



HAL
open science

Adaptation des échantillons d'urine pour l'analyse d'azote par la méthode Dumas

Lorène Salis, Angélique Torrent, Aline Le Morvan, Gaëlle Maxin, Pierre
Noziere, Gonzalo Cantalapiedra-Hijar

► To cite this version:

Lorène Salis, Angélique Torrent, Aline Le Morvan, Gaëlle Maxin, Pierre Noziere, et al.. Adaptation des échantillons d'urine pour l'analyse d'azote par la méthode Dumas. NOV'AE, 2023, Numéro régulier (15). hal-04249771

HAL Id: hal-04249771

<https://hal.science/hal-04249771>

Submitted on 19 Oct 2023

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.

Adaptation des échantillons d'urine pour l'analyse d'azote par la méthode Dumas

Correspondance
lorene.salis@inrae.fr

Lorène SALIS¹
Angélique TORRENT¹
Aline LE MORVAN¹
Gaëlle MAXIN¹
Pierre NOZIERE¹
Gonzalo CANTALAPIEDRA¹

Résumé.

La méthode Kjeldahl est la méthode de référence pour l'analyse de la concentration d'azote dans les urines. Cette méthode est critique d'un point de vue sécuritaire et environnemental ainsi qu'en termes de temps et de coût. Afin de pallier ces différentes contraintes, des échantillons d'urine de ruminants ont été « solidifiés » pour pouvoir être analysés par une méthode alternative, la méthode Dumas. Cet article décrit cette adaptation ainsi que sa validation par le profil d'exactitude.

Mots-clés

Azote, Kjeldahl, Dumas, urine, ruminants, profil d'exactitude.



¹ Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores (UMR 1213) INRAE Auvergne - Rhône-Alpes, site de Theix (63) - France.

Adaptation of urine samples for nitrogen analysis by the Dumas method

Correspondence
lorene.salis@inrae.fr

Lorène SALIS¹
Angélique TORRENT¹
Aline LE MORVAN¹
Gaëlle MAXIN¹
Pierre NOZIERE¹
Gonzalo CANTALAPIEDRA¹

Abstract.

The Kjeldahl method is the reference method for analyzing nitrogen in urine. This method is critical from the standpoint of safety and the environment as well as that of cost. In order to attenuate these different constraints, samples of urine from ruminants were "solidified" for analysis by an alternative method, the Dumas method. This article describes this adaptation and its validation by precision profiling.

Keywords

Nitrogen, Kjeldahl, Dumas, urine, ruminants, precision profiling.



¹ Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores (UMR 1213) INRAE Auvergne - Rhône-Alpes, site de Theix (63) - France.

Introduction

Les ruminants ont besoin d'une alimentation équilibrée en apports énergétique et protéique pour maintenir leurs fonctions vitales, produire du lait et de la viande. L'ajustement des apports protéiques, en particulier, est un point essentiel pour, à la fois, optimiser la production en termes de coûts et réduire les rejets d'azote néfastes pour l'environnement (P.Nozière et al, 2018). En effet, si un éleveur apporte une quantité trop importante de protéines dans la ration, l'animal ne pourra pas le valoriser. Celui-ci va l'éliminer sous forme d'azote non digestible dans les fèces et dans les urines via l'urée issu de l'ammoniac produit dans le rumen et du catabolisme hématique d'acide aminés. Ces rejets, en trop grandes quantités, sont une source de pollution pour l'environnement (Demarquilly et al, 2020). A contrario, un apport en protéine en dessous des recommandations peut être une perte de rentabilité pour l'éleveur.

Pour pouvoir ajuster les apports en protéines, il faut comprendre l'utilisation des protéines ingérées par l'animal. Pour ce faire, nous réalisons des bilans azotés dans notre équipe DINAMIC de l'Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores (UMR 1213, INRAE) de Theix (63). Cela passe par le dosage de l'azote dans les aliments, dans les rejets et dans le lait pour les vaches laitières.

Dans cet article nous nous intéressons spécifiquement au dosage de l'azote dans les urines. Actuellement, dans notre laboratoire, cette analyse se fait uniquement par la méthode Kjeldahl. Cette méthode de référence possède néanmoins de nombreux inconvénients : elle nécessite l'utilisation de produits chimiques dangereux pour le manipulateur, génère beaucoup de déchets, et la durée de l'analyse est de 6 h. Une autre méthode moins risquée et plus rapide (résultats en 4 min) existe : la méthode Dumas. Cette méthode est déjà utilisée au laboratoire, mais elle est mise au point seulement pour des échantillons « solides ». Nous avons donc adapté nos échantillons liquides en les rendant « solides » à l'aide d'un support absorbant afin de les analyser par la méthode Dumas. Pour réaliser cette analyse, nous avons utilisé deux matrices : de l'urine d'ovin (n=20) et de l'urine de bovin (n=10) avec une gamme de concentration de l'azote allant de 0,38 à 2,54 % et une prise d'essai d'urine de 250 µl.

Après un rappel des deux méthodes d'analyse de la concentration en azote, cet article décrit cette adaptation ainsi que sa validation.

Rappel sur les méthodes d'analyse de la concentration en azote

Méthode Kjeldahl

Le principe de la méthode Kjeldahl (1883), selon la norme ISO 5983 de 1997, consiste en une « *Minéralisation de la matière organique par l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur. Alcalinisation des produits de la réaction, puis distillation et titrage de l'ammoniac libérée* ». Cette méthode ne permet pas de mesurer les nitrates et les nitrites. Elle ne dose que l'azote organique et ammoniacal.

Au laboratoire, nous sommes équipés d'un appareil Kjeldahl tech 2300/2400(Foss). Pour l'étape de minéralisation de l'échantillon, nous faisons réagir un comprimé de catalyseur (1,5 % sulfate de cuivre, 2 % sélénium et 96,5 % sulfate de sodium) avec 20 ml d'acide sulfurique à 98 % à une température de 350 °C. Pour l'étape de distillation, 70 ml de soude à 32 % sont ajoutés dans le tube contenant 50 ml d'eau distillée. La titration se fait par colorimétrie avec de l'acide borique à 4 % et à l'aide de l'acide chlorhydrique (HCl) à 0,1 N. Pour valider nos résultats, nous insérons dans nos séries un standard de sulfate d'ammonium dont la concentration est connue (5 g/l d'azote) ; nous devons retrouver cette concentration après analyse. Les échantillons sont analysés en double et sont moyennés avec une tolérance de 3 %. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'azote, 1 ml HCl délivré lors de la titration correspondant à 1,4 mg d'azote. Le pourcentage de protéines est obtenu en multipliant le pourcentage d'azote par 6,25.

Méthode Dumas

La méthode Dumas est une méthode par combustion pour déterminer la teneur totale en azote d'un composé organique (Dumas 1831). La norme ISO 16634-1 Décembre 2008 définit que : « *Les échantillons sont transformés en gaz par chauffage dans un tube à combustion. Les composants interférents sont éliminés du mélange gazeux obtenu. Les composés azotés du mélange gazeux ou d'une partie représentative de ceux-ci sont transformés en azote moléculaire, qui est déterminé quantitativement au moyen d'un détecteur à conductivité thermique* ». Sur le logiciel, l'apparition de l'azote est représentée par une courbe gaussienne. L'intégration de ce pic permet d'obtenir la teneur en azote de l'échantillon. Cette méthode, contrairement à la méthode Kjeldahl, permet de mesurer l'azote globale, c'est-à-dire les nitrates, les nitrites, l'azote organique et ammoniacal.

L'appareil qui nous permet de quantifier l'azote de nos échantillons est le RapidN (Elementar). La combustion se fait à l'aide de l'oxygène avec un débit de 210 ml/min pendant 100 secondes et avec une température dans le tube de combustion

de 960 °C, dans le tube post-combustion et dans 800 °C et le tube de réduction de 815 °C. Le gaz vecteur qui entraîne les gaz de combustion est le CO₂. La calibration de l'appareil est faite à l'aide de l'EDTA. Un témoin certifié (orchard de chez Leco, n° interne AQ21) est analysé pour valider la série. Les échantillons sont analysés en double avec une tolérance de 2 %. Les résultats sont exprimés en % ou en mg d'azote.

Adaptation de la méthode Dumas pour des échantillons liquides

Choix du support et prise d'essai

Nous avons d'abord réfléchi à un support pour introduire nos échantillons liquides dans l'appareil Rapid N. Les feuilles sans azote utilisées pour les échantillons solides ne sont pas adaptées pour les échantillons liquides car elles sont perméables. Les contraintes pour trouver un autre support étaient : (1) le support ne doit pas contenir d'azote et (2) il ne doit pas entraîner la perte de liquide. Nous avons testé différents types de supports : des capsules en étain, la silice avec une feuille d'étain et de la cellulose également avec une feuille d'étain. Pour nous assurer qu'ils ne contenaient pas d'azote, nous les avons analysés, au préalable, avec de l'eau millipore. Aucun des trois supports n'en contenait.

Lors des premiers tests, nous avons observé des pertes de liquide lors de la fermeture de la capsule en étain. La silice était trop pulvérulente. Pour des raisons pratiques nous avons donc choisi de « solidifier » nos échantillons à l'aide d'un support absorbant : la cellulose (environ 50 mg).

Pour la prise d'essai, nous avons voulu conserver notre gamme

étalon EDTA pour éviter de la modifier à chaque changement de matrice solide/liquide. Pour cela, la prise d'essai doit être suffisante pour que le résultat soit répétable, mais pas trop grande pour préserver l'appareil. En effet, pour conserver les urines, de l'acide sulfurique est ajouté aux échantillons lors de la collecte. Cet acide sulfurique peut endommager l'appareil. Nous avons testé différentes prises d'essai à 200 µL, 250 µL et 300 µL. Nous avons choisi une prise d'essai de 250 µL qui est un compromis entre une quantité pas trop élevée pour ne pas endommager l'appareil et la répétabilité.

Tests préalables

Préparation de l'échantillon (Figure 1)

Dans une feuille d'étain, environ 50 g de cellulose et 250 µL d'urine sont déposés. Une boulette est formée afin de pouvoir l'introduire dans le trou du carrousel de l'appareil. À partir de l'ordinateur, l'analyse est lancée avec les paramètres décrits ci-dessus (cf. méthode Dumas).

Validation du support avec de la glycine

Pour valider ce support, nous l'avons testé avec des solutions de glycine à 5 concentrations d'azote connues : 0,5 ; 1 ; 1,50 ; 2 et 3 %. Pour chaque concentration, deux solutions de glycine ont été préparées en parallèle puis mélangées pour s'assurer de la concentration exacte de la solution. Puis, ces solutions ont été analysées par la méthode Dumas avec les paramètres décrits ci-dessus. Nous avons réalisé 9 répétitions pour chaque concentration. Les résultats sont présentés dans la Figure 2.

De par l'équation de la droite ($y = 0,9373x + 0,0888$) et son R² de 0,9991, nous avons pu conclure que les résultats obtenus avec ce support sont justes et répétables.

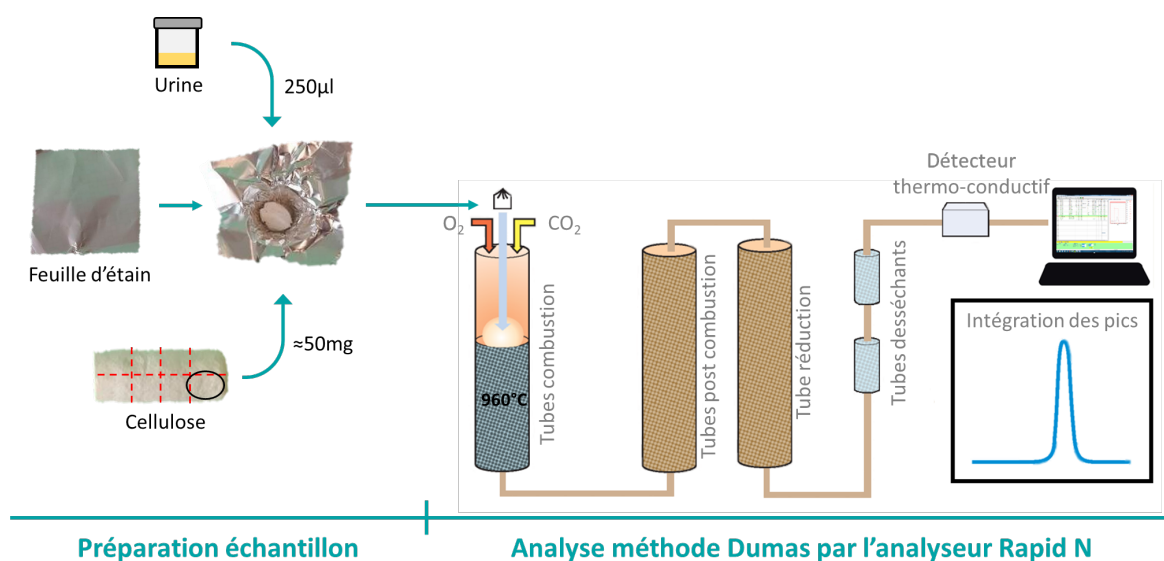


Figure 1. Étape de préparation et analyse de la concentration en azote d'un échantillon biologique liquide par la méthode Dumas.

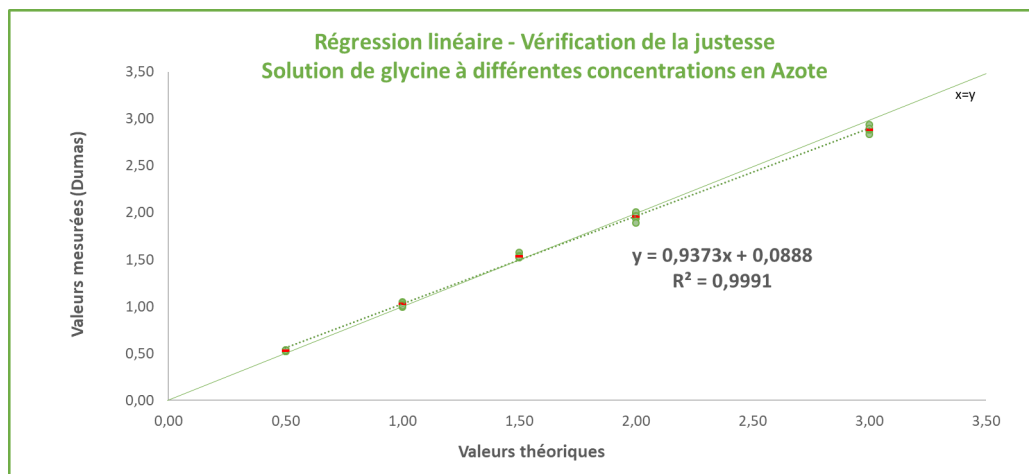


Figure 2. Droite de régression linéaire entre les valeurs mesurées et les valeurs théoriques pour une solution de glycine à différentes concentrations en azote.

À partir de ces premiers résultats nous avons pu écrire le mode opératoire.

Démarche de validation de méthode avec le profil d'exactitude

Nous avons voulu vérifier la conformité de la méthode alternative, la méthode Dumas, par rapport à la méthode de référence, la méthode Kjeldahl en utilisant le profil d'exactitude (Feinberg, 2010, 2010a, 2010b, 2010c).

Sélection des échantillons et domaine de validation

Pour valider la méthode d'analyse de la concentration d'azote dans les urines, la matrice étudiée est l'urine de ruminants de deux espèces différentes, bovine et ovine. Le domaine de validation de la méthode est défini sous forme d'une gamme de concentration en azote urinaire exprimée en pourcentage. Cette gamme doit être la plus étendue possible pour que nos futurs résultats se trouvent dans ces limites. Les urines qui servent à calculer les éléments du profil d'exactitude sont issues de deux expérimentations :

- La première réalisée sur des vaches laitières (n=10) en

2016 (Mendowski et al, 2019) avec des concentrations d'azote urinaire allant de 0,38 à 1,08 % d'azote. Les vaches avaient reçu des régimes iso-protéiques se différenciant par la dégradabilité des protéines ;

- La deuxième réalisée sur des agneaux (n=20) en 2017 (Bernard et al, 2020) avec des concentrations d'azote urinaire comprise entre 0,62 et 2,54 % d'azote. Les agneaux avaient reçu une alimentation plus ou moins riche en azote (13, 15 et 18 % d'azote).

Notre domaine de validation se trouve donc entre de 0,38 et 2,54 % d'azote urinaire (pourcentage massique g/100 g) avec 30 niveaux de concentration. Pour ces échantillons de validation, la valeur de référence est connue, obtenue par la méthode Kjeldahl.

Planification des essais de validation

Le plan expérimental de la validation doit être réalisé dans les mêmes conditions que le mode opératoire appliqué en routine. Pour ces deux expérimentations, l'urine d'une journée est prélevée en présence d'un conservateur (acide sulfurique à 30 %), puis congelée à -20 °C. Ensuite, elle est décongelée et divisée en deux aliquotes (Figure 3) :

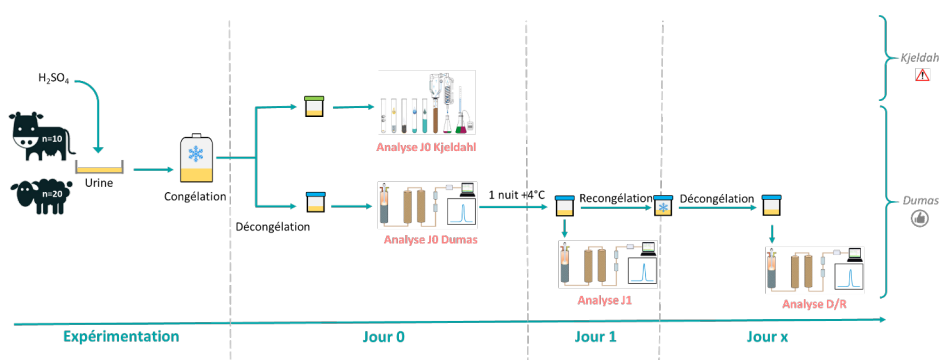


Figure 3. Plan de l'expérimentation et de l'analyse.

- Un pour l'analyse d'azote par la méthode de référence Kjeldahl :
 - ◊ Jour 0 (J0) correspond au 1^{er} jour après la 1^{re} décongélation de l'échantillon ;
- Un autre pour l'analyse de l'azote par la méthode Dumas. Cet aliquote a été analysé à :
 - ◊ Jour 0 (J0),
 - ◊ Le lendemain (J1) après être resté une nuit à +4 °C.

Cet aliquote a été recongelé après l'analyse J1, puis décongelé pour être analysé ; il est nommé D/R pour décongélation/recongélation.

Dans la théorie, pour établir un profil d'exactitude, il faut prévoir au moins 3 séries de mesures. Pour chaque série, il convient d'effectuer au moins 2 des répétitions avec au moins 3 niveaux de concentrations couvrant le domaine d'application avec une valeur de référence. Ce qui représente $3 \times 2 \times 3 = 18$ essais. Les résultats doivent être obtenus dans les mêmes conditions.

Dans notre cas, le plan de validation est formé de 3 séries de mesures (Figure 4) :

- J0 : méthode Dumas
- J1 : méthode Dumas
- D/R : méthode Dumas

Pour chaque série (J0, J1 et D/R), nous avons répété l'analyse 3 fois (rep 1, 2 et 3) sur 30 niveaux de concentration, c'est-à-dire sur 10 échantillons d'urines de bovins et 20 échantillons d'urines d'ovins, ce qui fait au total $3 \times 3 \times 30 = 270$ essais. La méthode de calcul proposée dans la méthode du profil d'exactitude ne prévoit pas de méthodes de détection et/ou de rejet de données atypiques. Dans notre essai, nous n'avons rejeté aucune valeur aberrante. Le plan de validation avec les valeurs obtenues se trouvent dans le tableau 1.

Les résultats sont comparés avec les résultats obtenus avec la méthode de référence (Kjeldahl) à J0. Comme mentionné précédemment, les résultats de la validation doivent être obtenus dans les mêmes conditions. Ici ce n'est pas le cas, il y a un effet de conservation, les résultats sont obtenus à J0 puis J1 et après une décongélation/recongélation. On aurait dû faire la validation par exemple uniquement avec des échantillons issus de J0. Nous ajoutons une difficulté en ne nous mettant pas dans des conditions optimales pour valider notre méthode. Si la validation est acceptée, nous pourrions décrire la robustesse de notre méthode.

Limites d'acceptabilité et de tolérance

Pour utiliser le profil d'exactitude en vue de valider une méthode, il faut avoir fixé les deux critères de décision suivants (Figure 5) :

- en rouge : les limites d'acceptabilité $\lambda \pm$. Elles servent à traduire les objectifs pratiques des utilisateurs. Elles délimitent un intervalle autour de la valeur de référence ;
- en bleu : les limites de tolérance, la proportion β . Elle représente la proportion de futurs résultats qui seront en moyenne compris dans les intervalles de tolérance.

L'exactitude est une combinaison de la justesse (erreur systématique = biais) et de la répétabilité (erreur aléatoire = écart-type de répétabilité). Si la ligne en noir de la figure 5 est proche de 100 %, il n'y a pas de biais, la méthode est juste. Si les limites de tolérance sont en dehors des limites d'acceptabilité, alors la méthode n'est pas répétable. On peut le voir sur ce graphique avec le point 10. La méthode commencera à être répétable à partir du point 20. On pourra ainsi délimiter le domaine de validité entre 20 et 70.

Pour notre validation, les limites d'acceptabilité ont été fixées à $\pm 15\%$ autour de la valeur cible et choisies après discussion avec les utilisateurs. Ce qui signifie que pour une teneur de 1 % d'azote dans les urines, le résultat sera

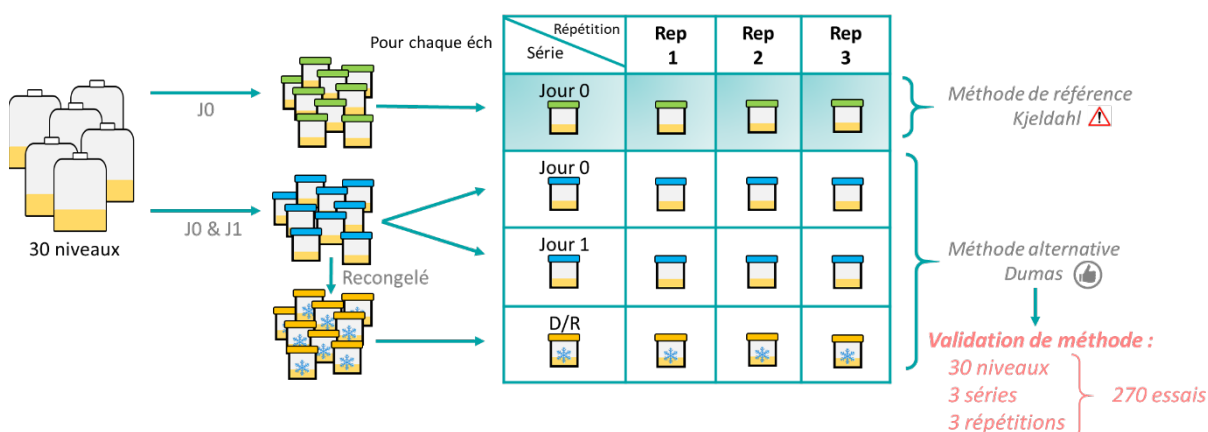


Figure 4. Plan de validation de la méthode Dumas d'analyse de la concentration en azote des échantillons d'urines de bovins et d'ovins.

Tableau 1. Résultats d'analyse de la concentration en azote (en %) dans les urines de bovins et d'ovins obtenus avec les deux méthodes pour les différentes séries (J0, J1 & RD) et répétitions.

Espèce	Niveau	Série	KJELDAHL			DUMAS			Espèce	Niveau	Série	KJELDAHL			DUMAS		
			Rép 1 (en %)	Rép 2 (en %)	Rép 3 (en %)	Rép 1 (en %)	Rép 2 (en %)	Rép 3 (en %)				Rép 1 (en %)	Rép 2 (en %)	Rép 3 (en %)			
Bovin	1	J0	0,38	0,37	0,38	0,36	0,38	0,36	Bovin	9	J0	1,06	1,07	1,06	1,06	1,04	1,04
		J1	-	-	-	0,43	0,39	0,39			J1	-	-	-	1,08	1,07	1,10
		D/R	-	-	-	0,40	0,38	0,38			D/R	-	-	-	1,01	1,08	1,09
Bovin	2	J0	0,53	0,53	0,53	0,47	0,51	0,51	Bovin	10	J0	1,08	1,08	-	1,13	1,14	1,18
		J1	-	-	-	0,51	0,47	0,47			J1	-	-	-	1,18	1,15	1,19
		D/R	-	-	-	0,47	0,50	0,47			D/R	-	-	-	1,10	1,12	1,10
Bovin	3	J0	0,60	0,61	0,60	0,55	0,57	0,55	Ovin	8	J0	1,18	1,16	1,18	1,16	1,20	1,24
		J1	-	-	-	0,55	0,58	0,59			J1	-	-	-	1,18	1,18	1,22
		D/R	-	-	-	0,58	0,58	0,57			D/R	-	-	-	1,21	1,17	1,17
Ovin	1	J0	0,62	0,63	0,61	0,60	0,60	0,61	Ovin	9	J0	1,30	1,30	1,29	1,27	1,28	1,31
		J1	-	-	-	0,62	0,62	0,64			J1	-	-	-	1,32	1,35	1,35
		D/R	-	-	-	0,59	0,62	0,62			D/R	-	-	-	1,28	1,37	1,34
Ovin	2	J0	0,63	0,63	0,62	0,62	0,61	0,61	Ovin	10	J0	1,39	1,36	1,34	1,26	1,31	1,29
		J1	-	-	-	0,62	0,63	0,61			J1	-	-	-	1,33	1,34	1,32
		D/R	-	-	-	0,65	0,65	0,64			D/R	-	-	-	1,31	1,32	1,28
Ovin	3	J0	0,65	0,66	0,65	0,68	0,68	0,66	Ovin	11	J0	1,42	1,41	-	1,43	1,40	1,38
		J1	-	-	-	0,68	0,66	0,66			J1	-	-	-	1,43	1,44	1,42
		D/R	-	-	-	0,67	0,67	0,66			D/R	-	-	-	1,38	1,40	1,44
Bovin	4	J0	0,67	0,68	0,68	0,67	0,70	0,66	Ovin	12	J0	1,47	1,48	-	1,54	1,53	1,47
		J1	-	-	-	0,71	0,66	0,67			J1	-	-	-	1,49	1,57	1,48
		D/R	-	-	-	0,66	0,71	0,65			D/R	-	-	-	1,50	1,52	1,47
Bovin	5	J0	0,72	0,69	0,78	0,71	0,73	0,77	Ovin	13	J0	1,52	1,51	1,52	1,56	1,57	1,53
		J1	-	-	-	0,77	0,77	0,77			J1	-	-	-	1,52	1,56	1,49
		D/R	-	-	-	0,71	0,73	0,71			D/R	-	-	-	1,59	1,55	1,58
Bovin	6	J0	0,83	0,83	-	0,81	0,81	0,78	Ovin	14	J0	1,57	1,58	-	1,56	1,56	1,56
		J1	-	-	-	0,78	0,83	0,80			J1	-	-	-	1,58	1,57	1,56
		D/R	-	-	-	0,77	0,82	0,77			D/R	-	-	-	1,58	1,57	1,56
Bovin	7	J0	0,87	0,87	0,88	0,84	0,86	0,86	Ovin	15	J0	1,65	1,64	1,64	1,59	1,64	1,63
		J1	-	-	-	0,85	0,85	0,88			J1	-	-	-	1,74	1,70	1,73
		D/R	-	-	-	0,82	0,82	0,85			D/R	-	-	-	1,63	1,65	1,71
Ovin	4	J0	0,89	0,90	0,90	0,92	0,92	0,94	Ovin	16	J0	1,72	1,74	-	1,68	1,72	1,78
		J1	-	-	-	0,93	0,93	0,91			J1	-	-	-	1,76	1,75	1,76
		D/R	-	-	-	0,88	0,87	0,87			D/R	-	-	-	1,78	1,68	1,81
Ovin	5	J0	0,92	0,92	0,92	0,87	0,90	0,89	Ovin	17	J0	1,75	1,74	1,75	1,70	1,79	1,83
		J1	-	-	-	0,90	0,91	0,92			J1	-	-	-	1,83	1,80	1,78
		D/R	-	-	-	0,89	0,87	0,89			D/R	-	-	-	1,84	1,80	1,78
Bovin	8	J0	0,96	0,96	-	0,91	0,91	0,92	Ovin	18	J0	1,88	1,88	1,88	1,88	1,95	1,97
		J1	-	-	-	0,94	0,90	0,95			J1	-	-	-	1,93	1,94	1,92
		D/R	-	-	-	0,91	0,91	0,87			D/R	-	-	-	1,87	1,93	1,93
Ovin	6	J0	0,97	0,99	0,97	1,01	0,97	0,97	Ovin	19	J0	2,07	2,07	2,04	2,08	2,06	2,12
		J1	-	-	-	0,94	0,95	0,99			J1	-	-	-	2,08	2,10	2,09
		D/R	-	-	-	1,00	0,96	1,00			D/R	-	-	-	2,02	2,08	2,11
Ovin	7	J0	1,03	1,04	1,03	1,03	1,06	1,06	Ovin	20	J0	2,54	2,54	2,53	2,60	2,55	2,67
		D/R	-	-	-	1,08	1,02	1,07			J1	-	-	-	2,52	2,63	2,58
		J1	-	-	-	1,06	1,08	1,10			D/R	-	-	-	2,55	2,50	2,61

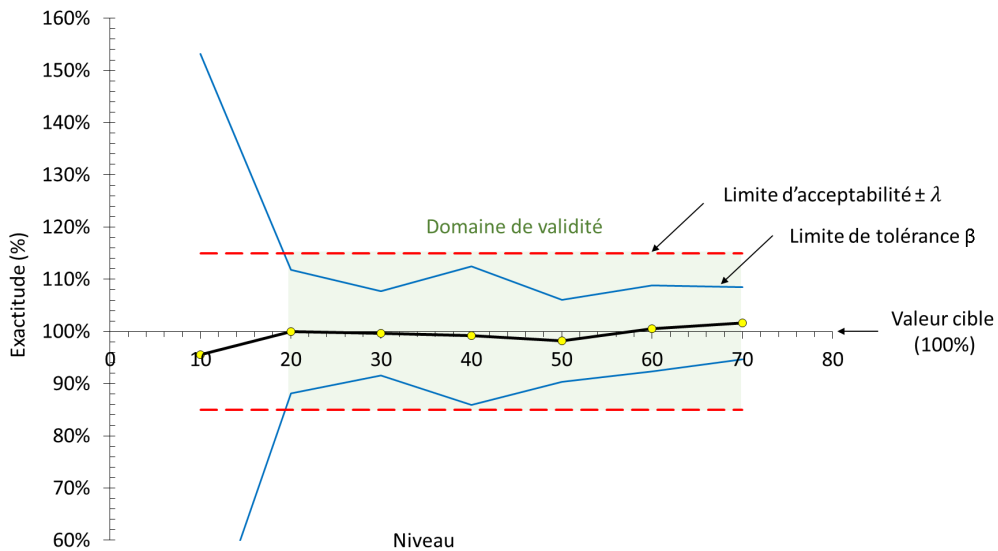


Figure 5. Explication du profil d'exactitude sous forme d'un exemple.

compris au maximum entre 0,85 et 1,15 % d'azote. La proportion - est égale à 80 % (pas de réglementation pour cette application, en général en biologie, on choisit $\beta \geq 80\%$). Le domaine de validation s'étend de 0,38 à 2,54 % d'azote.

Profil d'exactitude

Pour établir le profil d'exactitude, nous avons utilisé un outil statistique pour estimer l'exactitude de la méthode. C'est un « modèle d'analyse de la variance à un seul facteur à effets aléatoires ». Tous les calculs pour construire le profil d'exactitude sont réalisés à l'aide des feuilles de calcul Microsoft Excel®. Le fichier génère automatiquement les tableaux de calcul et le profil d'exactitude. Tous les détails de leur construction sont disponibles dans un numéro spécial de 2010 du Cahier des Techniques de l'INRA (Feinberg, 2010 a, b et c).

Le profil d'exactitude permet de calculer les moyennes, écarts types de répétabilité pour estimer la fidélité, les biais pour évaluer la justesse, et les limites de tolérance. Ce profil permet de garantir que les futurs résultats soient compris dans les limites de tolérance, avec une probabilité associée. Limite à comparer avec des limites d'acceptabilité pour créer la validité ou non de la méthode.

Construction du profil d'exactitude

Les éléments graphiques entrant dans le profil d'exactitude sont les suivants (Figure 6) :

- Axe horizontal :
 - ◇ Les valeurs de référence moyennées
- Axe vertical :
 - ◇ Les taux de recouvrement moyens traduisant la justesse
 - ◇ Les limites de tolérance d'espérance $\beta = 80\%$ basses et hautes relatives (en bleu)

◇ Les limites d'acceptabilité basses et hautes relatives de $\pm 15\%$ (pointillé rouge).

Interprétation

Le rôle du profil d'exactitude est d'estimer, à partir des résultats obtenus lors de la validation, la garantie pour l'utilisateur que la méthode utilisée en routine fournira des résultats acceptables. On observe que pour $\beta = 80\%$ et une limite d'acceptabilité de $\pm 15\%$, les limites de tolérance sont comprises entre les limites d'acceptabilité dans le domaine de validité. Ce qui signifie que notre méthode est répétable. Nous garantissons que 80 % des futurs résultats seront compris dans une limite d'acceptabilité de $\pm 15\%$ dans le domaine de validité de 0,38 à 2,54 % d'azote.

En outre, ce graphique fournit d'autres indications. Le taux de recouvrement qui traduit la justesse, se trouve de part est d'autre de 100 % : il n'y a donc pas de biais systématique. Nous avons vérifié quand même cette justesse avec une régression linéaire. Nous avons utilisé la moyenne de niveau de concentrations pour la valeur azotée mesurée par la méthode Dumas, dans le but de capter le maximum de variations. Nous avons obtenu une équation $y = 1,0288x - 0,0269$ avec un R^2 de 0,9977 (Figure 7). Nous pouvons en conclure que la méthode est juste et qu'il n'y a pas besoin d'équation de passage entre la méthode de référence et la méthode alternative.

Résultats statistique sous R

Une fois la méthode validée, une comparaison statistique entre les deux méthodes a également été effectuée avec le logiciel R. Pour rappel, seules les analyses à JO ont été réalisées par la méthode Kjeldahl (Kj). Nous n'avons donc utilisé que le jeu de données JO moyennées pour faire la comparaison entre les méthodes Kjeldahl et Dumas.

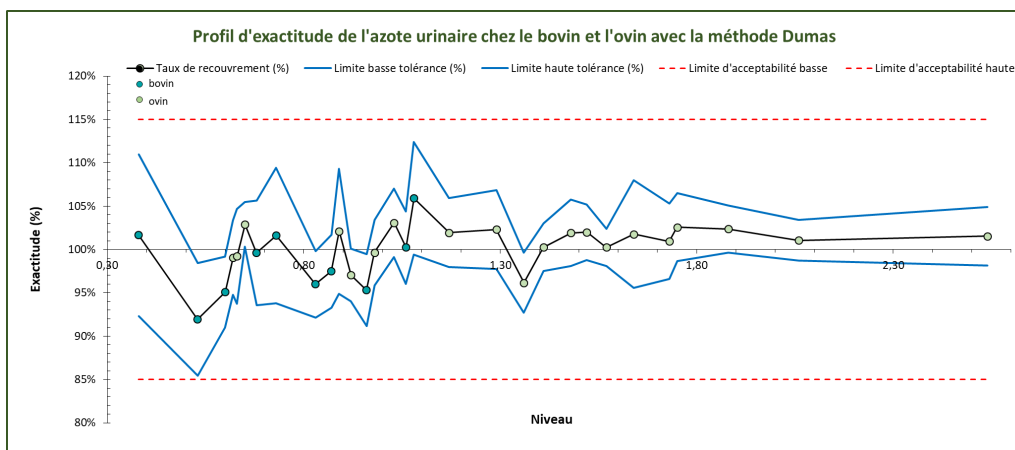


Figure 6. Profil d'exactitude de la concentration d'azote urinaire (d'après le tableau plan de validation) avec la méthode Dumas, pour $\lambda = 15\%$ et $\beta = 80\%$, chez le bovin ($n=10$) et chez l'ovin ($n=20$).

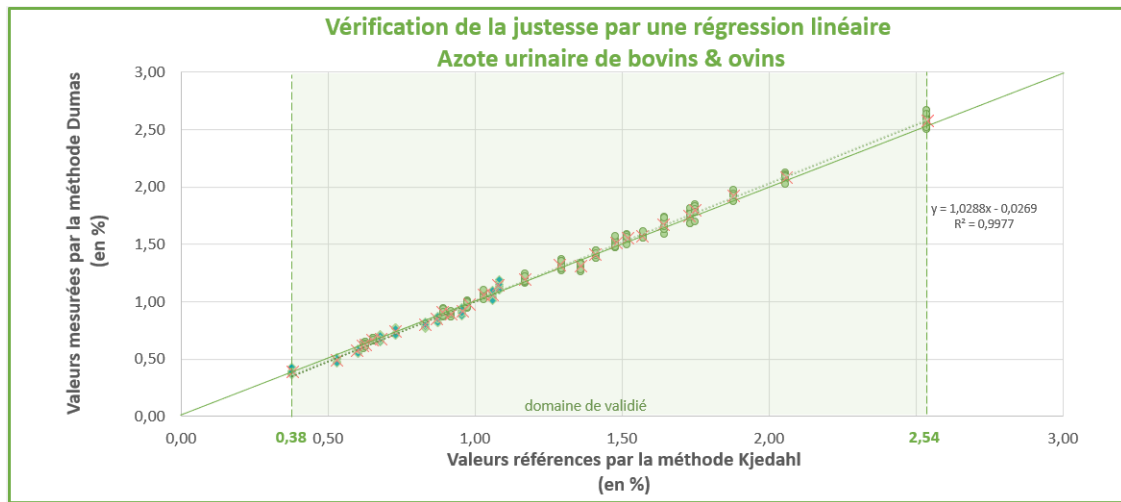


Figure 7. Régression linéaire de la concentration en azote urinaire chez le bovin et l'ovin par la méthode Dumas (en %) en fonction de la méthode Kjeldahl.

Au vu de la grande dispersion des pourcentages d'azote entre les bovins (n=10 ; de 0,38 à 1,08 % d'azote) et les ovins (n=20 ; de 0,62 à 2,54 % d'azote), nous avons choisi de les traiter indépendamment. Dans l'expérimentation sur les ovins, ils avaient été séparés en 3 lots différents recevant une alimentation plus ou moins riche en azote (13, 15 et 18 % d'azote). Nous avons pris en compte ces lots dans nos analyses statistiques.

Nous avons tout d'abord vérifié les différentes hypothèses préalables avant d'exécuter le test statistique. Il n'y avait pas de valeur aberrante, la normalité était respectée avec le test

Shapiro-Wilk avec un risque d'erreur de 5 %, de même pour l'homogénéité des variances avec le test Levenne. Pour comparer nos moyennes nous avons utilisé le test T pour des valeurs appariées.

Dans les conditions de l'expérimentation, pour les bovins (n=10) nous avons obtenu une p-value de 0,26 et pour les ovins (n=20), les p-values sont de 0,98 ; 0,96 et 0,90 respectivement pour les régimes à 13, 15 et 18 % d'azote. Les p-values sont supérieures à 0,05, cela signifie qu'il n'y a pas de différence statistique entre la méthode Kjeldahl de référence et la méthode Dumas chez les bovins et les ovins (Figure 8).

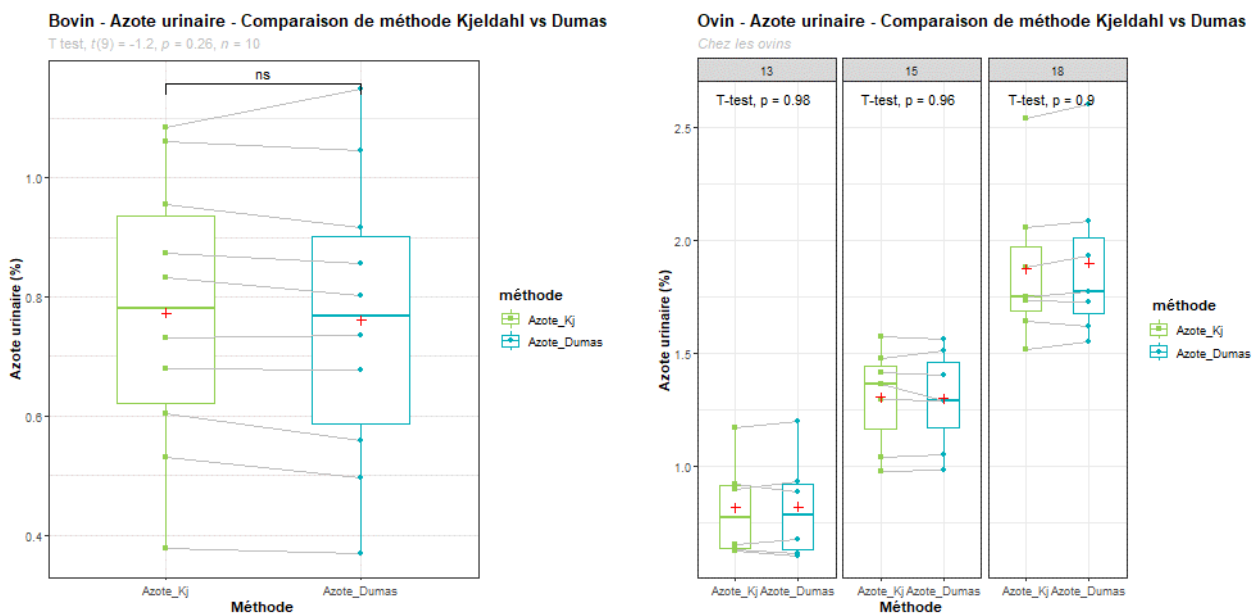


Figure 8. Représentation graphique (Boxplot) de la comparaison des méthodes Kjeldahl et Dumas, à gauche pour les bovins et à droite pour les ovins, avec les p-value associées au test T.

Conclusion

L'objectif de cette étude était de valider une méthode alternative, la méthode Dumas, pour quantifier les concentrations en azote dans les urines de ruminants. La méthode de référence (Kjeldahl) présente en effet beaucoup d'inconvénients. L'outil du profil d'exactitude a facilité cette validation.

Avec cette méthode alternative, nous garantissons que 80 % des futurs résultats seront compris dans une limite d'accep-

tabilité de ± 15 % pour un domaine de validité de 0,38 à 2,54 %. L'analyse de la concentration d'azote dans les urines de ruminants par la méthode Dumas est juste et répétable. De plus, d'après les résultats statistiques sous R, nous pouvons conclure qu'il n'y a pas de différence statistique entre les deux méthodes dans nos conditions expérimentales.

La prochaine étape sera d'étudier s'il y a des différences statistiques entre les différents temps de conservation des échantillons d'urine : J0, J1 et décongelé/recongelé ■

Références

Demarquilly C., Faverdin Ph., Geay Y., Vermorel M. (Juin 2020). Bases rationnelles de l'alimentation des ruminants. Production Animale.

Feinberg M. (2010a). Principes et vocabulaire. In Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. Le Cahier des Techniques de l'Inra, numéro spécial, pp. 13-25.

Feinberg M. (2010b). Mise en œuvre du profil d'exactitude. In Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. Le Cahier des Techniques de l'Inra, numéro spécial, pp. 27-44.

Feinberg M. (2010c). Mise en œuvre du profil d'exactitude. In Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. Le Cahier des Techniques de l'Inra, numéro spécial, pp. 45-59.

Bernard M., Cheng L., Chantelauze C., Song Y., Jeanleboeuf A., Sagot L., Cantalapiedra-Hijar G. (2020). Nitrogen partitioning and isotopic discrimination are affected by age and dietary protein content in growing lambs. *Animal*, 14(5), 942-951. Disponible sur : [10.1017/S1751731119002647](https://doi.org/10.1017/S1751731119002647), [hal-02530297](https://hal.inrae.fr/hal-02530297).

Nozière P., Sauvant D., Delaby L. (2018). Alimentation des ruminants. Chapitre « *Les rejets azotés* ». Édition Quae INRAE.

Norme ISO 5983 de 1997 - Méthode Kjeldahl (1883).

Norme ISO 16634-1 Décembre 2008 - Dumas (1831).

Mendowski S., Chapoutot P., Chesneau G., Ferlay A., Enjalbert F., Cantalapiedra-Hijar G., Germain A., Nozière P. (2019). Effects of replacing soybean meal with raw or extruded blends containing faba bean or lupin seeds on nitrogen metabolism and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102(6), pp.5130-5147. Disponible sur : [10.3168/jds.2018-15416](https://doi.org/10.3168/jds.2018-15416), [hal-02627689](https://hal.inrae.fr/hal-02627689).



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 « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.