



HAL
open science

Dosage spectrophotométrique du glucose plasmatique chez le ruminant: adaptation en microplaque et validation de la méthode de dosage

Stéphane Andanson, Mathieu Silberberg, Martine Tourret, Christine Ravel,
Yannick Faulconnier

► To cite this version:

Stéphane Andanson, Mathieu Silberberg, Martine Tourret, Christine Ravel, Yannick Faulconnier.
Dosage spectrophotométrique du glucose plasmatique chez le ruminant: adaptation en microplaque
et validation de la méthode de dosage. Cahier des Techniques de l'INRA, 2012, 75 (1), pp.27-36.
hal-02653072

HAL Id: hal-02653072

<https://hal.inrae.fr/hal-02653072v1>

Submitted on 28 Oct 2024

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

Dosage spectrophotométrique du glucose plasmatique chez le ruminant: adaptation en microplaque et validation de la méthode de dosage

Stéphane Andanson¹, Mathieu Silberberg², Martine Tourret³, Christine Rave¹ et Yannick Faulconnier^{3*}

Résumé

La détermination colorimétrique de la glycémie fait partie des indicateurs couramment utilisés pour caractériser l'activité métabolique d'un organisme. Cet article décrit la transposition et l'optimisation du dosage de glucose dans les plasmas bovin, ovin et caprin sur microplaques puis sa comparaison avec la méthode de référence utilisant des cuves de 1 mL. La méthode en microplaque a ensuite été caractérisée afin d'en évaluer ses performances et de juger de sa validité en fonction de nos exigences expérimentales. Ainsi, nous avons déterminé les critères de linéarité, de spécificité et de fidélité. Nous observons que les deux méthodes ne sont pas significativement différentes ($P < 0,96$). Nous avons par ailleurs montré que la méthode en microplaque est spécifique, linéaire et présente des taux de variabilité très acceptables. Ces derniers ont été calculés pour la répétabilité et la fidélité intermédiaire chez le bovin, (3,7 % et 5,1 %), l'ovin (2,6 %, et 2,7 %) et le caprin (1,5 % et 4,5%).

Mots clés : glucose, spectrophotométrie, microplaque, validation de méthode, ruminants

Introduction

Le glucose représente la source principale d'énergie chez les mammifères, il est véhiculé par le sang jusqu'aux cellules. Sa concentration dans le sang, bien que régulée par l'insuline, est soumise à différents facteurs de variations, tels que la prise alimentaire, la dépense énergétique ou encore le stress. La mesure de ce taux représente donc un indicateur important pour caractériser l'activité d'un organisme (Bourguet *et al.*, 2011). De ce fait, le dosage spectrophotométrique du glucose plasmatique est utilisé en routine dans de nombreux laboratoires et son adaptation aux microplaques 96 puits a semblé intéressante notamment sur le plan de la simplification du travail de laboratoire. La démarche a consisté, dans un premier temps, à définir les possibilités de modifications induites par la réduction de volume et son impact sur le principe du dosage. Nous avons ensuite comparé la méthode classique dite «en cuve» avec la méthode «en microplaque». Enfin, nous avons caractérisé cette dernière à l'aide de la procédure de validation des méthodes d'analyse décrite par Feinberg (1996) sur le plan de sa fiabilité afin de définir sa validité par rapport à nos exigences expérimentales.

¹ UMRH - Unité mixte de recherche sur les herbivores - ACS (Equipe Adaptation et comportements sociaux) - Inra - F-63122 Saint Genès-Champanelle

² UMRH - Unité mixte de recherche sur les herbivores - DIMA (Equipe Digestion microbienne et absorption) - Inra - F-63122 Saint Genès-Champanelle

^{3*} UMRH - Unité mixte de recherche sur les herbivores - AGL (Equipe Alimentation-Génomique-Lactation) - Inra - F-63122 Saint Genès-Champanelle. ☎04 73 62 41 17 ; email : yannick.faulconnier@clermont.inra.fr

1. Matériel et méthodes

1.1 Dosage du glucose par la méthode classique en cuve de 1 mL

Les expériences ont été réalisées sur trois espèces de ruminants: ovin, bovin et caprin. Des échantillons de sang, prélevés à l'aide de vacutainers contenant de l'EDTA, ont été centrifugés 10 min à 2500g. Les plasmas ont ensuite été stockés à -20°C jusqu'aux analyses. Les teneurs plasmatiques en glucose ont été déterminées par dosage colorimétrique à l'aide du kit RTU de chez BioMérieux (Réf. 61269). Dans le milieu réactionnel, la glucose-oxydase du kit RTU, oxyde le glucose présent dans l'échantillon en acide gluconique en produisant également du peroxyde d'hydrogène. Ce dernier sert de substrat à la peroxydase qui le transforme en quinonéimine, produit coloré mesuré à 505 nm, l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose. Le mode opératoire manuel du kit RTU préconise l'utilisation de cuves de 1 mL, avec une prise d'échantillon de 10 µL et de 1 mL de réactif puis une incubation de 10 min à 37°C (**Tableau 1**).

Tableau 1. Dosage enzymatique du glucose à l'aide du kit commercial Glucose RTU de chez Biomérieux en utilisant des cuves de 1 mL

	Gamme	Echantillon ou contrôle
Prise d'essai (µL)	10	10
Solution de travail (µL)	1000	1000
Vortexer		
Incuber 10 minutes à 37°C		
Lecture à 505 nm		

1.2. Analyse statistique des données

Les données du **Tableau 3** ont été analysées en utilisant la procédure GLM du logiciel SAS® (version sasx81, SAS® Institute Inc., USA) à deux facteurs incluant les effets globaux de la méthode utilisée (quelle que soit l'espèce), de la matrice (quelle que soit la méthode utilisée), et de l'interaction méthode x matrice. Les comparaisons 2 à 2 des méthodes pour une seule matrice et des matrices pour une seule méthode ont été effectuées à l'aide du test t de Student.

Un outil Excel a été utilisé pour déterminer les critères de linéarité, spécificité et fidélité (Andanson *et al.*, 2005). Il s'agit d'un programme réalisé sous Excel qui exécute automatiquement les calculs d'analyse de variance à partir des données obtenues lors des essais. Il renseigne directement sur l'acceptabilité de la linéarité et de la spécificité puis délivre les coefficients de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Les formules de ces calculs sont extraites de l'ouvrage de M. Feinberg (1996).

Equation utilisée pour déterminer la linéarité de la méthode :

$$SCE_y = SCE_l + SCE_{nl} + SCE_r;$$

SCE_y somme des carrés des écarts des réponses à la réponse moyenne ;

SCE_l somme des carrés des écarts dus à la linéarité ;

SCE_{nl} somme des carrés des écarts dus à la non linéarité ;

SCE_r somme des carrés des écarts résiduels.

Equation utilisée pour déterminer la fidélité de la méthode :

$$SCE_t = SCE_R + SCE_r;$$

SCE_t somme totale des écarts à la moyenne ;

SCE_R somme interdosages ;

SCE_r somme intradosages.

2. Transposition et optimisation du dosage de glucose sur microplaques et comparaison à la méthode de référence

2.1 Transposition et optimisation du dosage

La transposition sur microplaques 96 puits nécessite de réduire les volumes d'échantillon et de réactif, le volume maximal utile d'un puits étant de 300 µL. De façon à respecter le rapport volume d'échantillon/volume de réactif, il faudrait 250 µL de réactif pour 2,5 µL d'échantillon. Ce faible volume d'échantillon étant une source de variabilité importante, nous avons décidé de conserver une prise d'échantillon de 10 µL pour un volume de réactif de 250 µL (**Tableau 2**). Pour ce faire, nous avons réalisé, dans un premier temps, une gamme étalon très étendue (de 0 à 20 g/L) avec la procédure classique dite en cuve (**Figure 1**). Une courbure de la réponse est observée à environ 7 g/L, ce qui réduit théoriquement la plage de linéarité à 1,7 g/L lorsque l'analyte est 4 fois plus concentré si on modifie le rapport analyte/réactif. Cette plage est acceptable puisque les concentrations physiologiques de glucose se situent entre 0,5 et 1,2g/L dans les plasmas bovin (Delavaud *et al.*, 2002; Ferlay *et al.*, 2006), ovin (Bocquier *et al.*, 1998) et caprin (Bernard *et al.*, 2009). Nous avons alors réalisé un dosage en microplaque avec une gamme allant de 0 à 1,6 g/L afin de vérifier que, malgré un analyte 4 fois plus concentré, la linéarité de la gamme était acceptable. (**Figure 2**).

Tableau 2. Dosage enzymatique du glucose à l'aide du kit commercial *Glucose RTU*, de chez Biomérieux en utilisant un lecteur de microplaque

	Gamme	Echantillon ou contrôle
Prise d'essai (µL)	10	10
Solution de travail (µL)	250	250
Vortexer		
Incuber 10 minutes à 37°C		
Lecture à 505 nm		

Les caractéristiques de la gamme (équation de la droite de régression et coefficient de corrélation, **Figure 2**) semblent correctes après modification du rapport volume d'échantillon/volume de réactif. Nous avons donc entrepris la comparaison de la méthode dite classique à la méthode en microplaque.

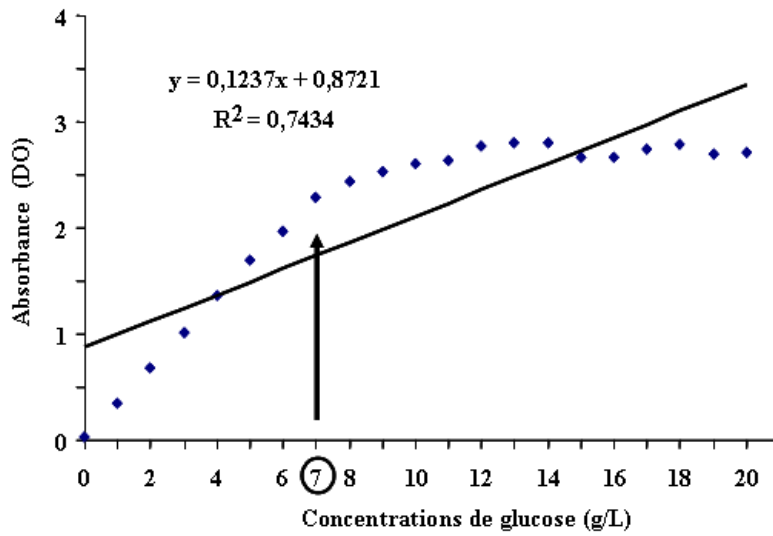


Figure 1. Gamme de glucose à l'aide de la méthode «classique» (la flèche représente le point d'inflexion de la gamme à 7g/L de glucose).

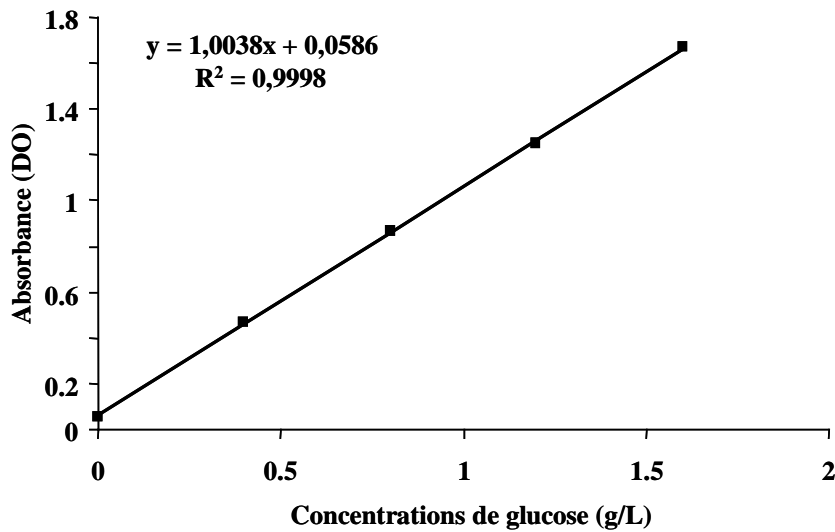


Figure 2. Gamme de glucose en microplaque 96 puits.

2.2. Comparaison de méthodes

La comparaison de méthodes a été réalisée en utilisant cinq échantillons de plasma bovin, ovin et caprin. Chaque échantillon a été dosé 5 fois avec la méthode de référence et 5 fois avec la méthode miniaturisée dans les conditions d'optimisation que nous avons définies au préalable soit un total de 25 échantillons par espèce et par méthode (**Tableau 3**). Cela a permis simultanément la vérification de la justesse ainsi que la validation de la transposition en microplaques.

Tableau 3. Concentrations plasmatiques de glucose dans les plasmas ovin, bovin et caprin mesurées avec la méthode classique et la méthode en microplaque

Matrices	Echantillons	Répétitions	Méthode classique		Méthode en microplaque		Effet méthode	
			Moyenne (mg/L)	Ecart-type	Moyenne (mg/L)	Ecart-type		
Plasma ovin	1	5	0,739	0,023	0,737	0,012	<i>P</i> < 0,56	
	2	5	0,658	0,038	0,648	0,006		
	3	5	0,745	0,011	0,727	0,012		
	4	5	0,634	0,007	0,638	0,01		
	5	5	0,693	0,013	0,686	0,017		
MOY +/- ET (mg/L, n = 5)			0,694 +/- 0,018 ^A		0,687 +/- 0,011 ^A			
Plasma bovin	1	5	0,778	0,009	0,8	0,021		<i>P</i> < 0,81
	2	5	0,866	0,015	0,879	0,012		
	3	5	0,871	0,066	0,858	0,013		
	4	5	0,749	0,008	0,758	0,012		
	5	5	0,852	0,024	0,841	0,008		
MOY +/- ET (mg/L, n = 5)			0,823 +/- 0,024 ^B		0,827 +/- 0,013 ^B			
Plasma caprin	1	5	0,492	0,01	0,485	0,01	<i>P</i> < 0,93	
	2	5	0,622	0,011	0,634	0,008		
	3	5	0,758	0,014	0,757	0,017		
	4	5	0,633	0,023	0,64	0,011		
	5	5	0,583	0,01	0,582	0,012		
MOY +/- ET (mg/L, n = 5)			0,618 +/- 0,014 ^C		0,620 +/- 0,012 ^C			
Effet espèce			<i>P</i> < 0,001		<i>P</i> < 0,001			<i>P</i> < 0,90

Ces résultats montrent que, pour une même méthode, les concentrations plasmatiques de glucose, dans nos conditions expérimentales, sont significativement différentes entre espèces. En effet, nous notons que la glycémie est significativement plus élevée chez le bovin que chez les deux autres espèces de ruminant. De plus, la glycémie ovine est significativement supérieure à la glycémie caprine. Cependant, au sein d'une même espèce, l'effet méthode (méthode classique vs. microplaque 96 puits) n'est pas significatif ($p > 0,56$). Par ailleurs, aucune interaction significative n'est mise en évidence entre méthode et espèce ($p < 0,9$).

3. Caractérisation de la méthode en microplaque

Nous avons choisi de déterminer les performances de la méthode nouvellement mise au point au travers des trois critères suivants : linéarité, spécificité et fidélité intermédiaire. Ils sont essentiels en regard de l'utilisation que nous avons des taux plasmatiques de glucose dans nos travaux de recherche.

3.1. Test de linéarité

La linéarité de la méthode a été déterminée en réalisant cinq points de gamme étalon différents et espacés régulièrement, chaque point étant répété 5 fois. (**Tableau 4**). Les limites de détection et quantification sont calculées à partir de la sensibilité de la méthode et de la valeur 0 g/L de la gamme étalon (Feinberg, 1996). Ces limites sont définies dans la norme française NF V03-110 (Afnor, 1998) de la façon suivante :

-limite de détection : plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée, mais non quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode ;

-limite de quantification : plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable, dans les conditions décrites de la méthode.

Tableau 4. Valeurs des cinq répétitions de chaque point de gamme

Points de gamme (g/L)	DO (5 répétitions par point de gamme)				
	y1	y2	y3	y4	y5
0	0,0566	0,0568	0,0569	0,0573	0,0567
0,4	0,460	0,469	0,468	0,467	0,465
0,8	0,883	0,875	0,864	0,862	0,831
1,2	1,263	1,221	1,278	1,268	1,220
1,6	1,731	1,683	1,654	1,673	1,621

Tableau 5. Résultats du test de linéarité du modèle d'étalonnage : analyse de variance

	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	F calculé	F de Fischer P 0,01	Conclusion
Linéarité	1	8,0612	8,0612	14439	8,096	Acceptable
Non-linéarité	3	0,0013	0,00043	0,806	4,938	Acceptable
Résiduelle	20	0,0112	0,00056			
Totale	24	8,0738				

Les résultats statistiques du **Tableau 5** montrent, que le modèle de régression choisi entre 0 et 1,6 g/L est acceptable (F calculé > F limite déterminé à partir de la table de Fisher) et le modèle est linéaire dans tout le domaine choisi (F calculé < F critique déterminé à partir de la table de Fisher). A partir de ces données ayant permis d'établir la fonction réponse il est possible de déterminer les limites de détection et de quantification qui sont respectivement de 0,083 g/L et de 0,139 g/L.

3.2. Test de spécificité

La spécificité a été déterminée par la méthode des ajouts dosés (NF V 03-110). Cette méthode permet de mettre en évidence des interférences avec la matrice contenant l'analyte à déterminer et le réactif. En l'absence d'interférence la méthode est jugée spécifique. Ainsi, du glucose a été ajouté en quantités croissantes (0,1 ; 0,2 et 0,4 g/L) à des échantillons de plasma ovine, bovine et caprine (**Tableau 6**). Nous avons ensuite vérifié, à l'aide d'un test t de Student, que la pente de cette droite n'est pas différente de 1 et que l'ordonnée à l'origine n'est pas différente de zéro (**Tableau 6**). Ceci permet de démontrer l'absence d'interférences avec la matrice et qu'il n'existe pas de biais systématique pour l'évaluation des teneurs.

Tableau 6. Résultats du test de spécificité

	Echantillons	Moyenne échantillon avant ajout	Teneur ajoutée	Moyenne échantillon après ajout	Teneur retrouvée*	Pente de la droite de régression	Test de signification à la pente	Test de signification de l'ordonnée à l'origine	Valeur critique
Plasma bovin	1	0,383	0,00	0,389	0,01	0,966	2,609	0,280	3,169
	2	0,383	0,00	0,380	0,00				
	3	0,383	0,00	0,379	0,00				
	4	0,383	0,10	0,485	0,10				
	5	0,383	0,10	0,478	0,09				
	6	0,383	0,10	0,487	0,10				
	7	0,383	0,20	0,577	0,19				
	8	0,383	0,20	0,567	0,18				
	9	0,383	0,20	0,580	0,20				
	10	0,383	0,40	0,778	0,39				
	11	0,383	0,40	0,760	0,38				
	12	0,383	0,40	0,774	0,39				
Plasma ovin	1	0,368	0,00	0,366	0,00	0,988	1,090	1,207	3,169
	2	0,368	0,00	0,369	0,00				
	3	0,368	0,00	0,370	0,00				
	4	0,368	0,10	0,461	0,09				
	5	0,368	0,10	0,461	0,09				
	6	0,368	0,10	0,468	0,10				
	7	0,368	0,20	0,557	0,19				
	8	0,368	0,20	0,557	0,19				
	9	0,368	0,20	0,558	0,19				
	10	0,368	0,40	0,771	0,40				
	11	0,368	0,40	0,755	0,39				
	12	0,368	0,40	0,764	0,40				
Plasma caprin	1	0,226	0,00	0,227	0,00	1,003	0,310	0,616	3,169
	2	0,226	0,00	0,227	0,00				
	3	0,226	0,00	0,223	0,00				
	4	0,226	0,10	0,328	0,10				
	5	0,226	0,10	0,329	0,10				
	6	0,226	0,10	0,324	0,10				
	7	0,226	0,20	0,430	0,20				
	8	0,226	0,20	0,434	0,21				
	9	0,226	0,20	0,431	0,20				
	10	0,226	0,40	0,620	0,39				
	11	0,226	0,40	0,624	0,40				
	12	0,226	0,40	0,636	0,41				

Teneurs retrouvées=quantité glucose de l'échantillon avant ajout-quantité moyenne de glucose de l'échantillon avant ajout.

Les valeurs observées du t de Student (**Tableau 6**), pour la signification de la pente, sont inférieures à la valeur critique pour les trois espèces. Ceci démontre que le dosage du glucose n'est pas influencé par les matrices plasmatiques ovine, bovine et caprine.

Quelle que soit l'espèce considérée, la valeur du t de Student de signification de l'ordonnée à l'origine (**Tableau 6**) est inférieure à la valeur critique donc l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0. Par conséquent il n'y a pas de décalage de cette droite par rapport à la droite de régression théorique.

3.3. Evaluation de la fidélité intermédiaire et de la répétabilité

Pour apprécier la fidélité intermédiaire et la répétabilité de la méthode, huit dosages réalisés pendant 8 jours par des opérateurs différents dans lesquels un échantillon de plasma ovine, bovine et caprine ont été dosés en triple (**Tableau 7**). Pour chaque échantillon, l'analyse de variance permet d'extraire la part de la variabilité induite par les différents dosages de la variabilité totale. Cette valeur représente la fidélité intermédiaire de la méthode. La variabilité induite par les répétitions réalisées dans chaque dosage a aussi été extraite de la variabilité totale pour exprimer la répétabilité de la méthode.

Les coefficients de variation de répétabilité et reproductibilité calculés sont pour

- le plasma ovine : CVr : 3,74%, CV de fidélité intermédiaire : 5,09% ;
- le plasma bovine : CVr : 2,58%, CV de fidélité intermédiaire : 2,74% ;
- le plasma caprine : CVr : 1,55%, CV de fidélité intermédiaire : 4,50%.

Quelle que soit l'espèce considérée, la répétabilité et la fidélité intermédiaire sont acceptables, puisque inférieures ou égales à 5%.

Tableau 7. Concentrations de glucose dans les plasmas ovins, bovine, caprine : répétabilité et fidélité intermédiaire

Jour	Répétabilité (mg/L)								
	Plasma ovine			Plasma bovine			Plasma caprine		
	y1	y2	y3	y1	y2	y3	y1	y2	y3
1	0,63	0,62	0,63	0,84	0,84	0,85	0,64	0,63	0,64
2	0,6	0,62	0,62	0,84	0,83	0,83	0,59	0,6	0,59
3	0,61	0,63	0,62	0,84	0,84	0,85	0,56	0,59	0,6
4	0,65	0,64	0,6	0,82	0,82	0,83	0,6	0,6	0,6
5	0,63	0,62	0,6	0,84	0,81	0,78	0,6	0,59	0,6
6	0,62	0,61	0,62	0,89	0,79	0,83	0,59	0,58	0,58
7	0,64	0,63	0,62	0,86	0,87	0,85	0,6	0,6	0,6
8	0,61	0,55	0,5	0,86	0,85	0,83	0,54	0,54	0,56

Conclusion

Le résultat de l'ensemble des tests démontre que la méthode de dosage du glucose sur microplaque peut-être utilisée pour les plasmas bovine, ovine et caprine. Cette méthode est spécifique, linéaire, et présente des taux de variabilité très acceptables. Elle est considérée valide en regard de ses caractéristiques sur le plan de la fidélité puisque la valeur des différents CV calculés n'excède pas 5 %. L'adaptation aux microplaques présente de nombreux avantages : une lecture simultanée et instantanée d'un grand nombre d'échantillons et de la gamme, un gain de temps important et une économie de réactif puisque la quantité de

réactif mise en œuvre est réduite d'un facteur 4. Cette démarche simple à réaliser peut être étendue à de nombreuses autres analyses dans le but de les simplifier et de les fiabiliser.

Références bibliographiques

Afnor (décembre 1998) Procédure de validation intra laboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence. NF V 03-110.

Andanson S, Berne A, Astruc T, Sapin V, Rozand I (2005) Mise au point et validation d'une méthode de dosage sur microplaques de la créatinine urinaire bovine et porcine. *Le Cahier des Techniques (Inra)* 54:11-19.

Bourguet C, Deiss V, Boissy A, Andanson S, Terlouw C (2011) Effect of food deprivation on behavioral reactivity and physiological status in Holstein cattle. *J Anim Sci* 89:3272-3285.

Bernard L, Leroux C, Faulconnier Y, Durand D, Shingfield KJ, Chilliard Y (2009) Effect of sunflower-seed oil or linseed oil on milk fatty acid secretion and lipogenic gene expression in goats fed hay-based diets. *J Dairy Res* 76:241-248.

Bocquier F, Bonnet M, Faulconnier Y, Guerre-Millo M, Martin P, Chilliard Y (1998) Effects of photoperiod and feeding level on perirenal adipose tissue metabolic activity and leptin synthesis in the ovariectomized ewe. *Reprod Nutr Dev* 38: 489-498.

Delavaud C, Ferlay A, Faulconnier Y, Bocquier F, Kann G, Chilliard Y (2002) Plasma leptin concentration in adult cattle: Effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *J Anim Sci* 80:1317-1328.

Ferlay A, Martin B, Pradel P, Coulon JB, Chilliard Y (2006) Influence of grass-based diets on milk fatty acid composition and milk lipolytic system in Tarentaise and Montbeliarde cow breeds. *J Dairy Sci* 89:4026-4041.

Feinberg M (1996) *La validation des méthodes d'analyse. Une approche chimométrique de l'assurance qualité au laboratoire*. Editions Masson.