

Validation statistique du microdosage enzymatique robotisé de l'arginine dans le bois de vigne

Sylvie Milin¹, Jean-Pierre Gaudillère¹ et Ghislaine Hilbert¹

L'arginine constitue plus de la moitié des acides aminés contenus dans le sarment de vigne. Sa teneur varie généralement entre 0.1 g et 2.5 g d'arginine (entre 0.03 g et 0.80 g N) par kg de matière sèche de poudre de bois à 70°C.

Afin de la quantifier efficacement, nous avons mis au point, puis validé statistiquement, le microdosage enzymatique en point final (réaction totale) de la L-arginine dans le bois de vigne, en utilisant un robot « préparateur de microplaques ».

Ce robot distribue les réactifs dans des microplaques de 96 puits de 330 µL, où se font les réactions chimiques ; puis un lecteur de plaques mesure les densités optiques de chaque puits.

- La réponse d'une solution synthétique d'arginine est linéaire et quantifiable entre 0.6 et 31.0 nanomoles d'arginine par microdosage, et précise à 0.4 nanomole près.
- L'arginine est extraite à l'eau dans la poudre de bois sec microbroyé (granulométrie 10 µm). Les tannins, inhibiteurs enzymatiques, sont éliminés par adsorption sur de la poudre de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP).
- Le microdosage enzymatique robotisé de l'extrait est significativement spécifique car la zone de recouvrement des ajouts dosés, sur 10 échantillons, est de 91.7% ± 8.9%.
- L'incertitude de mesure sur la teneur en arginine dans le bois de vigne est définie au risque d'erreur de 5%, sur 5 échantillons et sur 2 extraits par échantillon dosés 3 fois de suite : elle est de 0.01 g kg⁻¹ pour une teneur en arginine égale à 0.13 g kg⁻¹ de matière sèche, et elle croît jusqu'à 0.08 g kg⁻¹ pour une teneur égale à 1.57 g kg⁻¹.
- Les résultats, comparés à ceux obtenus par HPLC « AccQ Tag », sont statistiquement justes, car la moyenne des différences, sur 10 échantillons, est de 0.08 g kg⁻¹.
- La miniaturisation de la méthode enzymatique réduit le prix de revient d'un microdosage à 0.3 € (contre environ 1.6 € pour un dosage classique). En routine, 4 extractions sont effectuées par échantillon : 2 répétitions d'environ 30 mg et 60 mg de poudre de bois dans 750 µL d'eau ; l'analyse d'un échantillon (4 microdosages) coûte donc 1.2 €
- Environ 100 échantillons peuvent être dosés quotidiennement. La souplesse d'utilisation du robot permet de faire aussi bien de petites que de grandes séries analytiques.

Ce travail démontre l'efficacité du microdosage enzymatique robotisé de l'arginine dans le bois de vigne : la méthode est précise, spécifique, juste, économique, rapide et pratique.

Les teneurs en arginine de différents échantillons de bois de vigne, montrent que cet acide aminé est un indicateur pertinent du statut azoté de la plante.

Mots clefs

Arginine. Arginase. Microtitration. Robot. Incertitude des mesures analytiques. Validation statistique des méthodes d'analyses.

¹ INRA - UMR-1219 Œnologie-Ampélogie ECAV (Equipe Ecophysiologie et Agronomie Viticole) - Domaine de la Grande Ferrade, BP81, 71 avenue Edouard Bourleaux, 33883 Villenave d'Ornon Cedex, France – courriel : milin@bordeaux.inra.fr

Introduction

La vigne, espèce ligneuse pérenne, stocke des substances azotées solubles, principalement sous forme d'acides aminés dans ses organes de réserve (tronc, bois, rameaux). L'arginine, molécule à 4 atomes d'azote, constitue 50% à 70% de ces acides aminés (KLIEWER, 1991). Pour étudier la mise en réserve et la remobilisation de l'azote, il faut disposer d'une méthode pratique de dosage de l'arginine. La méthode colorimétrique « Sakagushi », peu précise, est abandonnée. La méthode HPLC est très précise, mais longue, toxique et onéreuse. Ramón MIRA DE ORDUÑA (2001) détermine la teneur en arginine dans les jus de raisin et les vins par dosage enzymatique en point final, dans des cuves de 2 mL. Nous avons adapté son mode opératoire à des échantillons de bois de vigne, et à des microdosages dans des « puits » de 330 µL.

Ces microanalyses sont réalisées en série à l'aide du robot « Précision 2000⁺ » (société Bio-Tek[®] Instruments), « préparateur de microplaques », associé à un lecteur de microplaques.

L'objet de cette étude est donc double : **valider statistiquement la méthode enzymatique adaptée à des extraits de poudre de bois, et valider la technique de microtitration automatisée à l'aide des microplaques de 96 puits**. Nous justifierons d'abord le choix de la technique de dosage de l'arginine. Puis, nous préciserons les conditions de prélèvement des échantillons de bois sur le terrain, leurs conditions de stockage et de traitement, avant de développer la méthode d'extraction de l'arginine, appliquée en routine, dans le bois de vigne. Nous décrirons alors le mode opératoire du microdosage enzymatique robotisé de l'arginine, avant de le valider statistiquement par des critères de linéarité, de spécificité et de justesse. Enfin, nous montrerons l'intérêt de l'utilisation du robot, avant de conclure cette étude.

1. Sélection de la technique de dosage de l'arginine

1.1. Dosage HPLC (méthode AccQ Tag de Waters) avec détection fluorimétrique

La technique est appliquée en routine au laboratoire pour doser 21 acides aminés (dont l'arginine) dans la pellicule et la pulpe de raisin. Le principe repose sur :

- la séparation des acides aminés en fonction de leurs affinités avec la phase stationnaire de la colonne (phase silice greffée C₁₈) et la phase mobile (solvant binaire composé d'acétate de sodium et d'acétonitrile) à gradient d'élution,
- la propriété des acides aminés primaires et secondaires de devenir fluorescents après réaction avec un réactif de dérivation : l'AccQ, ou AQC (6-Amino Quinoly-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate). Les dérivés d'acides aminés formés sont fluorescents à 395 nm (après excitation à 250 nm).

Tous les acides aminés sont séparés en 67 minutes. L'arginine est détectée au bout de 25 mn.

La détection est très sensible : environ 1 picomole d'arginine par millivolt minute (lecture en surface de pic). La réponse est linéaire jusqu'à 2 nanomoles d'arginine injectée.

1.2. Dosage colorimétrique « Sakagushi »

L'arginine donne, avec l' α -naphtol et l'hypobromite alcalin, une couleur rose ou rouge, mesurée à 500 nm. L' α -naphtol et l'arginine sont d'abord laissés environ 15 minutes en milieu très basique. Puis l'ajout d'hypobromite de soude développe la couleur au bout d'environ 30 secondes. La stabilisation de la couleur est alors améliorée par ajout d'un excès d'urée, et d'éthanol. La réaction colorée est fugace et peu précise. De plus, l'ammonium et d'autres acides aminés interfèrent sur le dosage.

1.3. Dosage enzymatique

Le dosage impose 3 réactions enzymatiques successives : hydrolyses de la L-arginine en urée (par la L-arginase), puis de l'urée en ammonium (par l'uréase), et oxydo-réduction (en présence de glutamate-déshydrogénase) par action de l'ammonium formé et d'un excès d' α -cétoglutarate avec le NADH (absorbant à la longueur d'onde de 340 nm), formant du NAD (n'absorbant pas à 340 nm).

La quantité de NADH consommée dans la dernière réaction est proportionnelle à la quantité d'ammonium libérée successivement par action de l'arginase et de l'uréase.

La réponse est linéaire et quantifiable entre 0.6 et 31.0 nanomoles d'arginine par microdosage, et précise à ± 0.4 nanomoles près, ce qui correspond à une gamme d'étalonnage quantifiable entre 3 et 150 mg L⁻¹ (36 μ L de prise d'essai par microdosage) à ± 2 mg L⁻¹ près.

1.4. Comparaison des méthodes de dosage de l'arginine (voir tableau 1)

	Dosage HPLC avec détection fluorimétrique	Dosage colorimétrique "SAKAGUSHI"	Dosage enzymatique en point final
Spécificité	Spécifique	Peu spécifique	Spécifique
Précision	Très précise	Peu précise (fugacité de la réaction)	Précise
Sensibilité	Très sensible (0 à 2 nmoles) (1 pmole par mV min)	Sensible	Sensible (0.6 à 31.0 nmoles) (± 0.4 nmole)
Dynamique de réponse	Très grande (gamme de 0 à 850 mg L ⁻¹)		Limitée (gamme de 0 à 150 mg L ⁻¹)
Nombre de dosages/jour	Au plus 12 (1 chromatogramme = 67 min)	Au moins 100	Au moins 100
Toxicité	Acétonitrile toxique		Aucune toxicité
Coût des réactifs	Cher (réactif AccQ ≈ 2.5 €/analyse)	Peu cher	Cher (≈ 1.6 €/dosage) (≈ 0.3 €/microdosage)

Tableau 1 : Comparaison de 3 techniques de dosage de l'arginine

Le dosage chromatographique par **HPLC** avec détection fluorimétrique, malgré sa très bonne sensibilité et sa très grande dynamique de réponse, n'est **pertinent** devant la méthode enzymatique que **pour un petit nombre d'analyses**, car la séparation des acides aminés dure 67 minutes par échantillon. Même en adaptant la méthode HPLC au dosage exclusif de l'arginine (qui est détecté au bout de 25 minutes), la cadence analytique n'est toujours pas compétitive devant les autres méthodes. De plus, l'acétonitrile est toxique et l'AccQ coûteux. Le dosage colorimétrique « Sakagushi », peu précis, est abandonné.

Le **dosage enzymatique est intéressant pour ses critères de performances** (précision, sensibilité, spécificité). Le coût élevé des enzymes, surtout celui de l'arginase (12500 U pour 1400 €), sera limité en réalisant des microanalyses avec le robot.

Tout résultat analytique doit être associé à une évaluation de l'incertitude. Parmi toutes les causes d'erreur, l'échantillonnage est une source de variabilité importante.

2. Echantillonnage

2.1. Prélèvement sur le terrain

Au moment de la taille annuelle de la vigne, sur des souches prédéterminées et sur un des sarments de l'année, nous prélevons une « bûchette » comprenant un bourgeon de rang 3 ou 4, et les deux demi entre-nœuds associés (photo 1).

L'échantillon représentatif d'une placette est constitué d'une « bûchette » par souche, pour les placettes d'au moins 7 souches, et de 2 « bûchettes » (sur 2 sarments) par souche, pour les placettes de moins de 7 souches).

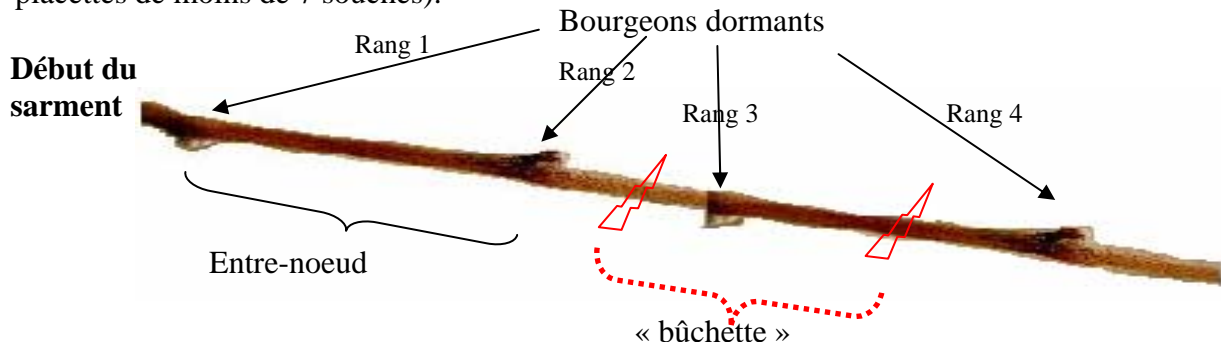


Photo 1 : *Portion de bois de l'année (=sarment)*

2.2. Séchage et stockage des échantillons

Au laboratoire, le jour du prélèvement, les « bûchettes » sont découpées au sécateur (en morceaux de 1 cm maximum) et mises à l'étuve ventilée à 70°C pendant 3 jours.

Si ce traitement ne peut avoir lieu le jour même, les échantillons sont stockés au réfrigérateur, dans leur poche ouverte, et seront traités dans les 5 jours.

Une fois secs, les échantillons sont conservés à température ambiante dans des poches plastiques fermées, jusqu'à leur broyage.

2.3. Broyage grossier des échantillons et sous-échantillonnage par « sectorisation »

La totalité de l'échantillon sec est broyée, pendant 2 minutes, dans un broyeur à couteaux de 3 lames (de marque « Thomas ») muni d'un tamis de maille 1 mm.

Un sous échantillonnage est effectué pour ne conserver que 1.5 à 2 g de matière sèche broyée. Au moyen d'un entonnoir, verser la totalité de la poudre en tas sur un plan horizontal.

Le tas ainsi obtenu est divisé en secteurs approximativement identiques d'environ 1.5 g à 2 g.

Un secteur est prélevé au hasard, et versé dans un tube de 10 mL : la poudre doit occuper au maximum 2/3 du volume total (6 à 6.5 mL), pour permettre la ré-homogénéisation ultérieure.

2.4. Microbroyage de la poudre de bois dans des tubes « Eppendorf » de 2 mL

Les analyses seront réalisées sur de petites prises d'essai (25 à 70 mg) de poudre très fine (granulométrie d'environ 10 µm). L'échantillon, en tube de 10 mL, est homogénéisé à l'aide d'un mélangeur à mouvement tridimensionnel « Bioengineering » pendant 10 minutes à la vitesse 5 (50 tours/minute). Et, après avoir éliminé la bourre avec une pince, on transvase dans un tube « Eppendorf » de 2 mL à fond rond, jusqu'au niveau de 1 mL maximum. On y ajoute 2 billes en acier inoxydable de diamètre 7 mm. L'échantillon de poudre est microbroyé avec un vibrobroyeur oscillant (« Retsch » MM200), pendant 10 minutes à la fréquence de 30 oscillations/seconde. 10 échantillons peuvent ainsi être microbroyés simultanément.

3. Extraction de l'arginine du bois de vigne

3.1. Principe

L'arginine, hydrosoluble jusqu'à 150 g L^{-1} , est extraite à l'eau.

Le dosage enzymatique de l'arginine nécessite l'élimination préalable des tannins qui inhibent les activités enzymatiques. Ils sont éliminés par adsorption sur de la poudre de polyvinylpyrrolidone (= PVPP) en phase aqueuse.

Quatre extractions sont effectuées par échantillon : deux répétitions d'environ 30 mg et 60 mg de poudre de bois dans 750 μL d'eau.

Explication : Ces deux rapports d'extraction différents (environ p mg et 2p mg dans le même volume) permettent de vérifier la linéarité de réponse de l'arginine, pour 3 raisons :

- S'assurer que la matrice de l'échantillon ne perturbe pas le signal de réponse de l'arginine,
- S'assurer que les enzymes (glutamate déshydrogénase, uréase et arginase) ne sont pas saturées par leur substrat respectif (ammonium, urée et arginine),
- Respecter les limites de concentration de la gamme d'étalonnage, car les teneurs en arginine sont très variables d'un échantillon à l'autre : elles varient en général entre 0,1 et 2,5 g kg^{-1} de bois ; donc, pour une prise d'essai initiale identique, la concentration en mg L^{-1} dans l'extrait peut varier d'un rapport 1 à 25.

3.2. Matériels et produit chimique

- Tubes de 1.2 mL spécifiques au robot : référence VWR 732-0252.
- Bouchons spécifiques aux tubes précédents : référence VWR 732-3606.
- Polisseur « Elga Purelab » fournissant de l'eau ultra pure (résistivité 18.2 M Ω cm).
- Mélangeur tridimensionnel 2L « Bioengineering » : réf. Bioblock Scientific C32297.
- Polyvinylpyrrolidone : référence Sigma P6755.

3.3. Extraction

Pour chaque échantillon de poudre de bois microbroyé, utiliser 4 tubes d'extraction, préalablement tarés au 1/10 de mg près : soit P_1 (mg).

Introduire dans les 2 premiers tubes environ 30 mg de poudre (25 à 40 mg).

Introduire dans les 2 derniers tubes environ 60 mg de poudre (50 à 70 mg).

Placer les tubes à l'étuve à 70°C, au moins 4 heures, puis dans un dessiccateur pendant au moins 15 minutes, pour les ramener à la température du laboratoire.

Les tubes contenant l'échantillon sec sont pesés exactement au 1/10 de mg près : soit P_2 (mg).

$$\text{Poids de poudre sèche} = (P_2 - P_1) \text{ mg}$$

Ajouter environ 50 mg de PVPP dans chaque tube (quantité non limitante).

Agiter à l'aide de l'agitateur « Vortex » (vitesse 3) pour faciliter la dispersion ultérieure.

Ajouter, à l'aide du robot, 750 μL d'eau ultra pure, Boucher.

Homogénéiser à l'aide de l'agitateur « Vortex » (vitesse 10), puis manuellement par retournements énergiques, pour bien disperser la poudre.

Agiter au moins 1 heure 30 avec le mélangeur tridimensionnel (vitesse 5 sur 10 = 50tr/min).

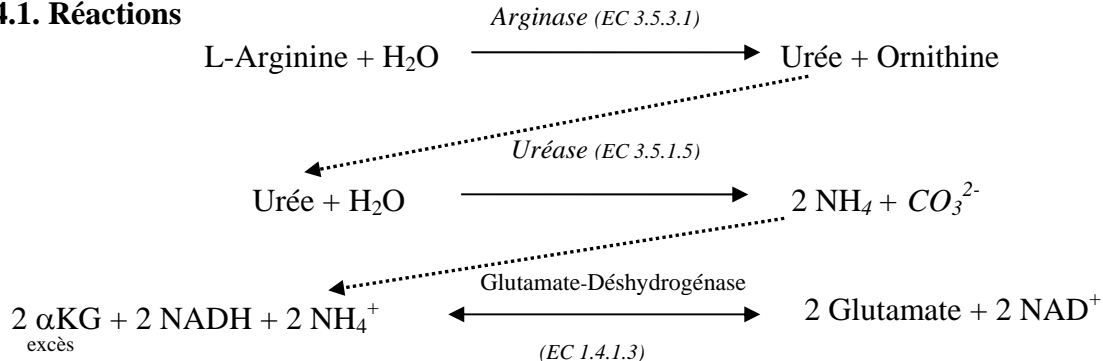
Congeler pendant au moins 3 heures (pour favoriser l'adsorption des tanins sur la PVPP).

Les tubes peuvent alors être stockés 1 mois au congélateur, jusqu'à la veille du dosage.

4. Dosage enzymatique de la (L)-Arginine

La veille du dosage, les tubes congelés contenant les échantillons sont placés au réfrigérateur.

4.1. Réactions



Un excès d' α -cétoglutarate (α -KG) déplace l'équilibre de la 3^{ème} réaction vers la droite, c'est-à-dire dans le sens de la formation de glutamate.

La quantité de NADH (= Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit) consommée dans la réaction ci-dessus est **stoechiométriquement** (=mole à mole) **proportionnelle à la quantité d'ammonium** libérée. Cette diminution de NADH est mesurée par **une chute d'absorbance à 340 nm**.

4.2. Matériels

- Polisseur « Elga Purelab » fournissant de l'eau ultra pure (résistivité 18.2 M Ω cm).
- pHmètre « Orion ».
- Balances « Mettler » : PL1200 (précise au 1/100 de g), et AG245 (au 1/10 de mg).
- Centrifugeuse « Eppendorf » 5804, équipée d'un rotor spécifique aux microplaques.
- Robot « Bio-Tek » préparateur de microplaques : réf. Bioblock Scientific 27360.
- Pointes de 200 μ L pour le robot : référence Bioblock Scientific 47509.
- Microplaques de 96 puits de 330 μ L, en polystyrène, à fond plat : réf. VWR 391-3615.
- Lecteur de microplaques El_x 800 UV/visible : réf. Bioblock Scientific 27359.

4.3. Produits chimiques

- Ampoules concentrées de tampons réf. J.T. Baker : pH 7 (4796) et pH 4 (4795).
- Triéthanolamine Hydrochlorure (TEA, HCl) : réf. Sigma T9534.
- Soude en pastilles (NaOH) : réf. J.T. Baker 0402 (fournisseur Atlantic Labo).
- L-Arginine : réf. Sigma A8094.
- Glycérol ultra-pur : réf. Panréac 141339 (fournisseur Atlantic Labo).

4.4. Substrats, cofacteurs et enzymes

- α -cétoglutarate monosodique : réf. Sigma K2010. Stocker entre 2 et 8°C au sec.
- NADH : réf. Sigma N8129. Stocker entre 2 et 8°C dans un dessiccateur.
- ADP (= Adénosine Di Phosphate) : réf. Sigma A2754. Stocker à -20°C.
- Glutamate-Déshydrogénase lyophilisée 3000 U : réf. Roche Diagnostic 197734. (EC 1.4.1.3). Stocker entre 2 et 8°C au sec.
- Uréase 500-800 U/mL en solution dans du glycérol : réf. Sigma U1875. Stocker entre 2 et 8°C.
- L-Arginase lyophilisée 12500 U : réf. Sigma A8013. Stocker à -20°C.

4.5. Remarques importantes

4.5.a. L'absorbance propre de l'échantillon à 340 nm

Lors de l'extraction, la PVPP est utilisée en quantité non limitante, mais seulement 50% à 60% des composés phénoliques contenus dans la poudre de bois sont fixés sur la PVPP.

Les composés phénoliques restant absorbent à 340 nm : c'est une **absorption non spécifique**.

4.5.b. L'ammonium endogène dans l'échantillon et dans le tampon

Il faut d'abord tenir compte de **l'ammonium initial**, présent **dans l'échantillon** de poudre de bois **et dans le tampon** (impuretés du produit chimique TEA, HCl affichées sur le flacon « Sigma » : $\text{NH}_4 < 0.05\%$). La ligne de base, avant toute réaction proprement due à l'arginine, est donc obtenue en provoquant les 2^{ème} et 3^{ème} réactions dues à l'ammonium endogène et à l'urée éventuelle, par action des enzymes glutamate-déshydrogénase et uréase.

4.5.c. L'arginine et la canavanine endogènes dans l'uréase

L'enzyme uréase contient des impuretés d'arginine et de canavanine, substrats de l'arginase. Un étalon à 0 mg L^{-1} d'arginine fait chuter la densité optique (DO) d'environ 0.040 à 0.060. La droite d'étalonnage donnant la chute de DO en fonction de la concentration en arginine, ne passe donc pas par 0 (**absorbance résiduelle**).

Par conséquent, il est primordial de mettre exactement la même quantité d'uréase dans chaque microdosage ; or, cette solution d'uréase est conservée dans du glycérol, très visqueux, difficile à prélever avec précision. Pour améliorer la « répétabilité » de prélèvement de l'uréase par le robot, au lieu de prélever 10 μL d'uréase pure, on dilue d'abord manuellement l'uréase au 1/20 dans un volume conséquent de tampon (*ex* : 1 mL d'uréase + 19 mL de tampon), puis le robot prélève une quantité suffisante (200 μL) du mélange tampon + uréase.

4.6. Traitement des extraits d'échantillons le jour du dosage

Le matin du dosage, les tubes d'extraits sont sortis du réfrigérateur, légèrement agités et laissés revenir à température ambiante (1 à 2 heures). Homogénéiser. Déboucher les tubes. Centrifuger pendant 10 minutes à 3700 tr/min. Les extraits sont alors prêts pour le dosage.

4.7. Préparation des réactifs « stocks »

4.7.a. 25 mL de NaOH environ 4 N (se conserve 1 mois entre 2 et 8°C)

Dans un bécher de 50 mL, peser 4 g de pastilles de soude et ajouter 25 mL d'eau ultra pure. Homogénéiser.

4.7.b. 150 mL de tampon TEA 0.2 M pH 8.20 (≈ 140 échant.) (se garde 1 mois entre 2 et 8°C)

Dans un bécher de 250 mL, peser 5.6 g de poudre de TEA, HCl et ajouter 130 mL d'eau ultra pure. Homogénéiser. Ajuster le pH à pH 8.20 (± 0.02) avec NaOH 4 N (environ 5 à 6 mL). Verser dans une fiole de 150 mL, et compléter au trait de jauge avec de l'eau ultra pure.

4.7.c. 150 mL de tampon TEA avec substrats et cofacteurs = solution T (≈ 140 échantillons)

La solution T se conserve 3 jours entre 2 et 8°C et à l'abri de la lumière.

Dans un bécher de 250 mL, dissoudre dans 150 mL de tampon TEA 0.2 M :

480 mg d' α -KG,
35 mg de NADH,
310 mg d'ADP,

Laisser sur la paille, à l'abri de la lumière, la quantité de solution T nécessaire pour une demi-journée d'analyse (environ 50 mL).

4.7.d. 5 mL de solution de Gl-DH (600 U/mL) (\approx 180 échantillons).

Elle se conserve 3 mois entre 2 et 8°C.

Ajouter dans le flacon «Roche Diagnostic» contenant 3000 U de poudre de Gl-DH : 3,15 g de glycérol ultra pur (densité 1.259 => 3.15 g = 2.5 mL). Homogénéiser.

Ajouter 2.5 mL d'eau ultra pure, et homogénéiser, ce qui permet d'obtenir 5 mL de solution glycérol/eau (50/50) (v/v) de Gl-DH à 600 U/mL.

Les 5 mL permettent de faire 800 à 1000 dosages (8 à 10 microplaques).

Répartir cette solution dans des tubes de 1.2 mL, à raison de 1 mL par tube.

Couper le haut du tube pour qu'il soit complètement rempli de la solution (absence d'air).

4.7.e. 16 mL de solution « stock » d'arginase (780 U/mL) (\approx 1500 échantillons).

Elle se conserve 1 an à -20°C.

Dans le flacon de lyophilisat de 12500 U d'arginase de chez Sigma (prix d'environ 1400 €), percer un petit trou, avec un cône de pipette de 200 μ L, au niveau de l'opercule du flacon.

Y ajouter délicatement (poudre très électrostatique) 16 mL de solution glycérol/eau (50/50)(v/v). Refermer le flacon et agiter énergiquement avec l'agitateur « Vortex ».

Les 16mL permettront de faire environ 6000 dosages (60 microplaques)(\approx 1200 échantillons).

La solution obtenue est répartie dans 12 tubes « Eppendorfs » de 1.5 mL : 12 fois 1.33 mL.

Chaque tube de 1.33 mL permet de doser 100 échantillons.

4.8. Préparation des réactifs de travail (voir schéma 1)

4.8.a. Environ 50 mL de solution R = solution T + uréase (à 12 U/mL) (\approx 40 échantillons)

La solution R se conserve 4 heures entre 20 et 25°C à l'abri de la lumière.

Veiller à ce que la solution R soit à température ambiante juste avant le dosage.

L'ajout d'uréase dans la solution T se fait au dernier moment, 5 à 10 minutes avant le dosage.

Ne préparer que 50 mL à la fois, pour ne faire que 2 microplaques de 96 puits.

Dans un bécher de 100 mL, mettre :- 49 mL du tampon T,

- et (600/x) mL de solution glycérolée d'uréase Sigma (à x U/mL)

où x est le nombre d'unités U par mL, affiché sur le flacon Sigma.

$$500 \text{ U/mL} \leq x \leq 800 \text{ U/mL.}$$

Homogénéiser sur un agitateur magnétique.

Le robot dépose 210 μ L de solution R dans chaque puit.

4.8.b. 4 mL de solution Gl-DH (600 U/mL) pour 7 microplaques (\approx 140 échantillons)

La solution se conserve 3 mois entre 2 et 8°C.

Il s'agit de la solution stock.

Le robot dépose 5 μ L de solution de Gl-DH dans chaque puit.

4.8.c. 7,6 mL de solution d'arginase (195 U/mL) pour 7 microplaques (\approx 140 échantillons)

La solution se conserve 1 mois entre 2 et 8°C.

Elle est préparée par dilution de la solution « stock » d'arginase à 780 U/mL au 1/4 dans de l'eau ultra pure. (Si l'arginase 780 U/mL date de plus de 6 mois, elle sera alors diluée au 1/2, pour obtenir une solution d'arginase à 390 U/mL).

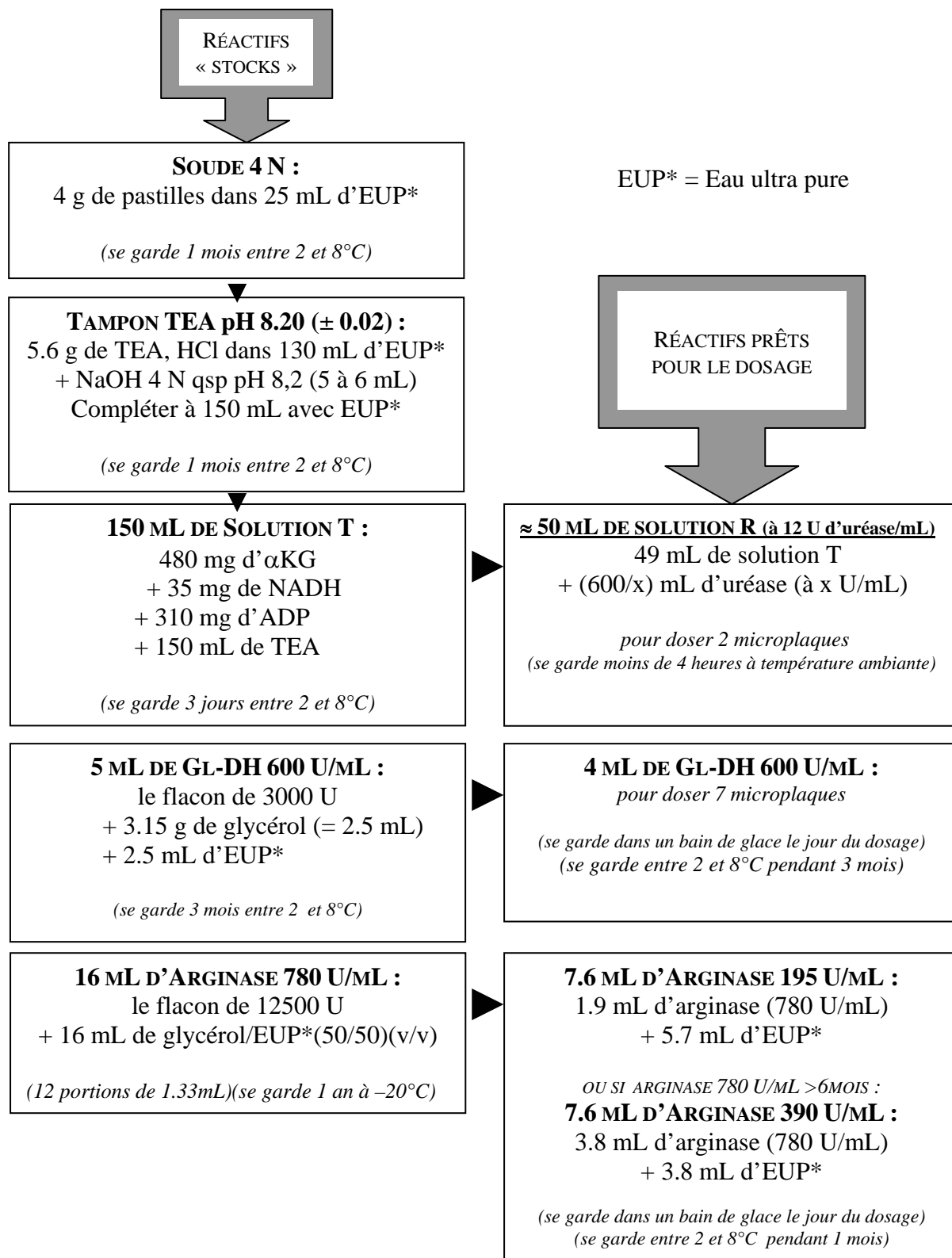
Dans un tube de 10 mL, mettre 1.9 mL d'arginase (à 780 U/mL) et 5.7 mL d'eau ultra pure.

(Si l'arginase 780 U/mL date de plus de 6 mois, mettre 3.8 mL d'arginase et 3.8 mL d'eau).

Le robot dépose 10 μ L de solution d'arginase (195 U/mL) dans chaque puit.

SCHÉMA 1 PRÉPARATION DES RÉACTIFS POUR LE DOSAGE DE 7 MICROPLAQUES

- ENVIRON 140 ÉCHANTILLONS RÉPÉTÉS 4 FOIS - durée d'analyse = 1 jour et demi



4.9. Préparation des solutions aqueuses étalons d'arginine : 150-100-50-3-0 mg L⁻¹

La poudre de L-Arginine (*réf. Sigma A8094*) est préalablement séchée (environ 100 mg) une nuit à 105°C.

Les solutions 100, 50 et 3 mg L⁻¹ sont préparées par dilutions de la solution à 150 mg L⁻¹.
Le point 3 mg L⁻¹ correspond à la limite inférieure de quantification.

- 300 mL de solution d'arginine à 150 mg L⁻¹ (*se conserve 6 mois à -20°C*)

Peser dans un verre de montre, à l'aide de la balance de précision (*Mettler AG245*), exactement 45.0 mg de poudre de L-Arginine.

Verser dans un bécher de 500 mL.

Ajouter 300.00 g d'eau ultra pure, à l'aide de la balance *Mettler PL1200*.

Homogénéiser sur agitateur magnétique.

- 150 mL de solution d'arginine à 100 mg L⁻¹ (*se conserve 6 mois à -20°C*)

Peser, dans un bécher de 250 mL, exactement 100.00 g de solution d'arginine à 150 mg L⁻¹.

Y ajouter 50.00 g d'eau ultra pure. Homogénéiser.

- 150 mL de solution d'arginine à 50 mg L⁻¹ (*se conserve 6 mois à -20°C*)

Peser, dans un bécher de 250 mL, exactement 50.00 g de solution d'arginine à 150 mg L⁻¹.

Y ajouter 100.00 g d'eau ultra pure. Homogénéiser.

- 150 mL de solution d'arginine à 3 mg L⁻¹ (*se conserve 6 mois à -20°C*)

Peser, dans un bécher de 250 mL, exactement 3.00 g de solution d'arginine à 150 mg L⁻¹.

Y ajouter 147.00 g d'eau ultra pure. Homogénéiser.

- Solution d'arginine à 0 mg L⁻¹ : Eau ultra pure.

Les étalons sont répartis, à l'aide du robot, à raison de 0.9 mL dans des tubes de 1.2 mL.

Le robot dépose 36 µL d'étalon (ou d'échantillon extrait) dans chaque puits.

	Volume par puits (µL)	Quantité par puits	Concentration par puits	
L-Arginine	36	31 nmoles max.	0,12 mM max.	
TEA, HCl	210	42 µmoles	161 mM	(U* = quantité d'enzyme formant 1 µmole de produit par minute)
α-KG		4 µmoles	16 mM	
NADH		70 nmoles	0.27 mM	
ADP		1 µmole	4 mM	
Uréase		2.40 U*	9.2 U/mL	
GI-DH		5	3.00 U*	
L-Arginase	10	1.95 U*	7.5 U/mL	
Vol.Total = 261 µL				

Tableau 2 : Volumes, quantités et concentrations molaires d'arginine, et de réactifs chimiques et enzymatiques dans chaque microdosage ou « puits »

SCHÉMA 2
RÉSUMÉ DE L'EXTRACTION ET DU MICRODOSAGE
ENZYMATIQUE ROBOTISÉ DE L'ARGININE
DANS LE BOIS DE VIGNE

SÉCHAGE DES ÉCHANTILLONS DE BOIS 3 JOURS A 70°C

BROYAGE AU BROYEUR À COUTEAUX (tamis 1 mm)

SOUS-ÉCHANTILLONNAGE PAR SECTORISATION

MICROBROYAGE (finesse $\leq 10 \mu\text{m}$)

4 extractions par échantillon (tubes tarés)
Tube n°1 Tube n°2 Tube n°3 Tube n°4
 environ 30 mg de poudre environ 60 mg de poudre
 Sécher au moins 4 heures à 70°C, puis peser précisément.

Extraction :

- Ajouter environ 50 mg de PVPP,
- Agiter légèrement (« vortex » à vitesse 3),
- Ajouter au robot 750 μL d'eau ultra-pure.
- Boucher, Homogénéiser (« vortex » à vitesse 10),
- Agiter au moins 1h30 au mélangeur tridimensionnel,
- Congeler pendant au moins 3 heures,
- Mettre au réfrigérateur la veille du dosage.

Centrifugation : 10 minutes à 3700trs/min

Dosage enzymatique du surnageant à l'aide du robot :

210 μL de solution R pH 8.20
 (TEA + NaOH + αKG + NADH + ADP + Uréase)
 + 36 μL de surnageant (ou d'étalon)
 + 5 μL de Gl-DH (à 600 U/mL)
 + 10 μL d'Arginase (à 195 U/mL)

Expression des résultats :

$$\text{Arginine (g kg}^{-1} \text{ de matière sèche à 70°C)} = \frac{\text{Arginine}_{\text{surnageant}} (\text{mg L}^{-1}) \times 0.75}{\text{Prise d'essai (mg)}}$$

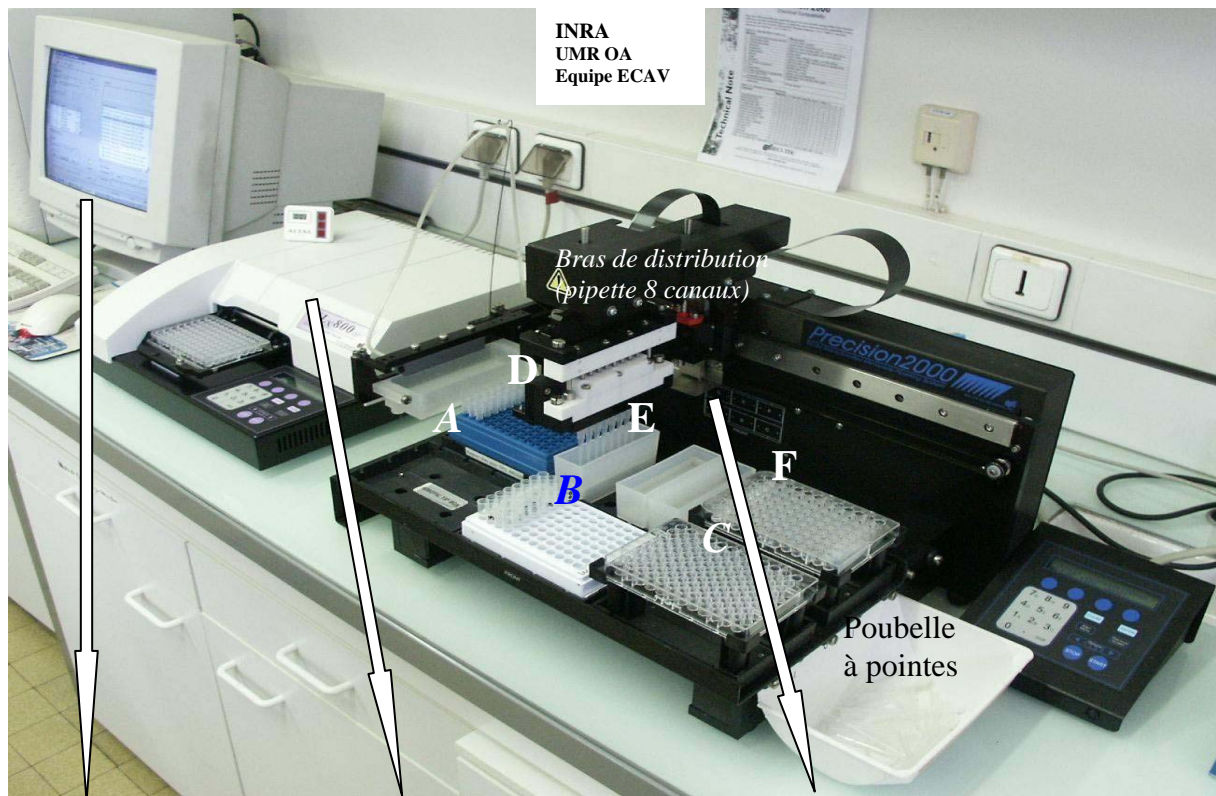
4.10. Présentation du robot « préparateur de microplaques » (photo 1)

Le microdosage robotisé consiste à préparer des microplaques de dosage à l'aide du robot, puis à lire les microplaques à l'aide du lecteur optique El_x 800 UV/visible. Le robot « Précision 2000⁺ » de la société Bio-Tek[®] Instruments (révision A) est appelé « préparateur de microplaques », car il prélève, distribue et transfère des liquides dans des microplaques (12 colonnes de 8 puits = 96 puits de capacité 330 µL). Chaque prélèvement doit être inférieur ou égal à 120 µL (capacité maximale du robot).

Un bras de distribution, coulissant dans les 3 directions permet à une pipette 8 canaux d'aspirer, de distribuer et de mélanger des liquides (par aspirations/refoulements) dans l'une des 6 « stations » interchangeables de la plateforme :

- Station A : vide.
- Station B : tubes contenant les extraits de poudre de bois et les étalons à doser.
- Station C : microplaque de 96 puits, où se font les réactions chimiques successives et le dosage final, et organisée comme dans le schéma 3.
- Station D : pointes de pipettes.
- Station E : récipients pour la solution R (capacité maximale de 4 récipients de 40 mL).
- Station F : microplaque pour les enzymes : elle contient, seulement en colonne 1, soit de la Glutamate-déshydrogénase, soit, dans une autre plaque, de l'Arginase.

Au point final de la réaction, la plaque C est déposée sur le lecteur de microplaques « El_x 800 UV/visible » (Bio-Tek[®]), pour être lue à la longueur d'onde de 340 nm, et à une vitesse de 30 secondes pour les 96 puits. Les mesures de densité optique reçues sur un terminal sont transférées sous Excel pour la gestion des données.

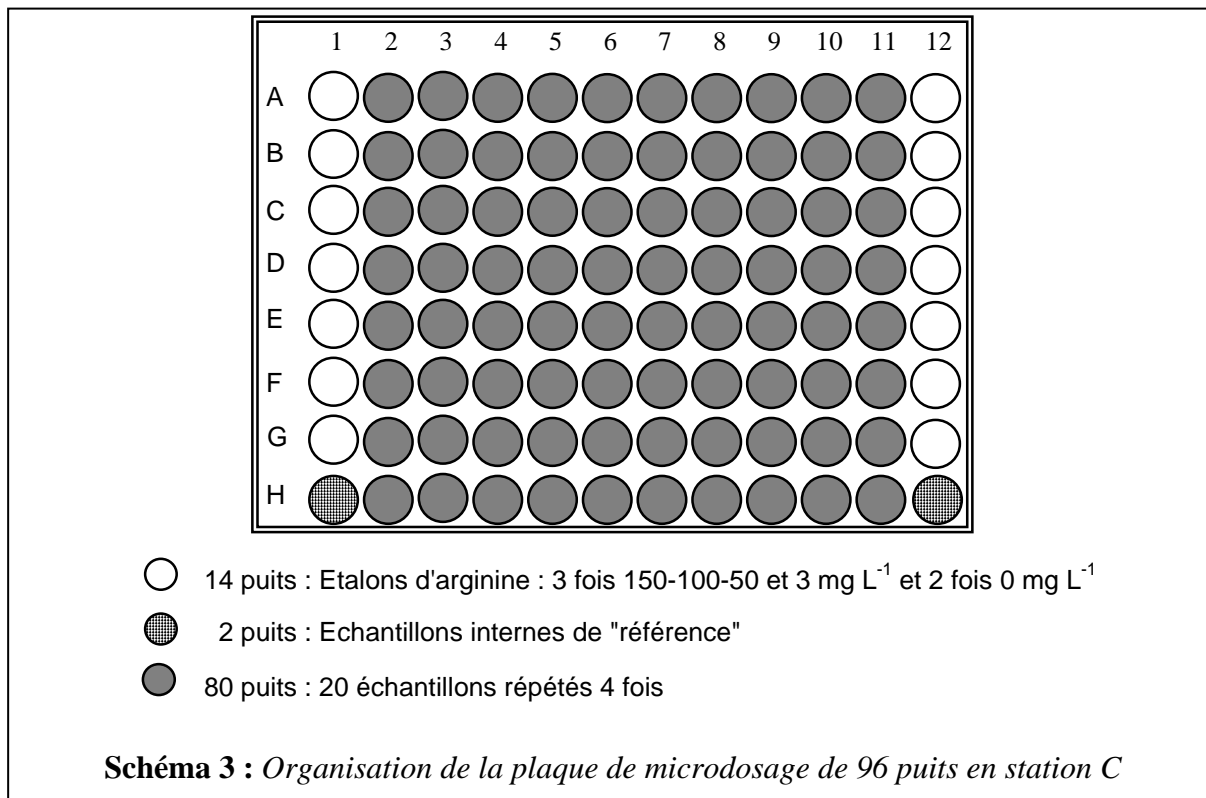


Pilotage informatisé

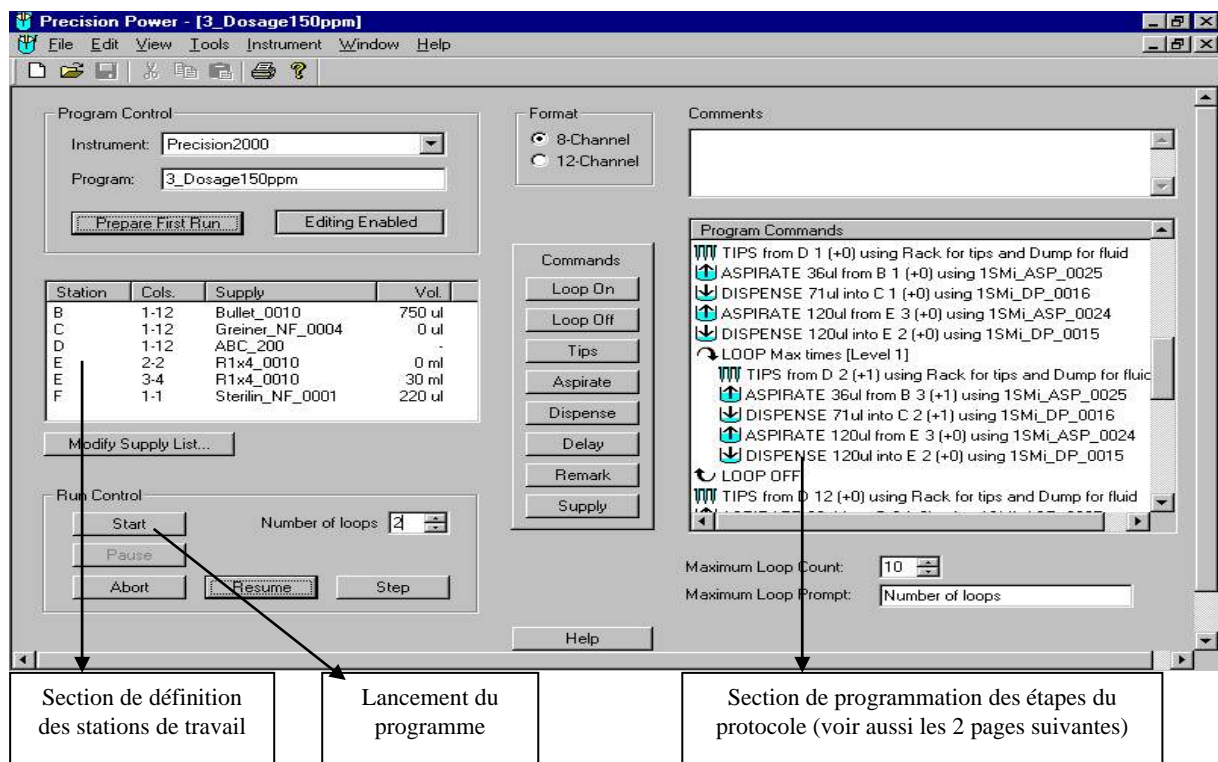
Lecteur de microplaques

Robot préparateur de microplaques

Photo 1 : Le robot préparateur de microplaques



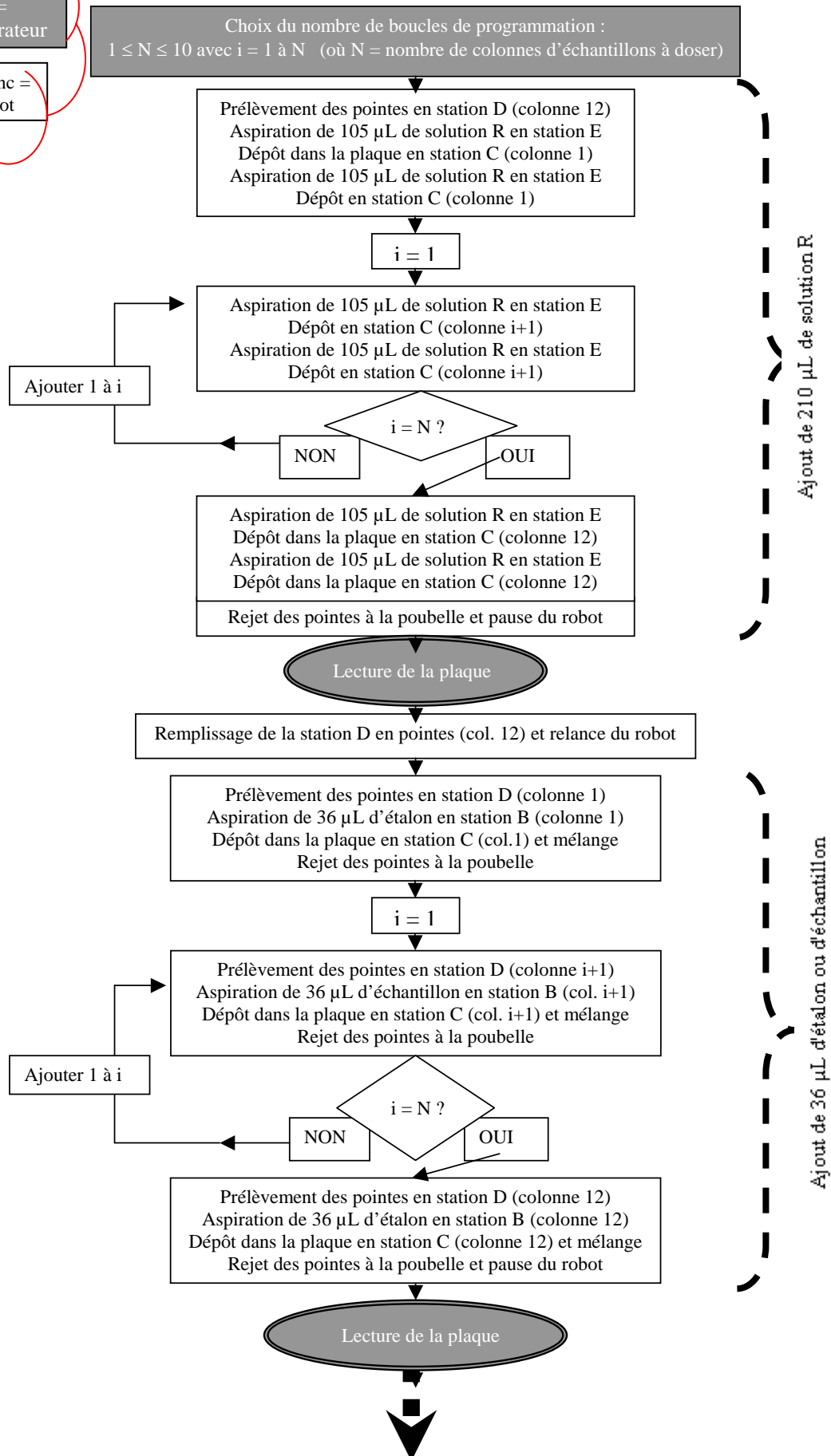
Le robot est piloté par un ordinateur disposant du logiciel « Précision Power » assurant le pilotage, la programmation, la simulation et l'exécution des protocoles (**photo 2**).



Logos sur fond grisé =
intervention de l'opérateur

Logos sur fond blanc =
intervention du robot

Schéma 4 : Déroulement du programme du robot préparateur de microplaques



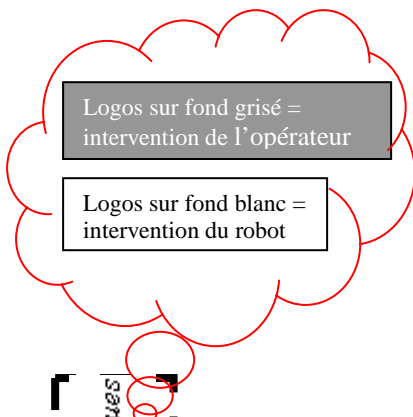
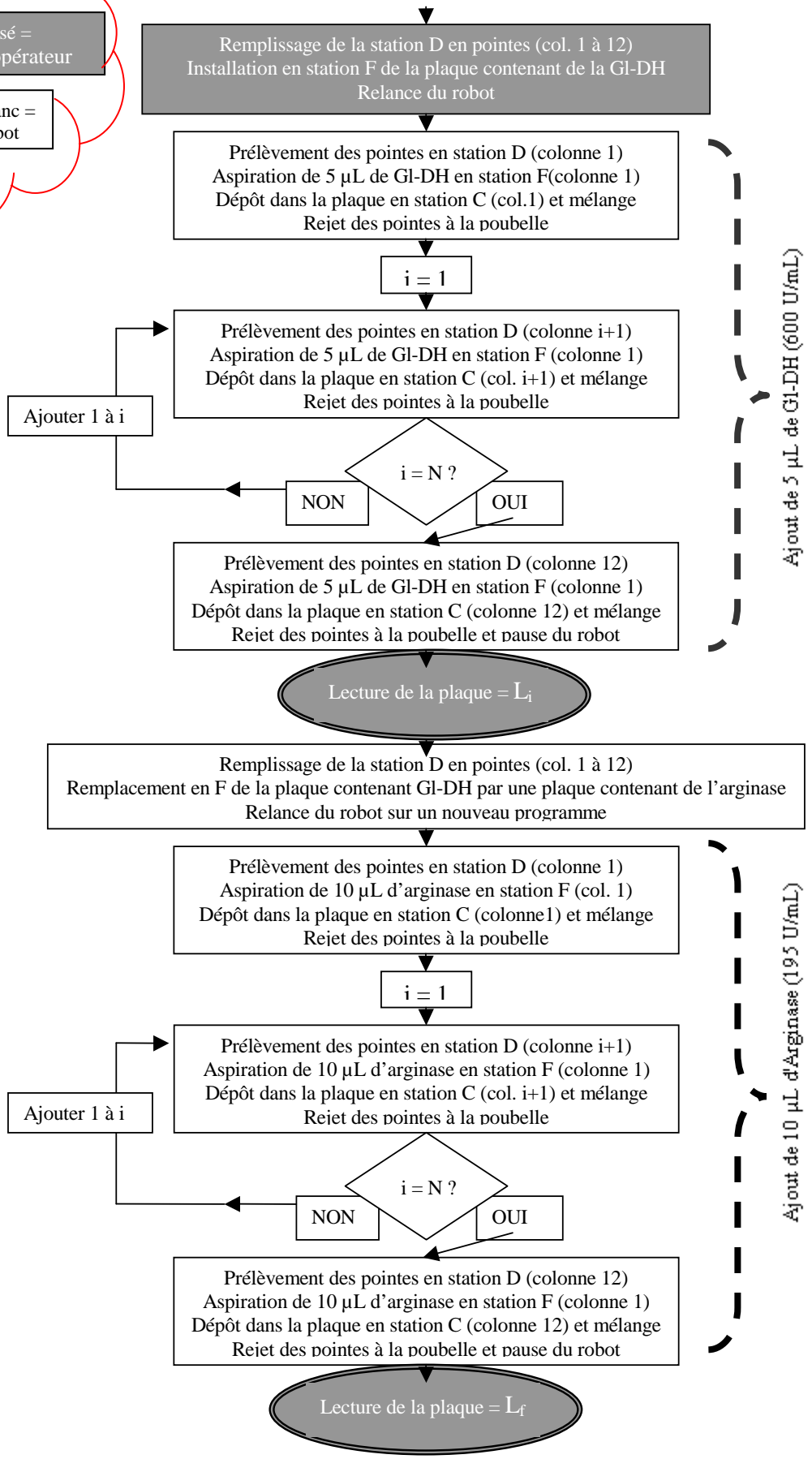


Schéma 4 suite : Déroulement du programme du robot préparateur de microplaques



4.11. Microdosage enzymatique robotisé de l'arginine (schéma 5)

- Lecture de la microplaque vide :

Les valeurs lues permettent de vérifier l'état de propreté des plaques. Elles doivent être propres et sèches : la densité optique se situe habituellement entre 0,15 et 0,18.

- Le robot ajoute 210 μL (2 fois 105 μL) de tampon R par puit :

Les valeurs lues permettent de vérifier la quantité de NADH dans le puit et la répétabilité de distribution du réactif : la densité optique se situe entre 1.30 et 1.40.

- Le robot ajoute 36 μL d'étalon ou d'échantillon par puit, et mélange :

Chaque étalon d'arginine 150-100-50 et 3 mg L^{-1} est répété 3 fois sauf le point 0 qui est répété 2 fois. L'absorbance due à l'échantillon est toujours supérieure de 0.04 à 0.05 à celle due à l'étalon.

- Le robot ajoute 5 μL de Gl-DH (600 U/mL) par puit, et mélange :

La Gl-DH réagit avec l'ammonium endogène, et l'ammonium issu de l'hydrolyse de l'urée en ammonium (si de l'urée endogène est présente). La concentration en NADH diminue, et fait décroître la densité optique à 340 nm.

Les lectures se font après 15 minutes, puis toutes les 5 minutes, jusqu'à ce que la différence de DO de tous les puits soit inférieure ou égale à 0.005 (en général 20 à 25 minutes).

La dernière lecture est appelée L_i (pour ligne de base initiale).

- Le robot ajoute 10 μL d'arginase (195 U/mL) par puit, et mélange :

La teneur en NADH diminue, et fait décroître la densité optique à 340 nm.

Les lectures se font après 25 minutes, puis toutes les 5 minutes, jusqu'à ce que la différence de DO de tous les puits soit inférieure ou égale à 0.005 (en général 30 à 35 minutes).

La dernière lecture est appelée L_f (pour lecture finale).

La différence $L_i - L_f$ est proportionnelle à la concentration en arginine.

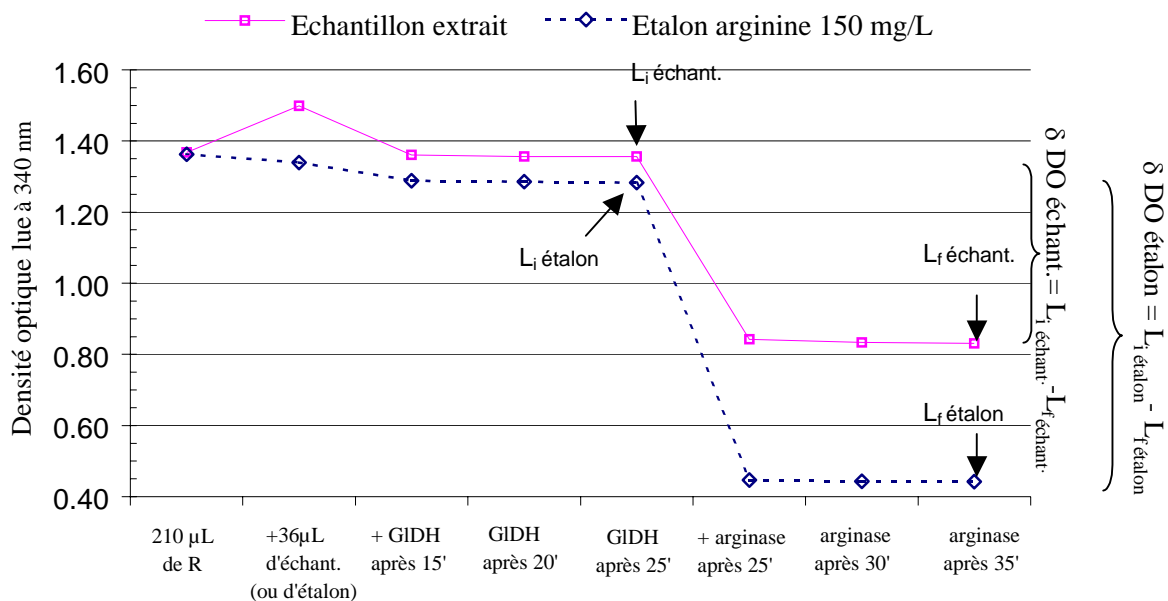


Schéma 5 : *Etapes du microdosage enzymatique robotisé de l'arginine*

L'équation de la droite d'étalonnage donne la différence (δDO) entre la densité optique (ou lecture) initiale (L_i) et la densité optique (ou lecture) finale (L_f) en fonction de la teneur en arginine (en mg L^{-1}).

Connaissant la valeur $L_i - L_f$ dans l'échantillon extrait, on peut donc en déduire sa teneur en arginine (en mg L^{-1}).

Les échantillons trop concentrés en arginine (supérieurs à la gamme d'étalonnage) sont dilués dans de l'eau ultra pure, à l'aide du robot, puis à nouveau dosés de façon à rentrer dans la gamme d'étalonnage.

Pour les échantillons trop faibles en arginine (c'est-à-dire inférieurs à la limite de quantification de 3 mg L^{-1}), la prise d'essai de poudre de bois, lors de l'extraction, sera augmentée.

4.12. Calculs et expression des résultats

$$\text{Arginine (g kg}^{-1} \text{ de matière sèche à } 70^\circ\text{C)} = \frac{\text{Arginine dans l'extrait (mg L}^{-1}) \times 0.75}{\text{Prise d'essai (mg)}}$$

4.13. Incertitude des mesures

Les 4 dosages par échantillon (2 répétitions de 2 rapports d'extraction différents) permettent de définir l'écart type moyen et donc la variabilité due à la fois à l'extraction et au dosage, garantissant ainsi une bonne interprétation du résultat.

4.14. Echantillons « internes de référence » : EI1 à EI5

Nous avons préparé au laboratoire 5 échantillons de poudre de bois en grande quantité (80 g à 100 g), de cépage, d'origine géographique et de concentration en arginine différents (entre 0.1 et 1.6 g kg^{-1}) (dosés par microdosage enzymatique robotisé).

Ils sont traités exactement comme la série d'échantillons inconnus à analyser.

En routine, ils sont régulièrement intégrés dans des séries analytiques, pour vérifier la stabilité de la méthode d'analyse dans le temps.

Ils sont aussi utilisés pour valider la méthode de microdosage enzymatique robotisé de l'arginine (cf. **chapitre 5**).

Poudre de bois de vigne	Région	Cépage(s)	Teneur moyenne en arginine (g kg^{-1} de MS à 70°C)
EI 1	Champagne	Mélange de 3 cépages	0.1
EI 2	Bourgogne	Pinot Noir	0.3
EI 3	Champagne	Mélange de 3 cépages	0.7
EI 4	Bordeaux	Sauvignon Blanc	1.1
EI 5	Bordeaux	Merlot Noir	1.6

Tableau 3 : Description des échantillons internes de référence

5. Validation statistique du microdosage enzymatique robotisé de l'arginine

La validation statistique du dosage enzymatique de l'arginine dans le bois de vigne se fait en trois étapes : tout d'abord, la caractérisation de la linéarité de réponse de plusieurs solutions synthétiques aqueuses d'arginine ; puis l'étude de la spécificité du dosage par des ajouts dosés d'arginine dans divers échantillons de bois (EI1 à EI5) ; et enfin la comparaison des résultats obtenus par une autre technique : dans notre cas, il s'agit de l'HPLC.

Les tests statistiques sont effectués selon le mode opératoire décrit dans les deux publications suivantes :

- Norme AFNOR XP T90-210 : « Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence ». **1999**.

- Feinberg : « La validation des méthodes d'analyse ». Cah.Tech. INRA, **2000**, **44**,19-49.

5.1. Critères de linéarité (arginine : 0-50-100-150 mg L⁻¹)

Pour vérifier le domaine de linéarité, 4 niveaux de concentration en arginine, **régulièrement répartis** (suppression du point 3 mg L⁻¹), sont dosés et **répétés 5 fois** : 20 solutions synthétiques aqueuses sont **préparées indépendamment et à différents moments**, pour éviter tout biais systématique. Les étalons sont préparés uniquement par pesées de poudre de (L)-arginine (préalablement séchée à 105°C) et d'eau ultra pure.

Les données expérimentales (tableau 4) et la courbe d'étalonnage (figure 1) représentent la différence (δDO) entre la DO ou lecture initiale (L_i) et la DO ou lecture finale (L_f), en fonction de la teneur en arginine (en mg L⁻¹).

La courbe ne passe pas par 0, ce qui est expliqué par la présence dans l'uréase d'impuretés endogènes (arginine et canavanine), substrats de l'arginase (voir paragraphe 4.5.c).

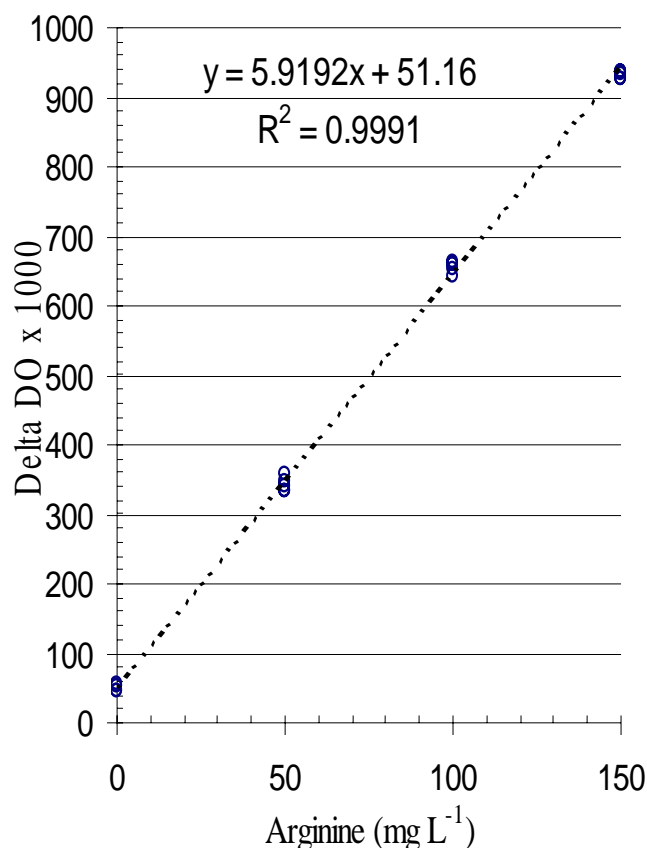


Figure 1 : Droite d'étalonnage.

Arginine (mg L ⁻¹)	0	50	100	150
$\delta DO * 1000$ $= (L_i - L_f) * 1000$	46	357	663	938
	52	348	659	935
	55	342	661	937
	45	333	642	926
	52	334	651	926
δDO moyenne	50	343	655	932
2.776 éc-type moy	5	12	11	7

2,776= t de la table de Student pour 4 degrés de liberté (test bilatéral et P=95%)

Tableau 4 : Données expérimentales

5.1.a. Acceptation du modèle de régression (tableau 5)

Le calcul de la valeur F de la régression donne : $F = \text{variance de la régression} / \text{variance de l'erreur résiduelle} = 2189808/57 = 38133$. Comme elle est très supérieure aux valeurs de F données dans la table de Fisher, **la régression est hautement significative**.

Source de variation	Somme des carrés des écarts	degrés de liberté	Variance = SCE/ddl	F calculé	Risque d'erreur α	Conclusion
Régression	2189808	1	2189808	38133		Régression hautement significative
Erreur au modèle	1055	2	527	9.186	0.22%	Domaine linéaire de 0 à 150 mg L ⁻¹
Erreur résiduelle	919	16	57			
Erreur totale	2191782	19				

Tableau 5 : Test statistique de linéarité

5.1.b. Acceptation du domaine d'étalonnage (tableau 5)

Le calcul de la valeur F de l'erreur au modèle permet de tester la linéarité de la réponse :

$$F = \text{variance de la régression} / \text{variance de l'erreur au modèle} = 2189808/527 = 9.186.$$

La loi de Fisher associée à cette valeur de F, et pour 2 et 16 degrés de liberté, le risque d'erreur de 0.22%. Donc, il y a 978 chances sur 1000 pour que la **régression soit linéaire entre 0 et 150 mg L⁻¹**.

5.1.c. Variabilité de la réponse et étude de ses causes de variation (tableau 6)

Il est logique que le coefficient de variation diminue avec la teneur en arginine. La valeur moyenne des trois coefficients de variation, hormis le 0, est 1.8%.

Les trois principales causes de variation du dosage de l'arginine sont :

- l'erreur sur la pesée : deux pesées (arginine + eau) : l'erreur totale est estimée à 2%,
- l'erreur de prélèvement sur la prise d'essai de 36 μL d'étalon par le robot : elle est mesurée par pesées de 24 prises d'essai : l'erreur moyenne est inférieure à 1%,
- la précision propre de la détection par le lecteur de plaques, donnée par le constructeur : elle est de 1% ; les 2 lectures L_i et L_f engendrent donc une erreur de 2%.

La somme de ces trois erreurs est 5%, ce qui est supérieure à la variabilité observée (1.8%). Les causes de variation de la réponse de l'arginine sont donc explicables et non maîtrisables : elles sont inhérentes aux caractéristiques techniques des matériels utilisés (**bias instrumental**).

Arginine (mg L ⁻¹)	Arginine estimée moyenne (mg L ⁻¹)	Ecart type estimé (mg L ⁻¹)	Coefficient de variation (%)
0	-0.2	0.7	
50	49.3	1.7	3.4
100	102.1	1.5	1.4
150	148.9	1.0	0.7

Tableau 6 : Variabilité des mesures

5.1.d. Problème des limites de quantification et de détection

La limite de quantification est la plus petite concentration de l'analyte pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable, et la limite de détection est la plus petite concentration de l'analyte pouvant être détectée, mais non quantifiée.

L'étude de linéarité calcule les valeurs des limites de quantification en fonction de la valeur du blanc (valeur nulle pour 0 mg L⁻¹ d'arginine). Or, dans notre cas, le point à 0 mg L⁻¹ donne une densité optique résiduelle non négligeable, donc le calcul est biaisé.

Une autre méthode consiste à vérifier **une limite de quantification choisie a priori**.

5.1.e. Vérification d'une limite de quantification choisie (tableaux 6, 7 et 8)

La valeur 3 mg L⁻¹ est choisie *a priori*, car elle représente 3 fois l'écart type estimé du blanc (dans le tableau 6, on a $3 \times 0.7 = 2.1$ qui est inférieur à 3). Une solution d'arginine à 3 mg L⁻¹ est préparée, puis dosée 10 fois de suite dans des conditions de répétabilité (tableau 7). Il faut alors respecter 2 critères :

- critère de justesse : la valeur moyenne mesurée dans le tableau 7 (pour n=10 répétitions) ne doit pas être différente de 3 mg L⁻¹ : il faut que la valeur obtenue par le calcul soit inférieure à la valeur critique (tableau 8)
- critère de fidélité : il faut s'assurer que la valeur 0 n'est pas acceptable comme limite de quantification : cela revient à vérifier que le coefficient de variation, calculé par rapport à la limite de quantification, est inférieur à 20% (valeur critique) (tableau 8).

Obéissant aux 2 critères précédents, **la limite de quantification de 3 mg L⁻¹ est jugée acceptable**.

N° répétition	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Moyenne
δDO lue x 1000	73	67	64	69	69	66	66	73	71	74	69
Arginine calculée (mg L ⁻¹)	3.69	2.68	2.17	3.01	3.01	2.51	2.51	3.69	3.35	3.86	3.05
Ecart-type (mg L ⁻¹)											0.58

Tableau 7 : Données expérimentales (arginine 3 mg L⁻¹ dosée 10 fois de suite)

	Valeur obtenue	Valeur critique	Conclusion
Critère de justesse	$(3.05-3.00) \times \text{racine}(10)/0.58 = 0.27$	10	Valeur 3 mg L ⁻¹ juste
Critère de fidélité	$CV = 0.58 \times 100 / 3 = 19.4\%$	20%	Lim. de quantification > 0
Limite de quantification choisie	3		Limite de quantification 3 mg L ⁻¹ acceptée

Tableau 8 : Vérification de la limite de quantification

5.1.f. La limite de détection est égale au tiers de la limite de quantification (voir la publication AFNOR XP T90-210, page 18). Elle est donc de 1 mg L⁻¹.

5.2. Critères de spécificité

Une méthode est dite spécifique quand le signal mesuré sur l'échantillon provient uniquement du composé à doser. La spécificité est évaluée **en recherchant un quelconque effet de matrice non significatif grâce à la méthode des ajouts dosés.**

5.2.a. Mode opératoire (voir schéma 6 puis tableau page suivante)

Pour les **5 échantillons internes (EI1 à EI5)**, on réalise **2 rapports d'extraction différents** : p mg et 2p mg dans le même volume. Comme la prise d'essai lors du dosage (36 μL) est identique, l'effet de la matrice échantillon varie du simple au double, respectivement pour le 1^{er} et le 2^{ème} rapport d'extraction. On a donc $5 \times 2 = 10$ échantillons différents.

Pour chaque rapport d'extraction : de la poudre de PVPP est ajoutée en quantité non limitante, puis, soit 20 mL d'eau ultra pure (=avant ajout), soit 20 mL de solution aqueuse synthétique d'arginine (=après ajout).

Pour que la quantité d'arginine ajoutée dans l'échantillon soit du même ordre de grandeur que celle dans l'échantillon lui-même, on prépare 4 solutions aqueuses d'arginine de concentration théorique : 12.5-25-40-50 mg L^{-1} , que l'on dose précisément, et les concentrations lues sont portées dans le tableau 9 : 12.8-25.6-38.6-51.8 mg L^{-1} .

Chaque extrait est dosé trois fois de suite ; les moyennes sont présentées dans le tableau 9. Les valeurs aberrantes sont éliminées. On réalise donc au total $3 \times 2 \times 5 = 60$ mesures.

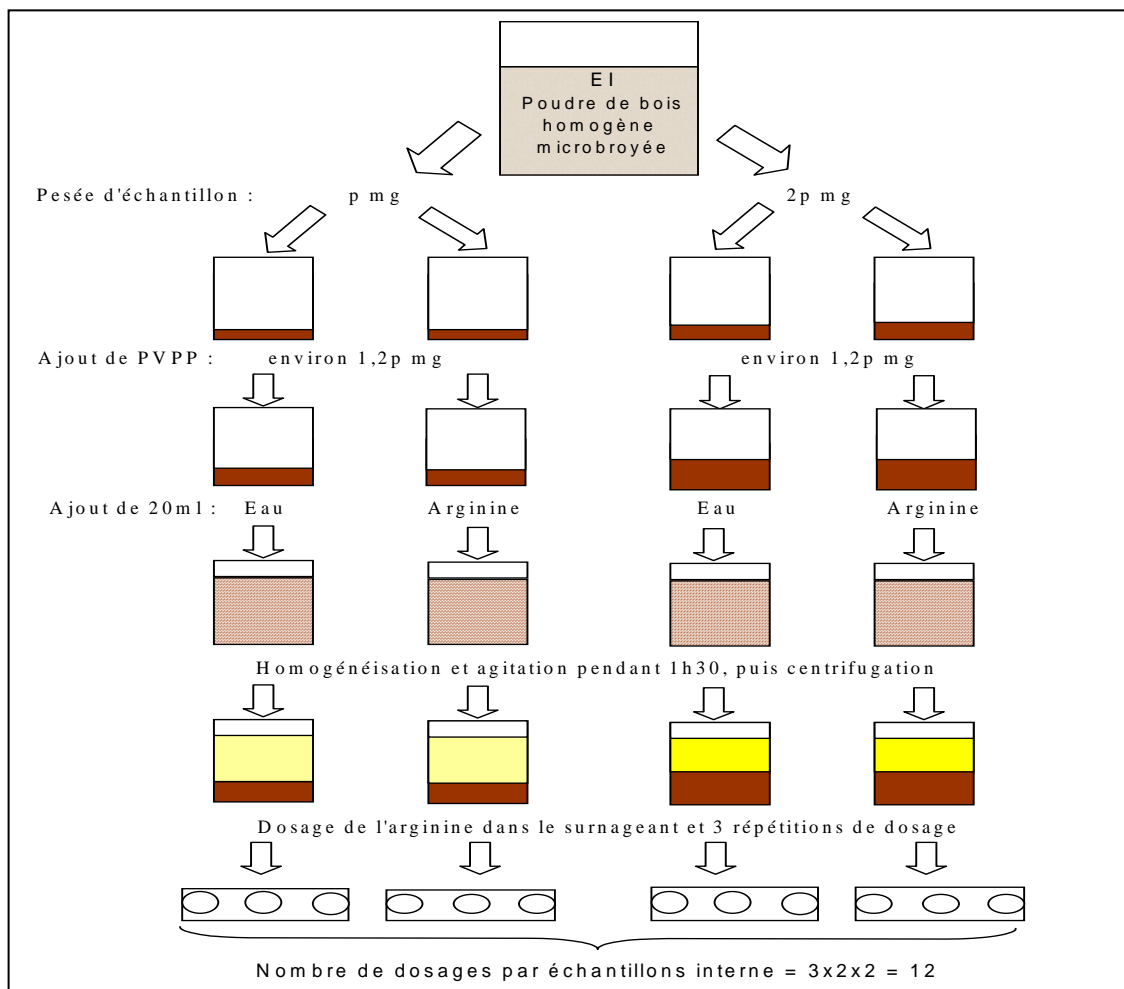
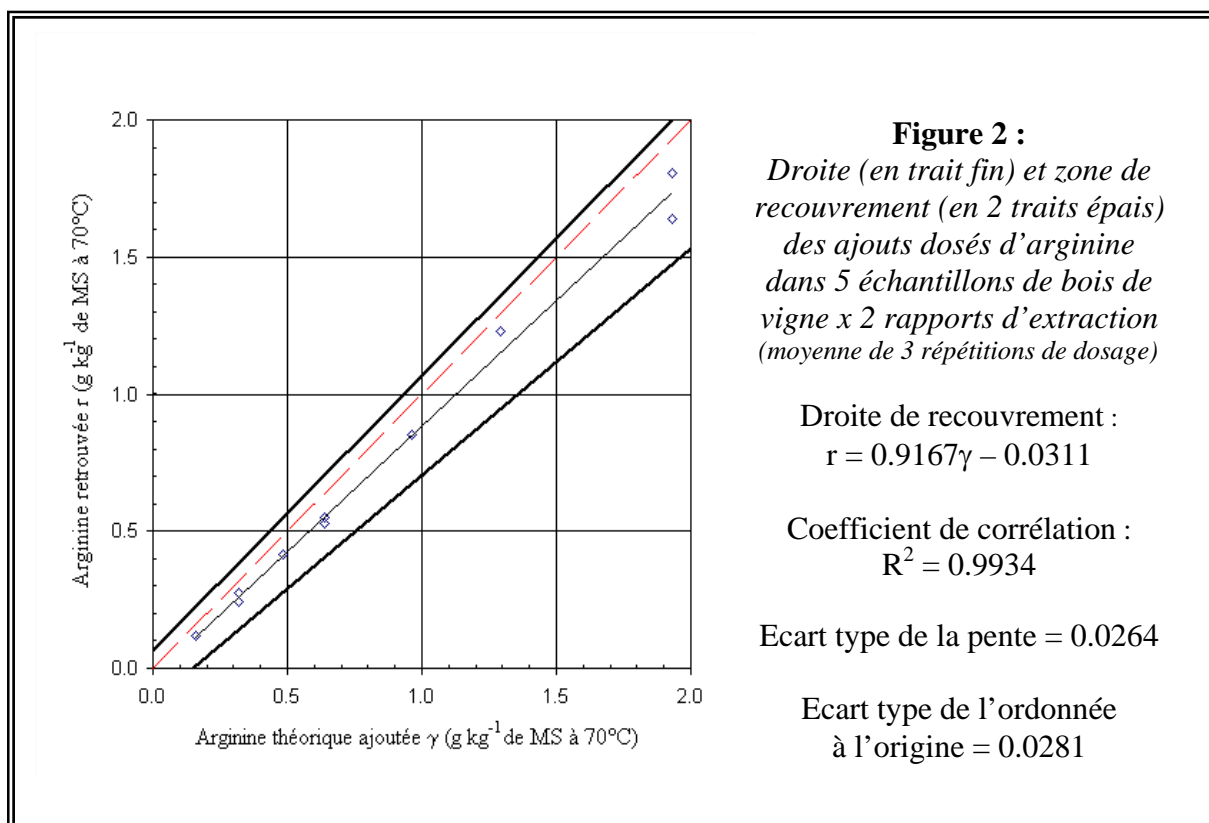


Schéma 6 : Organisation des ajouts dosés pour chacun des 5 échantillons internes (EI1 à EI5)

Echantillon interne		EI 1		EI 2		EI 3		EI 4		EI 5	
Région		Champagne		Bourgogne		Champagne		Bordeaux		Bordeaux	
N° échantillon		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Extraction	mg de poudre de bois dans 20 mL d'eau ou d'ajout	800	1600	800	1600	400	800	400	800	400	800
	g de poudre de bois par litre d'extrait	40	80	40	80	20	40	20	40	20	40
Arginine dans l'extrait (mg L ⁻¹)	avant ajout	5.65	9.56	13.30	22.16	14.73	27.39	23.89	44.17	32.52	60.24
	théorique ajouté	12.80	12.80	12.80	38.60	12.80	25.60	38.60	51.80	38.60	38.60
	après ajout	15.28	19.13	24.36	55.29	25.68	48.52	59.97	93.26	65.25	94.42
	retrouvé	9.63	9.58	11.06	33.12	10.95	21.13	36.07	49.09	32.73	34.18
Arginine dans le bois (g kg ⁻¹ de MS à 70°C)	avant ajout	0.141	0.119	0.332	0.277	0.736	0.685	1.195	1.104	1.626	1.506
	théorique ajouté (γ)	0.320	0.160	0.320	0.483	0.640	0.640	1.930	1.295	1.930	0.965
	après ajout	0.382	0.239	0.609	0.691	1.284	1.213	2.998	2.332	3.263	2.360
	retrouvé ®	0.241	0.120	0.277	0.414	0.548	0.528	1.804	1.227	1.636	0.854
Taux de recouvrement = rapport r/γ (%)		75.2	74.8	86.4	85.8	85.6	82.6	93.5	94.8	84.8	88.5

Tableau 9 : Données expérimentales sur les ajouts dosés (moyenne de 3 mesures)



5.2.b. Résultats et interprétations (tableau 9 et figure 2)

Sur la figure 2, sont représentées :

- la bissectrice (en tiret) : $r = \gamma$, vers laquelle la droite de recouvrement des ajouts dosés devrait tendre,
- la droite de recouvrement de la quantité moyenne ($n=3$) d'arginine retrouvée dans la poudre de bois en fonction de la quantité d'arginine théorique attendue,
- les deux droites en gras, définissant l'intervalle de confiance de la droite de recouvrement : cette zone de recouvrement est calculée à l'aide de l'écart type de la pente, de l'écart type de l'ordonnée à l'origine, et de la valeur t la table de Student (pour $10-2=8$ degrés de liberté et un niveau de risque bilatéral $\alpha=1\% \Rightarrow t=3.355$).

Valeur de la pente de la droite = 0.9167 ; Ecart type de la pente = 0.0264 :

$0.9167 - (3.355 \times 0.0264) = 0.8281$, et $0.9167 + (3.355 \times 0.0264) = 1.0053$.

Donc, l'intervalle de confiance de la pente est : $0.8281 \leq \text{pente} \leq 1.0053$,

1 est compris dans cet intervalle, donc la pente est équivalente à 1.

Valeur de l'ordonnée à l'origine = -0.0311 ; Ecart type de l'ordonnée à l'origine = 0.0281 :

$-0.0311 - (3.355 \times 0.0281) = -0.1254$, et $-0.0311 + (3.355 \times 0.0281) = 0.0633$.

Donc, l'intervalle de confiance de l'ordonnée à l'origine est compris entre -0.1254 et 0.0633,

0 est compris dans cet intervalle, donc l'ordonnée à l'origine est équivalente à 0. La spécificité du dosage enzymatique de l'arginine est donc statistiquement acceptable.

5.3. Comparaison de la méthode enzymatique par rapport à la méthode HPLC

L'objectif est de comparer la répétabilité intra méthode puis inter méthode et la justesse de la méthode enzymatique par rapport à la méthode HPLC prise comme « référence ».

L'étude statistique de la variabilité des mesures pour chaque méthode est effectuée, puis suivie d'une comparaison de la **précision** de chaque méthode ; enfin la **justesse** des résultats sera estimée par l'étroitesse de l'accord entre la valeur obtenue par la méthode enzymatique et celle dite de « référence ».

Le principe de la méthode de « référence » AccQ Tag de Waters est décrit au paragraphe 1.1.

5.3.a. Préparation des réactifs pour le dosage HPLC

- Préparation des solvants **A** et **B** :

- **Solvant A** : Tampon acétate de sodium 140 mM pH 5.70. Peser :

38 g d'acétate de sodium trihydraté (Sigma Ultra réf. S-7670)

1.4 g de triéthylamine (Sigma Ultra réf. T-0886)

2 mL d'EDTA à 1 mg/mL

Amener exactement à pH 5.70 avec une solution aqueuse de H_3PO_4 au 1/2 (v/v) (≈ 4 mL). Compléter à 2 litres avec de l'eau ultra pure. Filtrer.

- **Solvant B** : Acétonitrile à 60% (v/v) . Peser :

468 g (= 600 mL) d'acétonitrile « ultra-gradient HPLC grade » (réf. JT Baker 9017)

400 g (= 400 mL) d'eau ultra pure.

- Reconstitution du réactif de dérivation (stable 1 semaine).

Peser : 5.3 mg d'AccQ de chez Waters. Ajouter 1 mL d'acétonitrile (réf. Fluka 00709). Homogénéiser. Chauffer 10 minutes à 55°C. Plonger 5 minutes dans un bain à ultrasons, pour améliorer la solubilisation.

- Préparation du tampon de dérivation :

Borate de sodium saturé 0.2 M pH 8.8 (Sigma S-9640) + EDTA (Na₂) 5 mM (Sigma E-5134). Peser 7.6 g de borate de sodium et 186 mg d'EDTA. Ajouter 100 mL d'eau. Homogénéiser.

5.3.b. Calibration externe : acides aminés 50 µM (dont arginine 8.71 mg L⁻¹)

La standardisation se fait par injection de 20 µL de 20 picomoles des 21 acides aminés principaux. La solution standard est obtenue à partir de :

- **solution 1** : dilution aqueuse au 1/25 du standard Sigma AAS18 contenant 18 acides aminés à 2,5 mM (sauf la cystine à 1.25 mM),

- **solution 2** : Asparagine (réf Sigma A-0884), Glutamine (réf. Sigma G-3126) et acide γ-amino-n- butyrique (réf. Sigma A-2129) aux concentrations de 0.1 mM.

Les 2 solutions sont alors mélangées volume à volume, pour obtenir une concentration finale en acides aminés de 50 µM.

Ce mélange, contenant 500 picomoles dans 10 µL, est dérivé avant analyse.

5.3.c. Dérivation des échantillons (ou étalons) à analyser

Mélanger : 10 µL d'échantillon (ou de standard) et 70 µL du tampon de dérivation.

Agiter à l'agitateur « Vortex ».

Ajouter 20 µL de réactif AccQ et agiter immédiatement au « Vortex ».

Chauffer 10 minutes à 55°C (dans un bain à sec).

Cette dérivation est ensuite diluée au 1/5 par ajout de 400 µL d'eau ultra pure.

20 µL de réactif AccQ contiennent 200 nanomoles. Il faut respecter un rapport réactif/acides aminés de 4/1. Donc on dérivera au maximum 50 nanomoles d'acides aminés.

5.3.d. Comparaison des deux méthodes sur 10 échantillons

On utilisera les échantillons extraits lors des ajouts dosés mentionnés dans le paragraphe 5.2 (mais sans l'ajout) : **5 échantillons EI x 2 rapports d'extraction différents = 10 extraits, et 3 répétitions successives des mêmes extraits de dosage** sont effectuées par les 2 méthodes. Les résultats expérimentaux sont portés dans le tableau 10, en mg L⁻¹ dans l'extrait et en g kg⁻¹ de matière sèche à 70°C dans la poudre de bois.

La **figure 3** compare les résultats du dosage HPLC par rapport à ceux du microdosage enzymatique robotisé de l'arginine ; les barres d'erreur sont établies pour une probabilité de 95%, et sur 3 dosages successifs du même extrait.

METHODE ENZYMATIQUE												
N°	Arginine en mg L ⁻¹ dans l'extrait					(Arginine en g kg ⁻¹ de MS à 70°C dans la poudre de bois)						
	Répétitions			Moyenne	Ecart type	Répétitions			Moyenne m	Ecart type σ	Variance	
	1	2	3			1	2	3				
EI1	1	5.81	5.98	5.15	5.65	0.44	0.145	0.149	0.129	0.141	0.011	0.00012
	2	9.61	9.61	9.45	9.56	0.10	0.120	0.120	0.118	0.119	0.001	0.00000
EI2	3	11.10	13.08	15.72	13.30	2.32	0.277	0.327	0.393	0.332	0.058	0.00336
	4	23.00	21.66	21.83	22.16	0.73	0.288	0.271	0.273	0.277	0.009	0.00008
EI3	5	14.07	16.22	13.90	14.73	1.29	0.703	0.811	0.695	0.736	0.064	0.00416
	6	27.61	27.61	26.95	27.39	0.38	0.690	0.690	0.674	0.685	0.010	0.00009
EI4	7	24.14	23.65		23.89	0.35	1.207	1.182		1.195	0.018	0.00031
	8	44.61	44.78	43.13	44.17	0.91	1.115	1.119	1.078	1.104	0.023	0.00052
EI5	9	32.07	31.50	34.00	32.52	1.31	1.603	1.575	1.700	1.626	0.066	0.00430
	10	59.80	60.79	60.13	60.24	0.50	1.495	1.520	1.503	1.506	0.013	0.00016

METHODE HPLC												Différence des 2 moyennes	
N°	Arginine en mg L ⁻¹ dans l'extrait					(Arginine en g kg ⁻¹ de MS à 70°C dans la poudre de bois)							
	Répétitions			Moyenne	Ecart type	Répétitions			Moyenne m'	Ecart type	Variance		
	1	2	3			1	2	3					
EI1	1	5.00	4.58	5.13	4.90	0.29	0.125	0.115	0.128	0.123	0.007	0.00005	0.019
	2	7.71	7.01	7.79	7.50	0.43	0.096	0.088	0.097	0.094	0.005	0.00003	0.026
EI2	3	10.93	10.55	10.24	10.57	0.35	0.273	0.264	0.256	0.264	0.009	0.00007	0.068
	4	21.27	20.61	21.99	21.29	0.69	0.266	0.258	0.275	0.266	0.009	0.00007	0.011
EI3	5	12.13	12.59	12.86	12.53	0.37	0.607	0.630	0.643	0.626	0.018	0.00034	0.110
	6	22.80	23.58	23.83	23.40	0.54	0.570	0.590	0.596	0.585	0.013	0.00018	0.100
EI4	7	22.55	23.24	22.48	22.76	0.42	1.128	1.162	1.124	1.138	0.021	0.00044	0.057
	8	43.74	44.56	45.01	44.44	0.64	1.094	1.114	1.125	1.111	0.016	0.00026	-0.007
EI5	9		28.24	27.46	27.85	0.55		1.412	1.373	1.393	0.028	0.00076	0.234
	10	51.27	53.52		52.40	1.59	1.282	1.338		1.310	0.040	0.00158	0.196

Tableau 10 : Données expérimentales pour la comparaison des deux méthodes

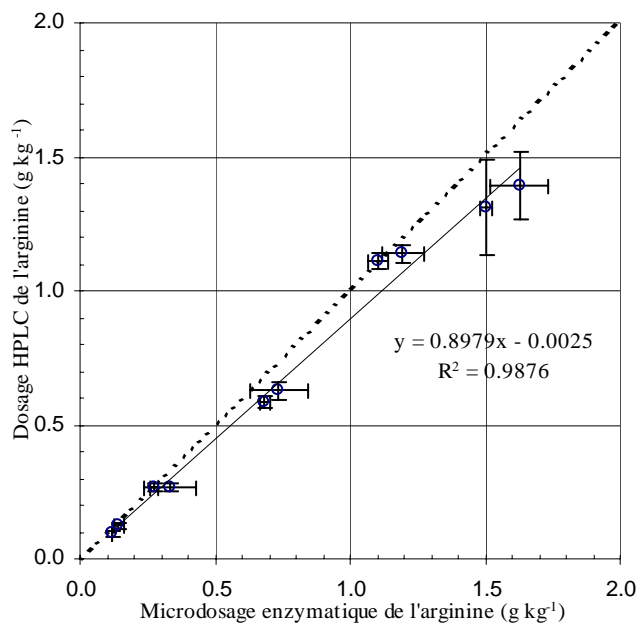


Figure 3 : Comparaison de 2 méthodes de dosage de l'arginine dans le bois de vigne

5.3.e. Etude statistique de la variabilité de chaque méthode (tableau 11)

La valeur calculée par le test de Cochran est égale au rapport de la variance maximale sur la somme des variances (variances calculées dans le tableau 10 de la page précédente).

❑ Pour la méthode enzymatique, elle est donc égale à $0.0043/0.0131=0.328$, ce qui est inférieur à la valeur critique de la table de Cochran (0.536) au niveau de risque $\alpha=1\%$.

❑ Pour la méthode HPLC, elle est égale à $0.00158/0.00378 = 0.418$, ce qui est inférieur à la valeur critique de la table de Cochran (0.536) au niveau de risque $\alpha=1\%$.

On peut donc dire que **la répétabilité de chaque méthode est constante**.

		Valeur obtenue	Valeur critique avec $\alpha = 1\%$	Conclusion
Méthode enzymatique	Variance maximale	0.0043		répétabilité acceptable
	Test de Cochran	0.328	0.536	
Méthode HPLC	Variance maximale	0.0016		répétabilité acceptable
	Test de Cochran	0.418	0.536	

Tableau 11 : Test statistique de vérification de la stabilité de chaque méthode

5.3.f. Comparaison statistique des variances de répétabilité (tableau 12)

Cette comparaison permet de dire si l'une des méthodes est plus précise que l'autre.

On compare le rapport des variances de répétabilité des 2 méthodes par rapport à l'intervalle défini par les valeurs théoriques F_{enzymo} et F_{HPLC} de la table de Fisher pour respectivement 29 et 28 degrés de liberté et au risque $\alpha=1\%$.

Dans le tableau 12, le calcul du rapport des variances de répétabilité donne 4.68 : il est supérieur à F_{enzymo} (=0.37) et F_{HPLC} (=2.69), donc on peut dire que la méthode HPLC donne des résultats significativement plus précis que la méthode enzymatique, **à nombre égal de répétitions : l'HPLC est $0.037/0.017 \approx 2$ fois plus précis que la méthode enzymatique.**

	SCE	Nombre d'échant.	Nb de mesures	Ecarttype (g kg^{-1})	Variance de répétabilité	Valeur critique avec $\alpha=1\%$
Répétabilité de la méthode enzymatique	0.026	10	29	0.037	0.00136	
Répétabilité de la méthode HPLC	0.005	10	28	0.017	0.00029	
Rapport des variances					4.68	$F_{\text{enzymo}}=0.37$ $F_{\text{HPLC}}=2.69$

Tableau 12 : Test statistique de comparaison des variances de répétabilité.

En routine, le dosage HPLC est répété une seule fois car seulement 12 échantillons sont analysables par jour. Par contre, **le microdosage enzymatique robotisé peut être répété plusieurs fois**, car environ 5 microplaques (ou 500 microdosages) peuvent être dosées quotidiennement. **Le choix de faire en routine 4 extractions du même échantillon (2 fois 2 rapports d'extraction différents)** est un compromis entre la précision du résultat et le prix de revient de l'analyse. Un intervalle de confiance peut ainsi être défini et améliorer la précision du résultat.

5.3.g. Justesse des résultats (tableau 13)

On calcule le rapport entre la moyenne des différences entre les 2 méthodes (0.081), et l'écart type de cette différence (0.080).

Ce rapport est égal à 1.013, donc inférieur à la valeur critique de 3 (voir la publication AFNOR XP T90-210, page 26). On peut donc dire que les résultats obtenus par la méthode enzymatique sont **statistiquement justes** par rapport à ceux obtenus par l'HPLC, au seuil de risque de 1%.

Justesse	Valeur obtenue	Valeur critique avec $\alpha=1\%$	Conclusion
Moyenne des différences (= moy.)	0.081		
Ecart type des différences (= s)	0.080		
Test d'égalité (=moy./s)	1.013	3	Acceptable

Tableau 13 : Test de justesse de la méthode enzymatique par rapport à la méthode HPLC

Caractéristiques	Méthode HPLC	Méthode enzymatique	Conclusions sur la méthode enzymatique
Solutions aqueuses synthétiques d'arginine	Modèle d'étalonnage	Linéaire	Linéaire Acceptable (tableaux 4 et 5 et figure 1)
	Domaine d'étalonnage	0 à 850 mg L ⁻¹	0 à 150 mg L ⁻¹ Limitée (tableaux 4 et 5 et figure 1)
	Erreur aléatoire		Expérimentale (tableau 5)
	Sensibilité (=pente)		5.9192 mg ⁻¹ L (figure 1)
	Limite de quantification		3 mg L ⁻¹ (tableaux 7 et 8)
	Limite de détection		1 mg L ⁻¹ (tableaux 7 et 8)
Echantillons de poudre de bois	Spécificité		Taux de recouvrement entre 82.8% et 100.6% Acceptable (tableau 9 et figure 2)
	Stabilité de la répétabilité	Test de Cochran : 0.418 < 0.536	Test de Cochran : 0.328 < 0.536 Acceptable (tableaux 10 et 11 et figure 3)
	Ecart-type de répétabilité	0.017 g kg ⁻¹	0.037 g kg ⁻¹ Acceptable (tableaux 10 et 12 et figure 3)
	Justesse (moyenne des différences)		0.081 g kg ⁻¹ Acceptable (tableaux 10 et 13 et figure 3)

Tableau 14 : Résumé des critères de validation de la méthode enzymatique

5.3.h. Comparaison statistique des résultats obtenus sur les 2 rapports d'extraction de chaque échantillon interne, par la méthode enzymatique (tableau 15)

Ce test constitue une validation supplémentaire par rapport au mode opératoire décrit dans la bibliographie (norme AFNOR XP T90-210, 1999). Il faut **vérifier que les deux rapports d'extraction** utilisés pour chaque échantillon interne (EI1 à EI5) **donnent des résultats significativement identiques en arginine** (en g kg⁻¹ de matière sèche à 70°C).

Soit m_1 et σ_1 les valeurs respectives de la moyenne et de l'écart type en arginine en gramme d'arginine dans 1 kg de matière sèche de bois à 70°C pour le premier rapport d'extraction (à p mg/20mL).

Soit m_2 et σ_2 les valeurs respectives de la moyenne et de l'écart type en arginine en gramme d'arginine dans 1 kg de matière sèche de bois à 70°C kg⁻¹ pour le deuxième rapport d'extraction (à 2p mg/20mL).

Ces valeurs m_1 et σ_1 , m_2 et σ_2 sont extraites du tableau 10 (méthode enzymatique).

Les valeurs n_1 et n_2 sont le nombre de dosages effectués respectivement pour le 1^{er} et le 2^{ème} rapport d'extraction.

Le tableau 15 présente les tests statistiques de comparaison des 2 rapports d'extraction.

	Rapport d'extraction p mg/20 mL			Rapport d'extraction 2p mg/ 20 mL			Risque $\alpha = 1\%$		Significativité de la différence
	n_1	m_1	σ_1	n_2	m_2	σ_2	$t_{\text{calculé}}$	t_{table}	
EI1	3	0.141	0.011	3	0.119	0.001	3.433	4.032	Non
EI2	3	0.332	0.058	3	0.277	0.009	1.635	4.032	Non
EI3	3	0.736	0.064	3	0.685	0.010	1.377	4.032	Non
EI4	2	1.195	0.018	3	1.104	0.023	5.006	4.604	Oui
EI5	3	1.626	0.066	3	1.506	0.013	3.114	4.032	Non

Tableau 15 : Test statistique de comparaison des 2 rapports d'extraction (voie enzymatique)

$$t = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2 \times n_1 + \sigma_2^2 \times n_2}{n_1 + n_2}}}$$

Le calcul de t (constante définissant l'intervalle de confiance du résultat) pour chaque échantillon interne est comparé au t de la table de Student au risque $\alpha=1\%$, pour $n_1 + n_2 - 1$ degrés de libertés.

Si $t_{\text{calculé}} < t_{\text{table}}$, on peut dire que les résultats ne sont pas significativement différents.

A part l'échantillon EI4, on peut donc dire qu'il y a 99 chances sur 100 pour que les deux rapports d'extraction donnent des résultats identiques.

Le tableau 16 donne les **moyennes et intervalles de confiance** des résultats des 2 rapports d'extraction de chaque échantillon interne, aux seuils d'erreur de 1% et 5%.

	Nb de mesures	Moyenne (g kg ⁻¹ MS à 70°C)	Ecart type (g kg ⁻¹ MS à 70°C)	(probabilité 99%)		(probabilité 95%)	
				t _{table}	Moyenne ± IC* (g kg ⁻¹ MS à 70°C)	t _{table}	Moyenne ± IC* (g kg ⁻¹ MS à 70°C)
EI1	6	0.130	0.014	4.032	0.13 ± 0.02	2.571	0.13 ± 0.01
EI2	6	0.305	0.048	4.032	0.31 ± 0.08	2.571	0.31 ± 0.05
EI3	6	0.711	0.050	4.032	0.71 ± 0.08	2.571	0.71 ± 0.05
EI4	5	1.114	0.053	4.604	1.14 ± 0.11	2.776	1.14 ± 0.07
EI5	6	1.566	0.078	4.032	1.57 ± 0.13	2.571	1.57 ± 0.08

Tableau 16 : Calcul des intervalles de confiance sur la teneur en arginine (voie enzymatique) (IC* = intervalle de confiance sur la teneur en arginine en g kg⁻¹ de MS)

6. Intérêts et limite du robot pour le dosage de l'arginine

Le coût du robot (≈ 20 k€ en 2003) et celui du lecteur de microplaques (≈ 5 k€ en 2003) sont compensés par la pertinence et l'efficacité de l'automate, pour 4 raisons principales :

- la qualité des résultats est validée dans cette étude ;
- la souplesse d'utilisation du robot permet de faire aussi bien de petites que de grandes séries d'analyses ; de plus le robot peut être utilisé lors de l'étape d'extraction (ajout de 750 µL d'eau), assurant ainsi à l'opérateur précision et gain de temps ;
- le prix de revient de l'analyse d'un échantillon extrait 4 fois (2 fois 2 rapports d'extraction différents) est d'environ 1.25 € et reste compétitif par rapport à un seul dosage manuel (1.6 €) : il est intéressant de faire 4 microdosages plutôt qu'un seul dosage, pour quantifier la variabilité du résultat ;
- enfin, la cadence analytique du robot est très supérieure à celle de la technique HPLC.

Néanmoins, le robot ne peut pas prélever plus de 120 µL à la fois ; donc le prélèvement d'un volume supérieur à 120 µL doit se faire en plusieurs fois, réduisant d'autant sa précision, qui reste tout de même meilleure qu'un prélèvement manuel.

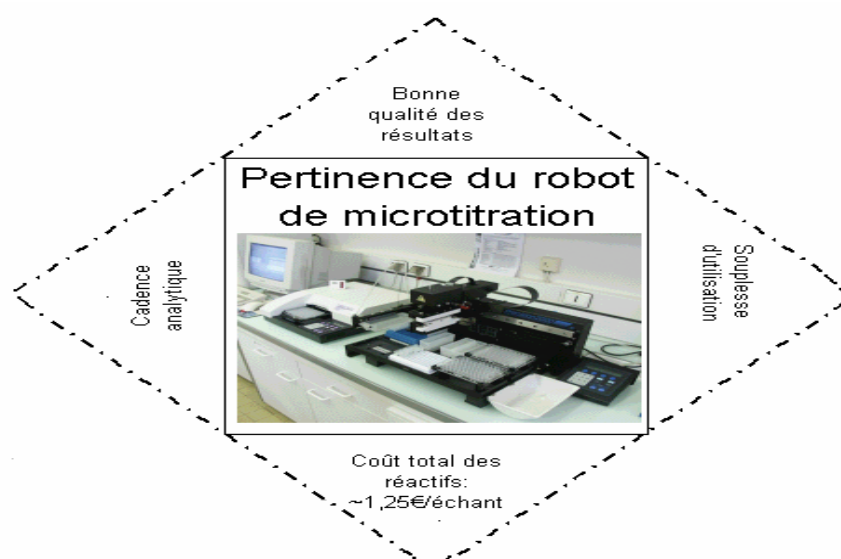


Schéma n°7 : Qualités du robot préparateur de microplaques

Conclusion

La miniaturisation du dosage enzymatique de l'arginine permet, en réduisant le prix de revient, de répéter plusieurs fois l'analyse, afin d'en quantifier l'incertitude, gage d'une bonne interprétation du résultat. L'achat d'un lecteur de microplaques suffit pour effectuer manuellement des microdosages ; mais la robotisation permet d'effectuer de grandes séries analytiques avec plus de précision et de rapidité (environ 5 microplaques dosées/jour).

Cette étude valide statistiquement une méthodologie non normalisée, et adaptée à des échantillons de bois de vigne et à des microdosages robotisés.

Elle s'inscrit dans une démarche de mise en place de l'assurance qualité au laboratoire.

Après cette validation, de nombreux échantillons de bois, d'origine géographique, de cépage et de traitement différents sont analysés. Les résultats obtenus montrent que l'arginine est un bon indicateur des réserves azotées de la vigne. De plus, les teneurs en arginine sont très différentes, révélant ainsi une bonne discrimination entre les échantillons.

Les échantillons internes « de référence », régulièrement intégrés dans des séries d'échantillons à doser, permettent de vérifier la stabilité des résultats analytiques dans le temps, garantissant ainsi la robustesse de la méthode.

Il serait intéressant de comparer le stock azoté du bois avec les réserves carbonées sous forme de sucres totaux : sucres solubles (glucose, fructose et saccharose) et amidon.

La méthodologie d'extraction et de microdosage enzymatique des réserves glucidiques dans le bois de vigne, à l'aide du robot « préparateur de microplaques », est aussi en cours d'adaptation, et de validation statistique, au laboratoire.

Références bibliographiques

- AFNOR, 1999. Norme XP T90-210 : Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence.
- Boehringer Mannheim / R-Biopharm. UV-method for the determination of urea and ammonia in foodstuffs and other materials. Notice technique cat. n° 0 542 946.
- Cohen S.A., Michaud D.P., 1993. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysat amino acids via HPLC. *Anal. Biochem.* 211, 279-287.
- Cohen S.A., De Antonis K. M., 1994. Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. Analysis of feed grain, intravenous solutions and glycoproteins. *Journal of Chromatography.* 661.
- Feinberg M., 2000. La validation des méthodes d'analyse. *Cah. des Tech. INRA.* 44, 19-49.
- Gilboe D.D., Williams J.N., 1956. Evaluation of the Sakagushi reaction for quantitative determination of arginine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91, 535-536.
- Kliewer W. M., 1991. Methods for determining the nitrogen status of vineyards. International symposium of nitrogen in grapes and wine.
- Mira de Orduña R., 2001. Quantitative determination of L-Arginine by enzymatic end-point analysis. *J. Agric. Food. Chem.* 49, 549-552.
- Parniak M.A., Lange G., Viswanatha T., 1983. Quantitative determination of monosubstituted guanidines : a comparative study of different procedures. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 7, 267-276.
- Sakagushi S, 1925. *J. Biochem., Japan.* 5, 25.