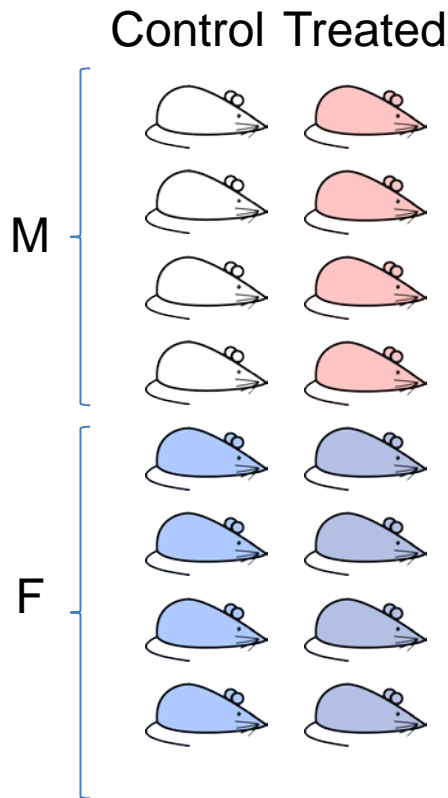
- Analysed with a Two-way ANOVA (treatment + sex + interaction)
- Sex is taken into account
- Estimated power for treatment : **0.79**

*What happens here ?*

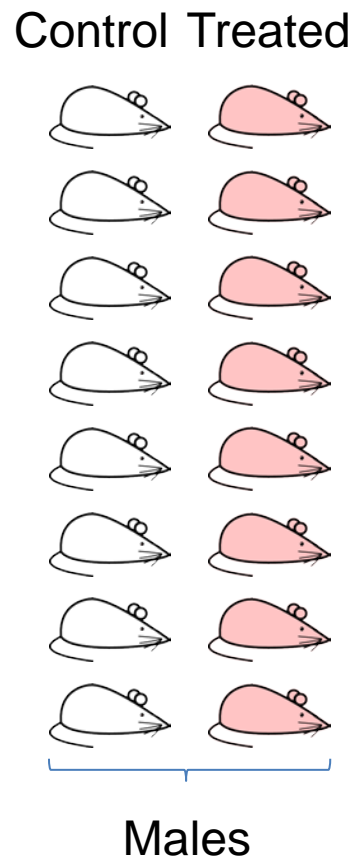
- In the two-way ANOVA, we are still estimating 2 more variables (effect of sex and interaction) than in the one-way ANOVA.
- Again, this **decreases** the power very slightly.
- However, the presence of the "sex" parameter explains some of the variability of the data, and removes much of the within-group variance.
- In other words: with some "noise" removed, it becomes easier for the model to identify the effect of the treatment.
- As such, the **power increases drastically**.

# *Different ways of analyzing Control/Treated with(out) sex*

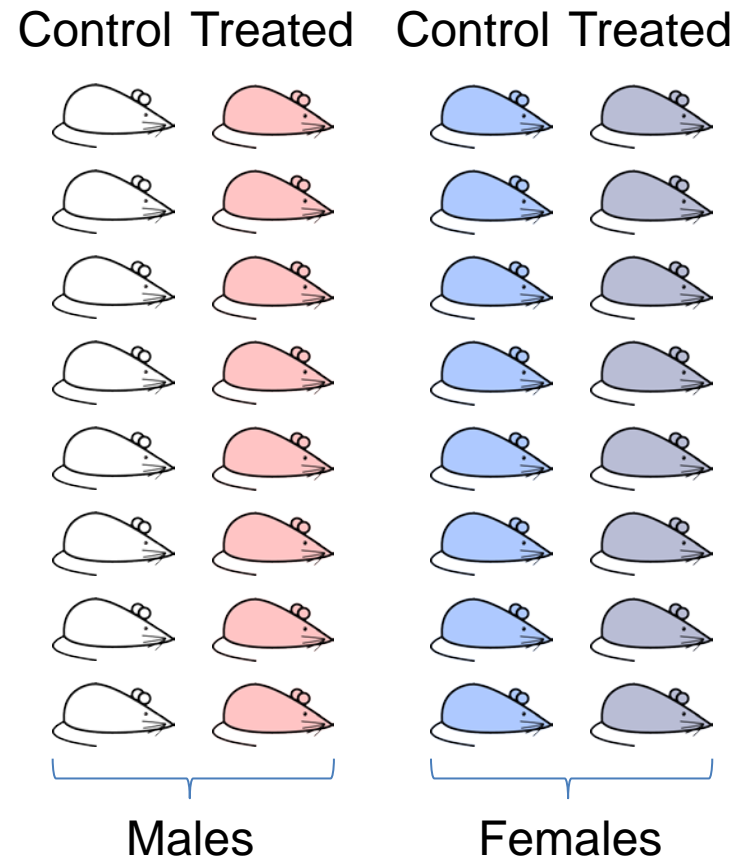
## **2x2 Factorial design**



## **Completely randomized design (one factor)**



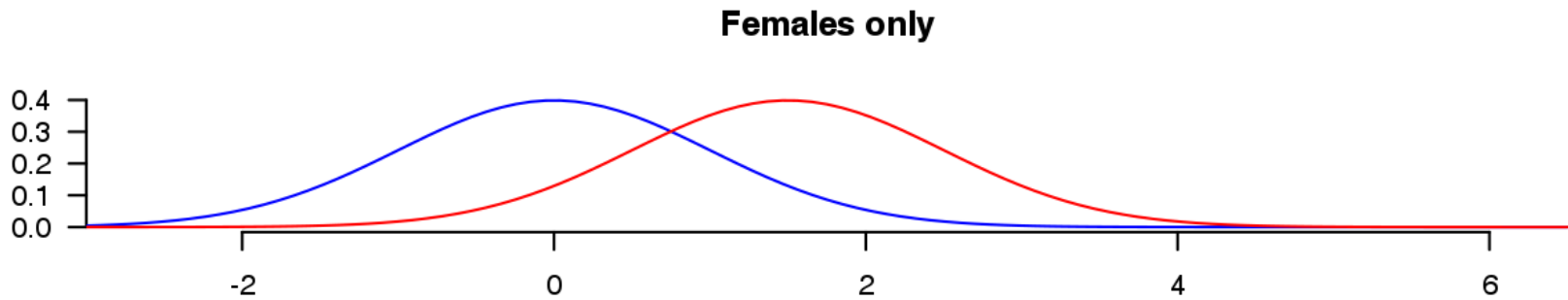
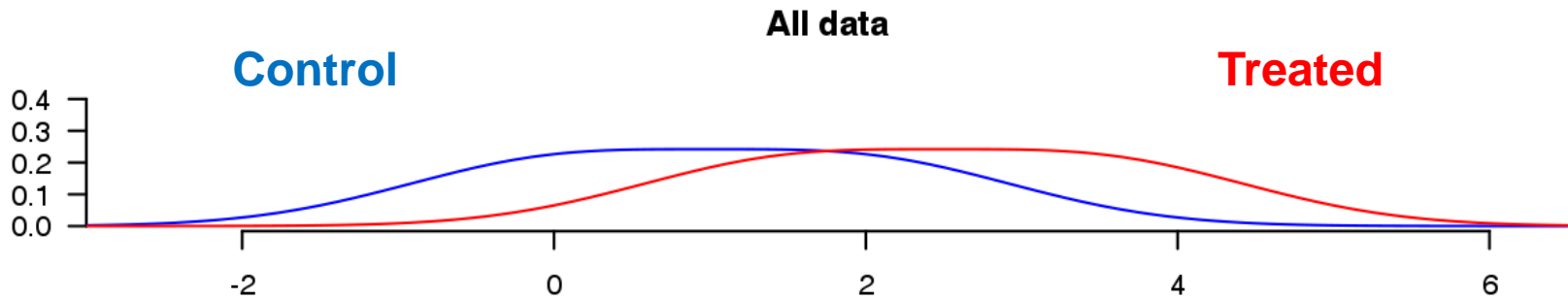
## **Two separate experiments**



**Case study 3:**  
**32 mice (16 males, 16 females)**  
**(simulation)**

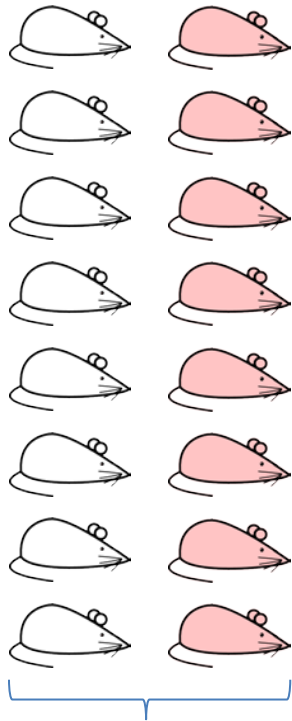
**Presence of a treatment effect**  
**Both sex considered separately**

*What the populations look like*



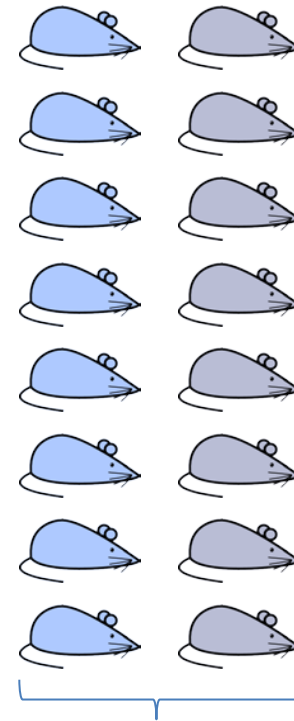
## *Two separate experiments*

Control Treated



Males

Control Treated



Females

**No comparison**

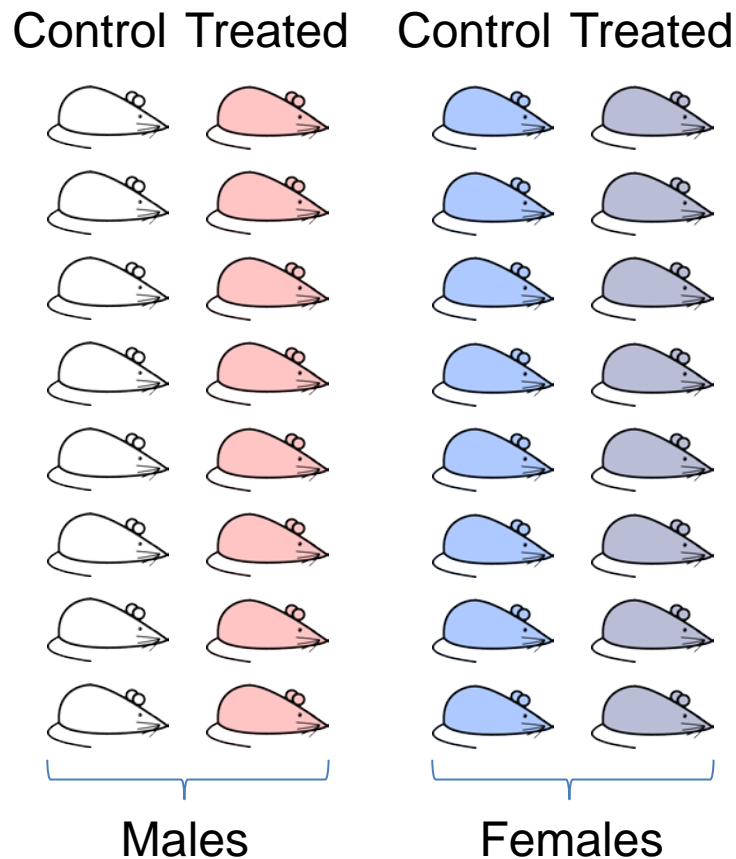
**Power for treatment:**

**0.796**

**Power for treatment:**

**0.796**





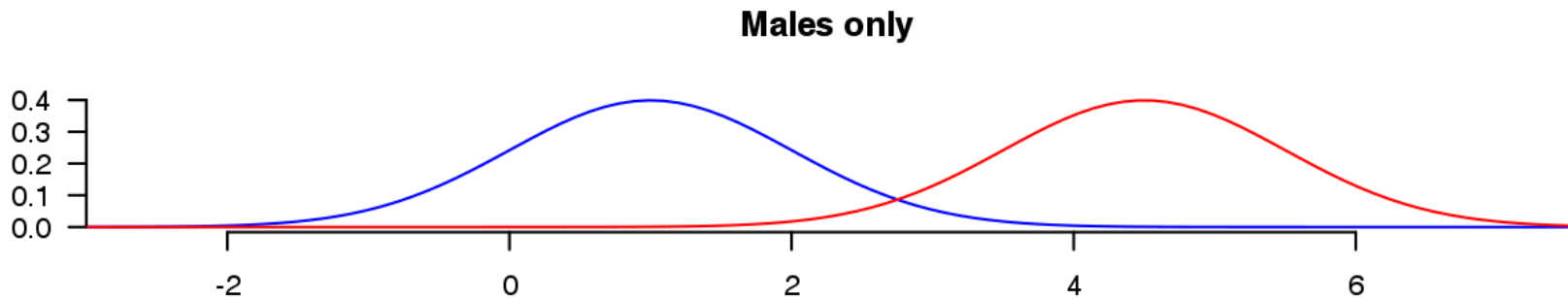
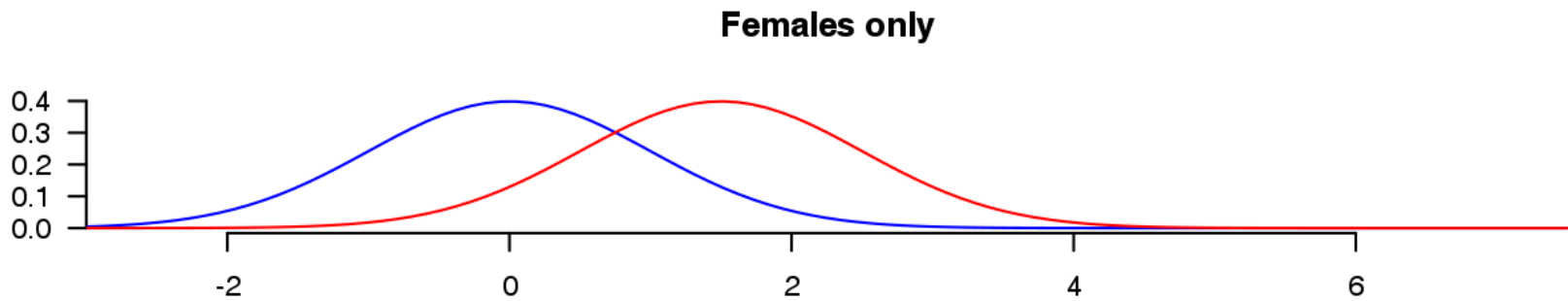
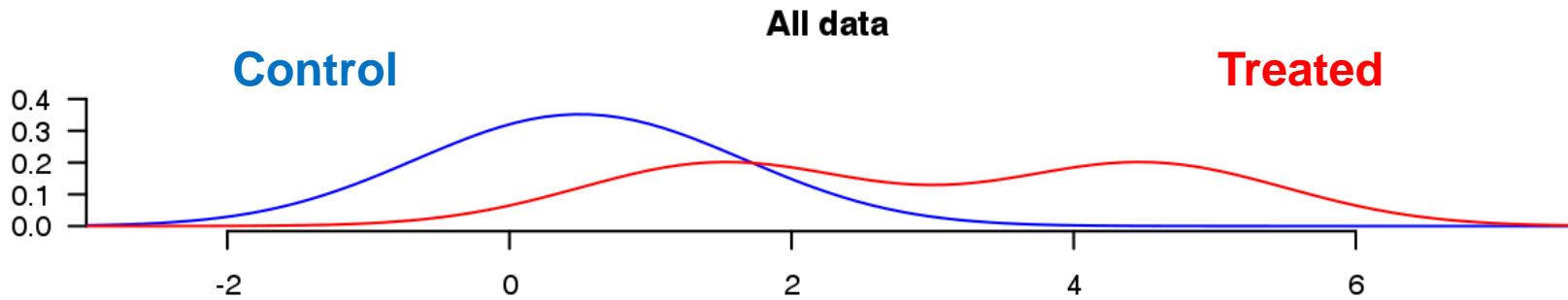
Two-sample T-test:  
Treatment only  
Power: **0.886**

**Two-way ANOVA:**  
Treatment + Sex  
Power: **0.983**

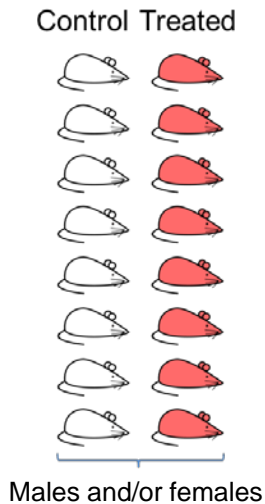
**Case study 4:**  
**16 mice (8 males, 8 females)**  
**(simulation)**

**Presence of a treatment effect**  
**Presence of a sex effect**  
**Presence of an interaction**

# *What the populations look like*

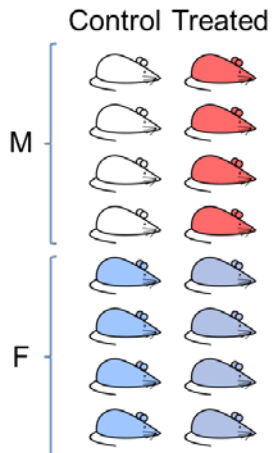


## *Difference between the two designs*



### **Completely randomized design**

- Analysed with a Two-sample Student t-test
- Sex is not taken into account
- Estimated power for treatment : **0.70**



### **2x2 Factorial design**

- Analysed with a Two-way ANOVA (treatment + sex + interaction)
- Sex is taken into account
- Estimated power for treatment : **0.78**

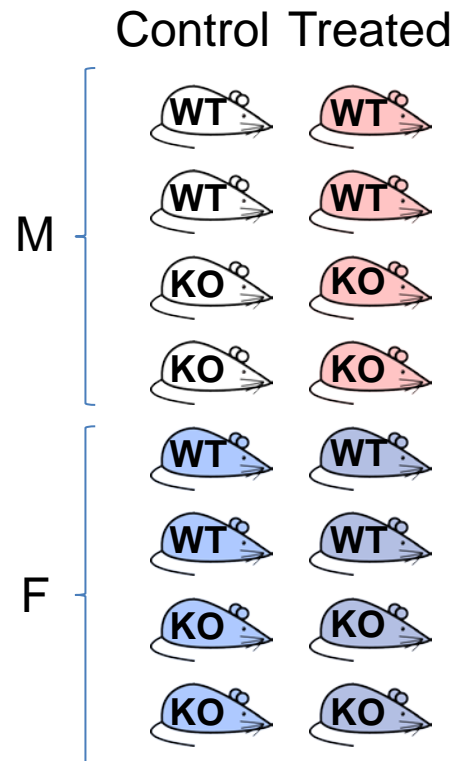
**What if we have  
more than two variables ?**

**Case study 5**  
**16 mice**  
**(8 males, 8 females)**  
**(8 WT, 8 KO)**

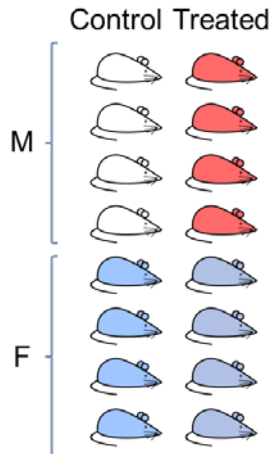
**Presence of a treatment effect**  
**Presence of a sex effect**  
**No interaction**  
**No effect of genotype**

*Adding one more variable*

**2x2x2**  
**Factorial design**

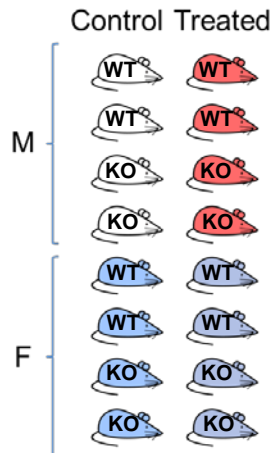


## *Difference between the two designs*



### 2x2 Factorial design

- Analysed with a Two-way ANOVA (treatment + sex + interaction)
- Sex is taken into account
- Estimated power for treatment : **0.795**



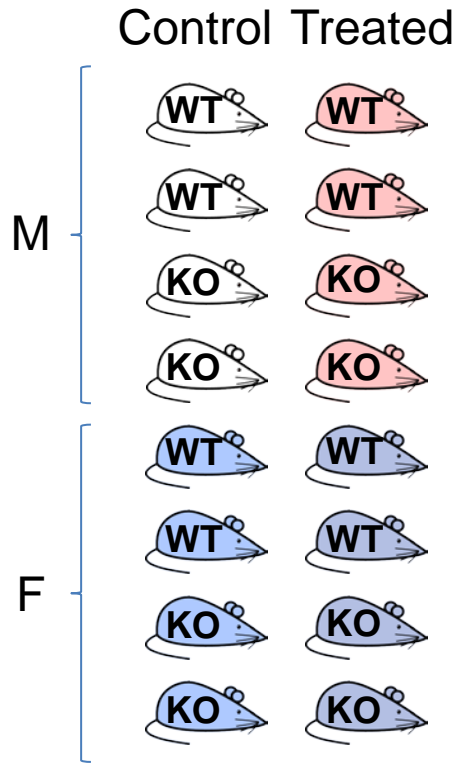
### 2x2x2 Factorial design

- Analysed with a Three-way ANOVA (treatment + sex + genotype + 4 interactions)
- Sex and genotype are taken into account
- Estimated power for treatment : **0.77**



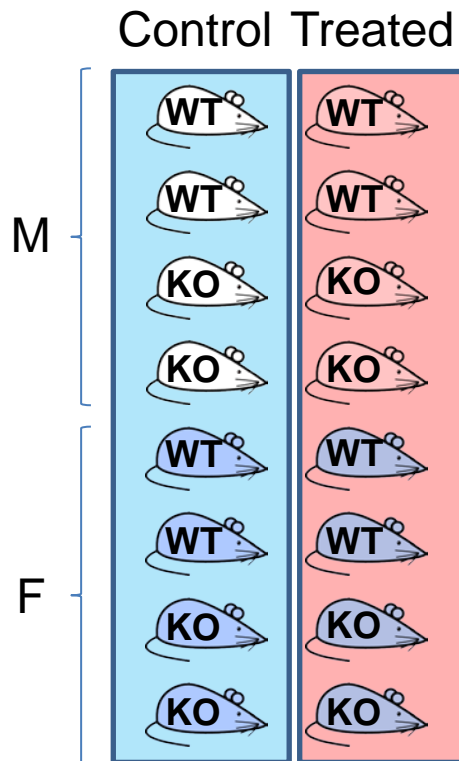
# *Why does the factorial design work ?*

## **2x2x2** **Factorial design**



*We still have ...*

**2x2x2**  
**Factorial design**



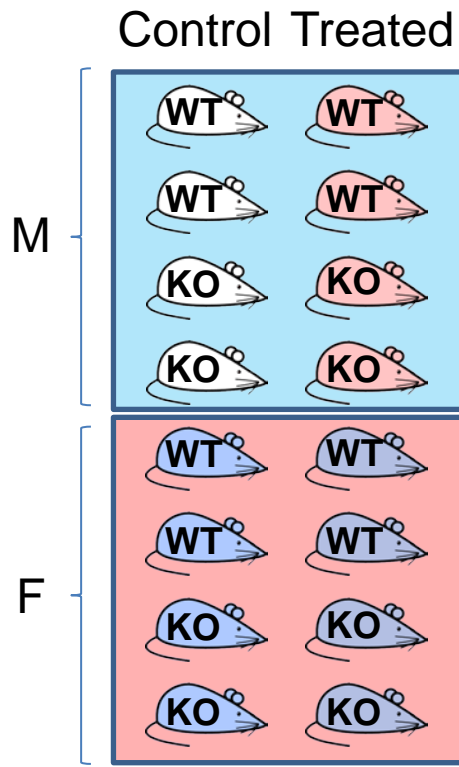
**8 controls**

VS

**8 treated**

*We still have ...*

**2x2x2**  
**Factorial design**



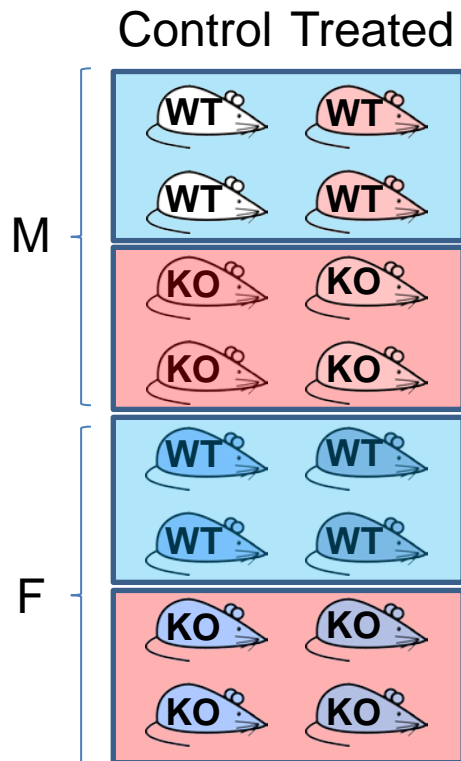
**8 males**

VS

**8 females**

*We still have ...*

**2x2x2**  
**Factorial design**



**8 WT**

VS

**8 KO**

**Thank you !**

**Factorial Crossing:  
compare the effect of  
two sets of conditions**

*2x2 factorial design: take the set of all possible combinations*

		Drug administration	
		Placebo	Active compound
Genotype	Wild-type	WT-PI	WT-AC
	Mutant	Mu-PI	Mu-AC

$2^2 = 4$  combinations

## *Factorial Crossing*

Compare two (or more) sets of conditions in the **same experiment**.

Designs with factorial treatment structure allow you to measure **interaction** between two (or more) sets of conditions that influence the response.



## *Factorial Crossing: beware of confounding*

If two conditions are associated in your sets of conditions, you may not be able to assess their contribution !

If all **wild-type** receive a placebo, and all **mutant** receive the **active compound**, you will not be able to know which condition caused any effect you may be observing !

If one of your combinations of factors is not present in your data, you will not be able to measure the interaction

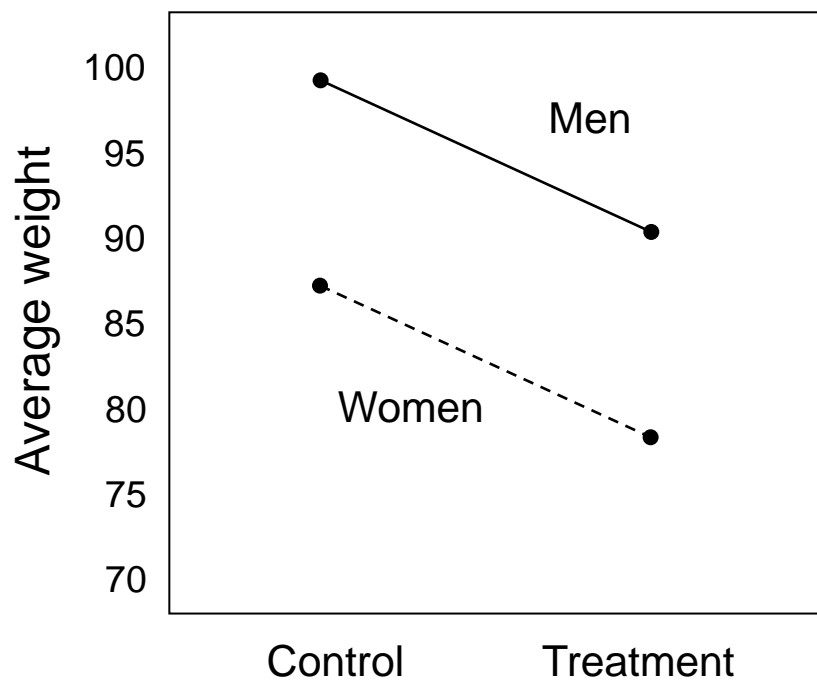
Interaction is very common (and very important) in science.

Interaction is a **difference of differences**.

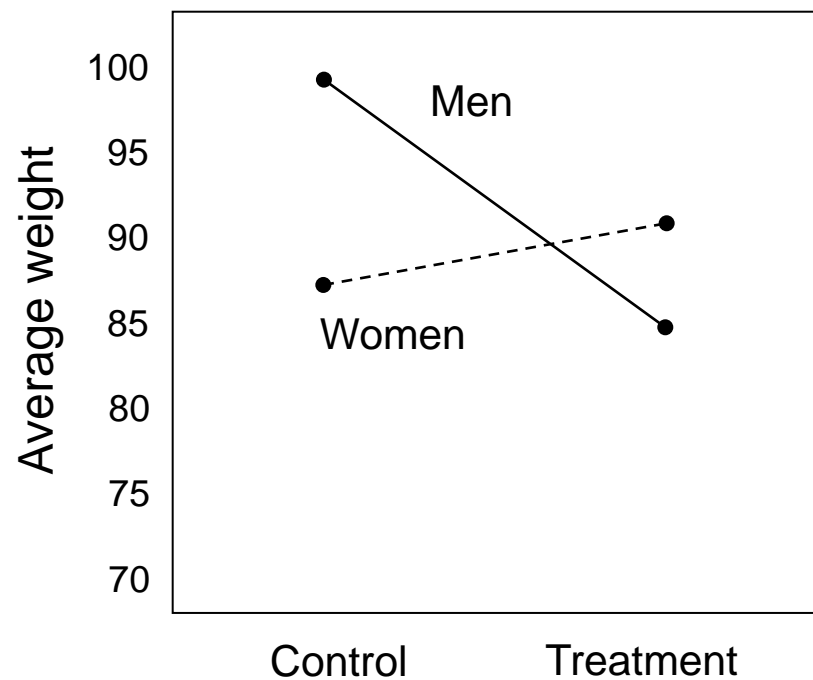
Interaction is present if the effect of one factor **is different** for different levels of the other factor

Main effects can be difficult to interpret in the presence of interaction, because the effect of one factor depends on the level of the other factor.

## No interaction



## Interaction



## *Reminder about power*

For a t-test or an ANOVA, the power depends on:

- The actual **effect size** (observed difference between groups);  
**larger means higher power**
- The **number of samples**;  
**larger means higher power**
- The **significance level** ( $\alpha$ , most often 0.05);  
**larger means higher power**
- The **variability** (observed difference within groups);  
**smaller means higher power**

And, for two-way (and above) ANOVA :

- The **number of parameters/variables**;  
**smaller means higher power.**