

METHODES DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN UREE DANS LE LAIT

(Résumé de l'intervention de M. LEFIER de l'INRA Poligny lors de l'Assemblée Générale de CECALAIT)

A l'heure actuelle les producteurs et les transformateurs manifestent un intérêt croissant pour la détermination de la teneur en urée dans le lait. Or, les méthodes de dosage actuelles sont nombreuses, diverses et quasiment pas normalisées. Elles se divisent en trois catégories. Les méthodes directes, tout d'abord, sont des méthodes colorimétriques : DMAB, méthode manuelle et DAM, méthode automatisable. Les méthodes indirectes sont des méthodes enzymatiques. Enfin les méthodes physiques comprennent principalement la spectroscopie infra-rouge. Quelques caractéristiques de précision, de linéarité, de justesse ont pu être déterminées pour la plupart de ces méthodes. Mais, pour l'heure, elles n'ont pratiquement pas été comparées entre elles, si bien que les problèmes de dispersion des résultats restent préoccupants.

Le taux d'urée dans le lait peut varier de façon notable, en fonction principalement de l'alimentation de l'animal. Des valeurs anormales constituent alors un outil d'alerte à la nutrition azotée. Des teneurs trop élevées semblent également perturber la qualité fromagère des laits (cf l'Assemblée Générale de 1995 et La Lettre de CECALAIT, n° 15). C'est pourquoi la détermination de la teneur en urée devient d'un intérêt croissant, aussi bien pour les producteurs que les transformateurs.

Or à l'heure actuelle une multitude de méthodes coexistent et aucune d'entre elles n'a été normalisée au niveau international, en référence comme en routine. (Rappelons qu'en France, depuis 1992, l'AFNOR a normalisé une méthode enzymatique de référence). Il semble par conséquent utile de faire un tour d'horizon des principales méthodes employées et de leurs caractéristiques.

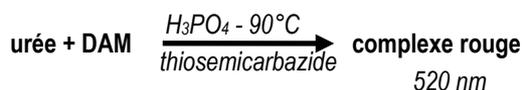
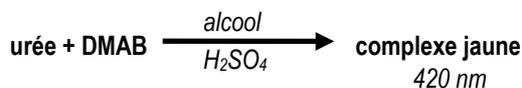
Elles se divisent en 3 grands groupes : les méthodes directes, les méthodes indirectes et les méthodes physiques.

Dans les méthodes directes, on dose, généralement par colorimétrie, le complexe, formé entre l'urée et le réactif employé. Les deux procédures principales sont la méthode au DMAB (paradiméthylaminobenzaldéhyde) et la méthode au DAM (diacétyl monoxime). Les méthodes indirectes, essentiellement enzymatiques, dosent un sous-produit formé par réaction entre un produit de dégradation de l'urée et le réactif. Enfin, l'infra-rouge et la pH-métrie par utilisation d'une électrode sélective de l'ion ammonium, correspondent aux méthodes physiques.

↳ METHODES COLORIMETRIQUES

Les conditions expérimentales des deux méthodes diffèrent, mais aucune étude ne les a comparées entre elles.

→ PRINCIPE



→ CARACTERISQUES

Elles sont résumées dans le tableau ci-dessous et proviennent de l'ensemble des sources bibliographiques actuellement disponibles.

	DMAB	DMA
AUTOMATISATION ?	manuelle	automatisable par SFA

DEPROTEINISATION	TCA	aucune
LINEARITE (mg urée / 100 ml lait)	de 0 à 100	de 5 à 75
PRECISION (mg urée / 100 ml lait) CV_r %	1,5 0,23	0,6
JUSTESSE mg urée / 100 ml lait		1,7
TAUX DE RECUPERATION	100%	98,5%

SFA : segmented flow-analysis

Cv.% : coefficient de variation de répétabilité

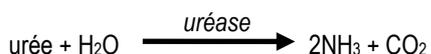
↳ METHODE ENZYMATIQUE

C'est la méthode la plus utilisée, pratiquée manuellement avec les kits enzymatiques et dans la norme AFNOR ou automatisée par FIA (*Flow injection analysis*) ou SFA.

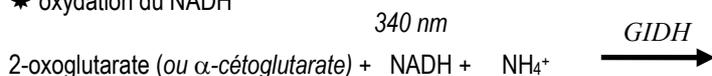
→ PRINCIPE

Le dosage se fait en deux étapes :

- * Hydrolyse de l'urée en ammoniac sous l'action de l'uréase



- * oxydation du NADH



En présence de glutamate-deshydrogénase (GIDH) et de nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit (NADH), l'ammoniac réagit avec le 2-oxoglutarate pour donner du L-glutamate alors que le NADH s'oxyde en NAD⁺. Le NADH peut être suivi par spectrophotométrie à 340 nm. La diminution d'absorbance à cette longueur d'onde est alors proportionnelle stoechiométriquement au NADH oxydé, donc à l'ammoniac présent, c'est à dire à la moitié de l'urée présente.

→ CONDITIONS

La préparation diffère légèrement selon que la détermination soit manuelle ou non.

Dans le premier cas, il est nécessaire d'intercaler une étape de déprotéination avant les deux étapes du dosage décrites ci-dessus. Celle-ci se fait, soit par ultrafiltration, soit par précipitation à l'acide trichloracétique (TCA à 4% ou 9,6%) ou selon la procédure de Rowland, développée pour l'extraction de l'azote soluble (procédure AFNOR).

En FIA, le lait est simplement dilué dans l'eau.

Dans tous les cas, la méthode requiert un double dosage de l'ammoniac. Le premier concerne l'ammoniac initialement présent dans le lait. Le second dose l'ammoniac initial et l'ammoniac produit par hydrolyse de l'urée par l'uréase.

→ CARACTERISTIQUES

Elles sont résumées dans le tableau ci-dessous

CARACTERISTIQUES	procédure manuelle	procédure automatisée (FIA)
LIMITE DE DETECTION	1,4 mg/100 ml	2,4 mg/100 ml
LINEARITE	de 0 à 14 mg/100 ml	de 0 à 4,8 mg/100 ml
TAUX DE RECUPERATION	100% ± 3%	98% à 100%
FIDELITE CV _r % CV _R %	0,5 à 1,13 * 1,35 à 3,02 *	de 0,39 à 4,0 ** de 1,9 à 7,8 ***
JUSTESSE (par comparaison avec un kit enzymatique : méthode manuelle)		d _{x-y} = - 0,48 mg d'urée pour 100 ml s _{x-y} = 0,01 mg d'urée pour 100 ml

Cv.% : coefficient de variation de répétabilité

CV_R% : coefficient de variation de reproductibilité

* : une seule source bibliographique : norme AFNOR V 04-217, 1992

** : valeurs émanant de plusieurs sources bibliographiques

*** : une seule source bibliographique : ANDERSON G., ANDERSSON L., CARLSTROM G. J. Vet. Med. A. 1986, V. 33, p. 53-58. Les valeurs mentionnées dans le reste de la bibliographie sont toutes comprises dans cet intervalle.

↳ METHODE IR

La teneur en urée du lait peut également être déterminée par spectroscopie infra-rouge. Le spectre IR de l'urée présente 4 bandes d'absorption vers 1690 cm⁻¹, 1600 cm⁻¹, 1472 cm⁻¹ et 1161 cm⁻¹. Mais dans le lait, les deux premières bandes sont fortement perturbées par l'absorption de l'eau, alors que les suivantes se confondent avec les bandes d'absorption d'autres composés du lait, comme la MG ou le lactose. La zone la plus utilisable se situe finalement autour de 1600 cm⁻¹ - 1610 cm⁻¹.

Dans ces conditions, la répétabilité de la méthode est de 2,5 mg d'urée pour 100 ml de lait. Quant à sa précision, avec une analyse des résultats par PLS (moindres carrés partiels), elle atteint :

- ♦ 6 mg d'urée pour 100 ml pour les laits individuels,
- ♦ 4,5 mg d'urée pour 100 ml dans les laits de troupeaux.

↳ FACTEURS INFLUENÇANT LE DOSAGE

Il s'agit du mode de conservation des échantillons, de l'interférence d'autres composés du lait, d'effets liés à la saison, au pays...

L'ensemble des études effectuées montre que la conservation des échantillons par le Bronopol n'a pas d'effet sur le dosage de l'urée par les méthodes enzymatique et colorimétrique. Il en est de même lorsque ces échantillons additionnés de Bronopol sont stockés à 4°C -jusqu'à 14j-. En revanche, on observe un effet significatif sur la teneur en urée quand ils sont congelés.

Par contre, la conservation par le dichromate de potassium, teintant en jaune, demande une calibration spécifique dans le cadre de la méthode colorimétrique.

Il y a peu de composés du lait susceptibles d'interférer avec la détermination de l'urée. L'acide urique et l'uracile, très peu abondants dans le lait n'exercent que des effets mineurs. En revanche, ne pas tenir compte de l'ammoniac initial du lait, lors d'un dosage enzymatique, aboutit à une surestimation de l'urée de l'ordre de 1,7 mg pour 100 ml de lait.

Des sources de variation encore mal connues

L'étape de déprotéination présente dans la méthode enzymatique et la méthode au DMAB intervient vraisemblablement dans l'exactitude des résultats, mais n'a pas été étudiée pour l'heure.

En outre, des essais interlaboratoires internationaux ont montré des variations parfois importantes selon la saison ou selon le pays.

Ces mêmes essais ont également mis en évidence l'importante dispersion des résultats, qui sont en fait regroupés en petits ensembles correspondant à une méthode donnée. Il semblerait que les méthodes colorimétriques présentent un biais de départ par rapport à la méthode enzymatique. Mais aucune étude systématique n'a encore éclairci ces points à l'heure actuelle.

Or, il est certain que l'intérêt du dosage et l'utilisation effective des résultats, pour les producteurs et peut-être plus encore pour les transformateurs dépend étroitement de l'amélioration de la fiabilité des résultats. Des études et essais supplémentaires sont donc clairement indispensables.

NB : La bibliographie est trop abondante pour être reproduite ici. Nous vous l'adresserons sur simple demande de votre part.