

Article original

Micro-dosage automatisé sur analyseur à transfert de l'azote α -aminé circulant

JP Chacornac ¹, J Barnouin ¹, ML Houlier ²

¹ INRA de Clermont-Theix, Laboratoire d'Ecopathologie;

² INRA, Laboratoire d'Etude du Métabolisme Azoté, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

(Reçu le 27 juillet 1992; accepté le 15 décembre 1992)

Résumé — Une micro-méthode automatisée de détermination de l'azote α -aminé est décrite. Cette méthode est mise en œuvre sur un analyseur à transfert informatisé après déprotéinisation à l'acide trichloracétique. Elle est basée sur la formation d'un complexe coloré entre les radicaux NH_2 terminaux et l'acide 2,4,6 trinitrobenzène sulfonique; elle est précise (reproductibilité de 2%), linéaire entre 0,2 et 7 mmol/l et requiert de faibles volumes réactionnels; elle est par ailleurs bien corrélée chez les bovins avec la méthode de référence utilisant la chromatographie liquide ($r = 0,953$). Avec cette méthode colorimétrique automatisée, une seule personne peut effectuer 50 déterminations d'azote α -aminé à l'heure.

acide aminé / plasma / vache / veau / méthode automatisée

Summary — An automated micro-method for the determination of plasma free amino groups using a discrete computerized analyser. An automated method for the determination of plasma free amino groups is described. The analysis is performed on a discrete computerized analyzer after plasma deproteinization using trichloroacetic acid. The method is based on the formation of a complex between terminal NH_2 radicals and 2,4,6-trinitrobenzene sulfonate (TNBS). The method is accurate (coefficient of variation = 2%), linear over a range of 0.2–7 mM/l and requires small analytic volumes; it also correlates well in the bovine with results from standard liquid chromatography ($r = 0.953$). With this method a single operator can determine free amino group contents of 50 samples per h.

amino acid / plasma / cow / calf / automated method

INTRODUCTION

Les acides aminés libres du sang constituent la principale forme de transport des produits de la digestion des matières azotées alimentaires, et leurs teneurs traduisent l'équilibre entre les apports et les besoins (Munro, 1972). Morrisson *et al* (1961) chez le rat, Zimmerman et Scott (1965) chez le poulet, Harper *et al* (1970), Champredon *et al* (1976), Bogin *et al* (1980) et Foldager *et al* (1980) chez le bovin, ont montré que la composition en acides aminés libres circulants est reliée aux apports nutritionnels ou à l'utilisation métabolique des matières azotées. D'autre part, des variations de concentration des acides aminés peuvent révéler des désordres métaboliques, comme l'ont montré Hidiroglou et Veira (1982), ainsi que Falloon et Rammel (1988) dans le cas de troubles hépatiques.

Lorsqu'il s'agit, en expérimentation, d'estimer les variations globales de l'amino-acidémie plasmatique, en tant que seul paramètre, ou comme préalable à une étude spécifique des variations de chaque acide aminé (Rérat *et al*, 1987), il est important de pouvoir disposer d'une technique analytique aisée à mettre en œuvre; la chromatographie sur résine échangeuse de cations, que l'on peut considérer comme la méthode de référence (Pawlak et Pion, 1968), est en effet lourde à utiliser. Par ailleurs en épidémiologie animale, où l'on travaille sur de grands effectifs (plusieurs milliers d'animaux suivis pendant plusieurs années), on est contraint, si l'on veut notamment relier le métabolisme azoté à la santé animale, à utiliser des techniques de dosage rapides et peu coûteuses (Barnouin *et al*, 1987).

Le dosage de l'azote α -aminé — via un complexe coloré — apparaît comme une bonne estimation des acides aminés libres (Rérat *et al*, 1987). L'automatisation de ce

dosage a été proposée chez l'homme sur analyseur à flux continu (Palmer et Peters, 1969). Aujourd'hui, l'utilisation d'analyseurs à transfert, permettant de travailler sur de faibles volumes réactionnels et de tester aisément l'influence des paramètres analytiques, peut permettre de préciser les conditions analytiques optimales du dosage.

Ainsi, l'objectif du présent travail a été la mise au point, chez les bovins, d'une méthode automatisée de dosage de l'azote α -aminé à l'aide d'un analyseur à transfert informatisé. Cette étude a inclus :

- une évaluation précise des critères de qualité analytique;
- l'étude de diverses modalités de préparation de l'échantillon et de conservation de l'azote aminé dans le plasma;
- la comparaison de la méthode automatisée proposée avec la méthode chromatographique de référence.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux

Dans le cadre de l'étude de la conservation de l'azote aminé dans le plasma et de l'évaluation de la qualité de la méthode de dosage, des vaches laitières provenant d'élevages du département du Puy-de-Dôme ont été utilisées.

La méthode automatisée a été comparée à une méthode chromatographique de référence à l'aide de 2 veaux préruminants, logés en cases individuelles, alimentés avec des laits de remplacement (Houlier *et al*, 1991).

Prélèvements

Sur les vaches

Le sang a été prélevé dans le sinus sous-caudal, collecté dans des tubes héparinés et

centrifugé immédiatement, à l'exception d'un prélèvement pour lequel la centrifugation a été différée de 6 h. Après la centrifugation, les plasmas ont été conservés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'analyse. Pour l'étude de l'influence du délai de centrifugation et de la conservation, il a été procédé de la manière suivante :

- un tube de sang a été maintenu pendant 6 h à température ambiante avant centrifugation et dosage;
- un tube de sang a été centrifugé immédiatement et le plasma obtenu a été fractionné en 9 aliquotes; sur une aliquote, le dosage a été réalisé immédiatement; 3 aliquotes ont été conservées à température ambiante avant dosage, une pendant 7 h, une pendant 24 h, et une dernière pendant 72 h; deux aliquotes ont été placées à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'au dosage, l'une pendant 24 h et l'autre pendant 72 h; 3 aliquotes ont été placées à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'au dosage, une pendant 15 j, une seconde pendant 1 mois et une dernière pendant 2 mois.

Sur les veaux

Le sang a été prélevé en tubes héparinés à l'aide de cathéters permanents introduits dans la veine porte, une veine hépatique et une artère mésentérique (Bauchart *et al*, 1989). Le sang collecté a été centrifugé immédiatement après prélèvement, le plasma obtenu ayant été fractionné et placé à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à analyse; 87 prélèvements ont ainsi été réalisés en vue de la comparaison entre méthodes.

Analyses

Principes

La méthode automatisée de dosage de l'azote aminé qui est l'objet de cette étude est basée sur la formation d'un complexe coloré, dit complexe de Meisenheimer (Satake *et al*, 1966), formé par réaction de l'azote α -aminé des acides aminés plasmatiques avec l'acide 2,4,6, trinitrobenzène-1-sulfonique (TNBS), après déprotéinisation à l'acide trichloracétique et centrifugation. Le principe réactionnel a été décrit par Satake *et al* (1960). Cette méthode ne permet pas de doser la proline (qui n'a pas de groupe aminé libre), mais prend en compte les groupes

aminés des petits peptides (Freedman et Radda, 1968).

Le principe de la méthode de dosage des acides aminés libres par chromatographie sur résine échangeuse de cations est décrit par Moore *et al* (1958). Les acides aminés plasmatiques sont extraits par précipitation à l'acide sulfosalicylique à 5%, additionné de thiodiglycol à 2%. Les concentrations en acides aminés libres sont mesurées par colorimétrie à la ninhydrine, après chromatographie sur une résine échangeuse de cations (Prugnaud et Pion, 1976). Cette méthode ne permet pas de doser la cystéine, adsorbée sur l'albumine et d'autres protéines vectrices, ainsi que le tryptophane qui est détruit en milieu acide.

Automate

L'automatisation du dosage de l'azote aminé a été réalisée sur un analyseur à transfert monocal informatisé Isamat (Isa-Biologie, 94230 Cachan, France) dont la description et l'évaluation ont été effectuées par Pressac *et al* (1983).

Réactifs

- Agent de déprotéinisation : acide trichloracétique (TCA) (Merck, réf : 807) à 3,33%;
- réactif 1 : borate de sodium (Aldrich-Chimie, réf : 22,133-3) à 19,05 g/l, ajusté à différents pH suivant les essais. Le pH 9,3 a été finalement choisi,
- réactif 2 : 2,4,6, trinitrobenzène-1-sulfonique (Interchim, réf : OT846620) à différentes concentrations dans de l'eau distillée. Le réactif a été préparé juste avant emploi dans un flacon brun, la concentration de 1,4 g/l ayant correspondu aux conditions optimales de dosage,
- solution de dilution pour la gamme et le blanc de réaction : 500 mg d'azide de sodium (Merck, réf : 6688) ont été dissous dans 800 ml d'eau distillée, puis on a ajouté 0,28 ml d'acide sulfurique concentré (Merck, réf : 731) et on a complété à 1 l avec de l'eau distillée,
- gamme étalon : la gamme a été préparée à partir de DL-citrulline (Sigma, réf : C-6131) en utilisant comme diluant la solution azide-acide sulfurique décrite ci-dessus. La gamme titrait : 0; 1,25; 2,5; 5,0 mmol.l⁻¹,
- solutions d'acides aminés : une solution de chaque acide aminé a été préparée en utilisant

comme diluant la solution azide-acide sulfurique. Toutes les solutions ont été préparées à une concentration de 3 mmol.l^{-1} .

Mode opératoire

Déprotéinisation

Les échantillons et les points de gamme ont été déprotéinisés au TCA dans des cupules Eppendorf de 1,5 ml. A l'aide d'un diluteur Gilson, 100 μl de plasma ont été mélangés avec 300 μl de TCA. L'utilisation d'un diluteur permettait une meilleure reproductibilité de la déprotéinisation et le traitement d'un nombre important d'échantillons. Après agitation, les cupules ont été centrifugées pendant 2 min, puis 200 μl de surnageant ont été transférés dans les godets échantillons de l'analyseur ISAMAT.

Dosage

Le dosage a été effectué à 37 °C. Le volume de surnageant utilisé par l'analyseur a été de 20 μl , volume qui a été mélangé dans la cuve réactionnelle avec 200 μl de réactif 1, auxquels ont été ajoutés après 9 min d'incubation 100 μl de réactif 2. Les paramètres du micro-ordinateur Apple II ont été fixés à partir d'une disquette «point terminal» (Isa-Biologie, réf : 1.0.00.099).

Le développement de la réaction a été calculé à partir de 2 lectures de densité optique (DO) à 340 nm; la première lecture a été effectuée 10 s après adjonction du réactif 2, et la seconde 496 s après la première. La variation de DO a été utilisée pour calculer la concentration en azote aminé primaire des échantillons (mmol.l^{-1}) par comparaison avec les DO des étalons de citrulline. La méthode a permis la réalisation du dosage et l'affichage des résultats pour 26 échantillons, 2 blancs, 3 points de gamme et un plasma de contrôle en 30 min.

RÉSULTATS

Mise au point de la méthode automatisée

Au cours de la mise au point de la méthode automatisée, le facteur de coloration

(*F_c*) de chaque acide aminé a varié notablement en fonction du pH et de la concentration en TNBS. L'influence sur les *F_c* du pH a été testée entre 9,0 et 10,0, et celle de la concentration en TNBS entre 0,5 et 1,5 g/l, en comparaison avec la citrulline en tant qu'acide aminé de référence (*F_c* = 100%). Ont été retenues comme conditions analytiques optimales, le pH et la concentration en TNBS pour lesquels :

- le *F_c* moyen de l'ensemble des acides aminés a été le plus proche de 100%;
- le coefficient de variation (*CV*) des *F_c* a été le plus faible.

Le tableau I montre les *F_c* qui ont été mis en évidence à la concentration de 1,4 g/l de TNBS, pour un pH variant entre 9,2 et 9,5; c'est à pH 9,3 que les *F_c* moyens ont été les plus proches de 100% et ont eu le *CV* le plus faible. Dans ces conditions, jugées optimales, le *F_c* de l'alanine est resté néanmoins assez faible (76%) et ceux de la lysine (129%) et de l'ornithine (150%) élevés. Pour ces 2 derniers acides aminés, aucune des modalités testées n'a permis de faire évoluer significativement le facteur de coloration; par contre, l'augmentation du pH entraînait une tendance à l'augmentation du *F_c* de l'alanine (83% à pH 9,5).

Evaluation de la méthode automatisée

Linéarité

La linéarité a été évaluée à l'aide d'une solution de citrulline. La méthode s'est révélée linéaire entre 0,2 et 7 mmol.l^{-1} .

Répétabilité et reproductibilité

Elles ont été évaluées à l'aide de 3 plasmas de vaches à concentrations en azote aminé dites «faible», «moyenne» et

Tableau I. Facteurs de coloration (%) des acides aminés en fonction du pH du tampon à la concentration en TNBS de 1,4 g/l.

<i>pH du tampon</i>	9,2	9,3 ^a	9,4	9,5
Alanine ^b	67,7	76,0	77,3	83,0
Arginine	96,3	89,3	90,0	88,3
Asparagine	108,7	110,0	108,7	109,0
Citrulline	100,0	100,0	100,0	100,0
Acide cystéique	83,7	88,0	87,0	89,3
Acide glutamique	84,0	97,0	100,0	106,0
Glutamine	99,3	101,3	99,7	99,0
Glycine	113,0	112,0	112,7	111,7
Histidine	103,7	93,3	94,0	91,7
Isoleucine	102,0	102,3	103,3	102,3
Leucine	95,7	99,7	101,3	102,7
Lysine	126,7	129,0	132,0	135,3
Méthionine	112,0	106,7	107,3	107,0
Ornithine	145,0	149,7	153,0	157,3
Phénylalanine	106,7	95,7	96,3	94,0
Sérine	103,0	102,3	102,0	103,3
Taurine	113,7	106,0	106,7	106,3
Thréonine	113,0	105,0	107,7	106,3
Tyrosine	101,0	91,3	87,7	85,3
Valine	110,7	103,3	105,3	102,7
Moyenne (<i>n</i> = 20)	104,3	102,9	103,6	104,0
Ecart type	16,1	15,4	16,2	17,0
CV (%) ^a	15,4	15,0	15,7	16,3

^a Condition analytique retenue dans la méthode automatisée; ^b Le facteur de coloration (*F_c*) de chaque acide aminé est calculé en prenant pour référence la citrulline (*F_c* = 100%). ^c Coefficient de variation.

«forte» selon le protocole défini par la Société française de biologie clinique (Grafmeyer, 1978).

La répétabilité a été réalisée sur une seule série d'analyses, 9 déterminations étant réalisées sur chaque échantillon. Le coefficient de variation moyen a été de 1,8%; il a été de 2,4% pour le plasma «faible» ($2,08 \pm 0,05$ mmol.l⁻¹) de 1,7% pour le plasma «moyen» ($2,40 \pm 0,04$ mmol.l⁻¹) et de 1,2% pour le plasma «fort» ($4,32 \pm 0,05$ mmol.l⁻¹).

Pour la reproductibilité (tableau II), 10 séries d'analyses ont été effectuées sur une seule journée pour les 3 plasmas (9

déterminations par échantillon), en changeant les gammes et les réactifs entre chaque série et en interrompant chaque fois le fonctionnement de l'automate. Le coefficient de variation obtenu a été de 1,9% pour le plasma «faible», de 1,7% pour le plasma «moyen» et de 1,4% pour le plasma «fort».

Exactitude

Elle a été évaluée par la méthode des surcharges, à partir d'un plasma dosé 3 fois (titrant 1,99 mmol.l⁻¹), valeur considérée comme valeur de référence). Le plasma a

Tableau II. Reproductibilité de la méthode de dosage de l'azote α -aminé.

Série	n	Plasma «faible»		Plasma «moyen»		Plasma «fort»	
		Moyenne (écart type)	CV (%) ^a	Moyenne (écart type)	CV (%)	Moyenne (écart type)	CV (%)
1	9	2,11 (0,05)	2,4	2,39 (0,03)	1,3	4,37 (0,03)	0,7
2	9	2,27 (0,03)	1,3	2,48 (0,04)	1,6	4,33 (0,06)	1,4
3	9	2,07 (0,05)	2,4	2,38 (0,04)	1,7	4,39 (0,04)	0,9
4	9	2,08 (0,01)	0,5	2,41 (0,04)	1,7	4,36 (0,06)	1,4
5	9	2,13 (0,03)	1,4	2,45 (0,04)	1,6	4,45 (0,07)	1,6
6	9	2,07 (0,04)	1,9	2,37 (0,05)	2,1	4,24 (0,09)	2,1
7	9	2,08 (0,05)	2,4	2,40 (0,04)	1,7	4,32 (0,05)	1,2
8	9	2,13 (0,03)	1,4	2,44 (0,04)	1,6	4,37 (0,05)	1,1
9	9	2,13 (0,04)	1,9	2,44 (0,05)	2,0	4,37 (0,09)	2,1
10	9	2,07 (0,04)	1,9	2,40 (0,04)	1,7	4,29 (0,06)	1,4
Σ	90	2,11 (0,04)	1,9	2,42 (0,04)	1,7	4,35 (0,06)	1,4

^a Coefficient de variation.

ensuite été dilué au 1/2 avec un second plasma titrant 0,74 mmol.l⁻¹, pur ou ayant subi des dilutions dans de l'eau distillée. Les résultats (tableau III) montrent un pourcentage de récupération moyen de 100,8%.

Etude de la conservation

Les teneurs en azote aminé des échantillons gardés 6 h à température ambiante, puis centrifugés, ont présenté la plus forte variabilité; mais cette modalité de conservation n'a pas toutefois entraîné une variation significative de la concentration en azote α -aminé (tableau IV). Pour les prélèvements centrifugés immédiatement et dont le plasma a été stocké à température ambiante pendant 72 h, à 4 °C pendant 72 h, et pour ceux stockés à -20 °C pendant 2 mois, on n'a également noté au-

cune variation significative de la teneur en azote aminé; la baisse «maximale» n'a été que de 2,3% à -20 °C au bout de 2 mois.

Comparaison des méthodes

Afin de valider la méthode automatisée, on a effectué une comparaison de ces résultats avec ceux obtenus par chromatographie liquide, méthode dans laquelle on calcule la somme des concentrations en mmol.l⁻¹ des différents acides aminés.

Le coefficient de corrélation entre les concentrations déterminées par les deux méthodes sur 87 échantillons (fig 1) est élevé (0,953). La moyenne des concentrations de l'ensemble des échantillons a été de 2,89 mmol.l⁻¹ avec la méthode chromatographique, et de 3,66 mmol.l⁻¹ avec la méthode automatisée (+ 21,9%).

Tableau III. Résultats des tests de récupération obtenus à partir du mélange d'un plasma non dilué et d'un plasma à différentes dilutions (concentrations en azote aminé exprimées en mmol.l^{-1}).

<i>Plasma 1</i>	<i>Plasma 2</i>	<i>Concentration théorique (Ct)</i>	<i>Concentration mesurée (Cm)</i>	<i>Récupération (Cm/Ct x 100)</i>
(1,99 + 0,74)*/2		1,37	1,37	100
(1,99 + 0,40) /2		1,20	1,26	105
(1,99 + 0,34) /2		1,17	1,19	102
(1,99 + 0,30) /2		1,15	1,15	100
(1,99 + 0,27) /2		1,13	1,19	105
(1,99 + 0,24) /2		1,11	1,13	102
(1,99 + 0,20) /2		1,10	1,09	99
(1,99 + 0,17) /2		1,08	1,07	99
(1,99 + 0,13) /2		1,06	1,06	100
(1,99 + 0,10) /2		1,05	1,01	96

* Concentrations en azote aminé des plasmas 1 et 2 non dilués.

Tableau IV. Etude de la conservation de l'azote α -aminé (concentrations exprimées en mmol.l^{-1}).

<i>Modalité de conservation du plasma</i>	<i>Moyenne (écart type) n = 10</i>	<i>Valeurs extrêmes</i>
Echantillon frais	2,53 (0,51)	1,88–3,62
Centrifug différée*	2,76 (0,64)	1,94–3,92
Conservé 7 h, 20 °C	2,58 (0,50)	1,93–3,58
Conservé 24 h, 20 °C	2,53 (0,50)	1,85–3,55
Conservé 72 h, 20 °C	2,53 (0,49)	1,88–3,59
Conservé 24 h, 4 °C	2,52 (0,51)	1,86–3,58
Conservé 72 h, 4 °C	2,56 (0,52)	1,84–3,60
Conservé 15 j, –20 °C	2,52 (0,52)	1,81–3,54
Conservé 1 mois, –20 °C	2,55 (0,52)	1,86–3,63
Conservé 2 mois, –20 °C	2,52 (0,51)	1,84–3,55

* Echantillons laissés 6 h à température ambiante, puis centrifugés et dosés.

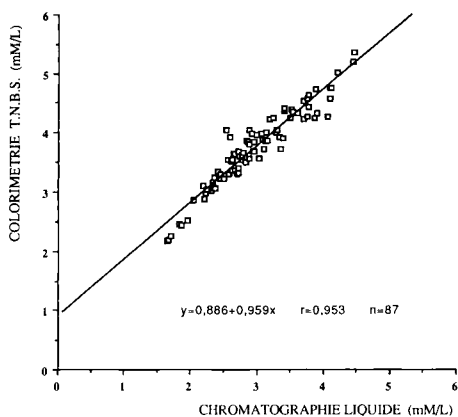


Fig 1. Corrélation des concentrations plasmatiques d'azote α -aminé primaire déterminées selon deux méthodes (chromatographie liquide et méthode colorimétrique automatisée, $n = 87$).

DISCUSSION

Seuls Palmer et Peters (1969) chez l'homme, et Rérat *et al* (1987) chez le porc ont publié et/ou évalué une méthode automatisée de dosage de l'azote α -aminé, en utilisant un analyseur à flux continu et la dialyse.

Pour ce qui est de la linéarité de la méthode, elle n'a été précisée que par Palmer et Peters (1969) : le domaine de linéarité s'étendait entre 0 et 5 mmol.l⁻¹ selon ces auteurs, alors que notre méthode s'est révélée linéaire entre 0,2 et 7 mmol.l⁻¹. En l'absence d'autres références sur la répétabilité et la reproductibilité, nos résultats apparaissent satisfaisants, avec des pourcentages de l'ordre de 2%. Quant à l'exactitude du dosage automatisé de l'azote α -aminé, elle n'a pas été testée par d'autres auteurs, mais elle paraît très bonne avec notre méthode automatisée,

puisque la récupération moyenne est de 100,8%. La corrélation entre notre méthode automatisée et la méthode chromatographique de référence est plus élevée ($r = 0,953$) que celle que nous avons calculée ($r = 0,847$) à partir des résultats de Palmer et Peters (1969), suite à la comparaison de leur méthode et de la méthode chromatographique.

En outre, les valeurs d'azote aminé trouvées à l'aide de notre méthode automatisée sont plus élevées de 18% en moyenne qu'avec la méthode par chromatographie. Ce résultat semble en contradiction avec ceux de Palmer et Peters (1969) et de Rérat *et al* (1987) qui ont obtenu des valeurs plus faibles, respectivement de 3,2% et de 14,3%; mais ces auteurs ont utilisé la technique de dialyse pour déprotéiniser les échantillons, technique dont le rendement moyen est, selon Palmer et Peters (1969) de 29%. Par ailleurs, Rérat *et al* (1987), ont utilisé comme acide aminé standard la L-leucine, dont le facteur de coloration est de 72% par rapport à la citrulline.

La conservation de l'azote α -aminé dans le plasma apparaît satisfaisante pendant au moins 2 mois à -20 °C, à condition de centrifuger immédiatement le prélèvement sanguin; on évitera ainsi:

- l'enrichissement du plasma par des acides aminés (taurine, acide glutamique, glutamine, acide aspartique, sérine, glycine) en provenance des leucocytes et des plaquettes (Perry et Hansen, 1969);
- les risques d'hémolyse, entraînant la contamination du plasma par des acides aminés érythrocytaires (thréonine, acide glutamique, sérine, glycine, ornithine) (Hainque *et al*, 1985).

L'écart entre les *Fc* des acides aminés est sans doute très difficile à réduire. En effet, les *Fc* plus élevés de la lysine et de l'ornithine sont sans doute à rapporter à leur structure moléculaire, qui comporte 2 groupements aminés libres; il ne paraît

donc pas possible de diminuer notablement ces F_c , quelles que soient les conditions analytiques. Quant au faible facteur de coloration de l'alanine, il semblerait pouvoir être augmenté en se plaçant à un pH plus élevé ($\geq 9,5$); mais s'il serait alors possible de rapprocher le F_c de l'alanine de 100%, on éloignerait en parallèle le F_c moyen des acides aminés de la valeur 100% et on augmenterait le CV.

En conclusion, il est tout à fait possible d'utiliser la méthode automatisée de dosage de l'azote α -aminé que nous avons décrite, chaque fois que l'on veut disposer de résultats fiables, dans un court délai et avec un faible coût; avec cette méthode, une personne peut en effet effectuer le dosage de 50 échantillons à l'heure, avec un coût unitaire en réactifs et consommables d'environ 2 F. Par ailleurs, cette méthode est plus simple à réaliser que les méthodes précédemment décrites (Palmer et Peter, 1969; Rérat *et al*, 1987) puisqu'elle n'implique ni dialyse, ni chauffage au delà de 37 °C, ni stabilisation du complexe coloré par acidification.

REMERCIEMENTS

A P Patureau-Mirand, pour son esprit de collaboration et pour avoir mis à notre disposition son savoir-faire et ses résultats expérimentaux.

RÉFÉRENCES

- Barnouin J, Fayet JC, Levieux D, Chacornac JP, Paccard P (1987) Ecopathologie et utilisation de marqueurs biochimiques en épidémiologie globale; application aux facteurs de risque de l'agression hépatique chez la vache. XXIIe Symp Int Zootech, Milan (Greppi GF et M Corti, ed) 43-53
- Bauchart D, Durand D, Laplaud PM, Forgez P, Goulinet S, Chapman MJ (1989) Plasma lipoproteins and apolipoproteins the preruminant calf, *Bos spp*: density distribution, physicochemical properties, and the *in vivo* evaluation of the contribution of the liver to lipoprotein homeostasis. *J Lipid Res* 30, 1399-1514
- Bogin E, Sommer H, Liappis N (1980) Free amino acids in serum of healthy cows and cows with parturition paresis. *Zbl Vet Med A* 27, 298-302
- Champredon C, Rémond B, Pion R (1976) Influence d'une sous-alimentation énergétique et azotée sur l'aminocidémie libre de vaches laitières en début de lactation. *C R Soc Biol Clermont-Ferrand*, 60-66
- Falloon MN, Rammel CG (1988) Amino acids in bovine sera. *NZ Vet J* 36, 96-98
- Foldager J, Huber JT, Bergen WC (1980) Factors affecting amino acids in blood of dairy cows. *J Dairy Sci* 63, 396-404
- Freedman RB, Radda GK (1968) The reaction of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid with amino acids. *Biochem J* 108, 383-391
- Palmer DW, Peters Jr (1969) Automated determination of free amino groups in serum and plasma using 2,4,6-trinitrobenzene sulfonate. *Clin Chem* 15, 891-901
- Pawlak M, Pion R (1968) Influence de la supplémentation des protéines de blé par des doses croissantes de lysine sur la teneur en acides aminés libres du sang et du muscle du rat en croissance. *Ann Biol Anim Biochem Biophys* 8, 517-530
- Perry T, Hansen S (1969) Technical pitfalls leading to errors in the quantitation of plasma amino acids. *Clin Chem Acta* 25, 53
- Pressac M, Villeval JL, Lefèbvre H, Aymard P (1983) Evaluation d'un analyseur à transfert ISAMAT. Etude de dosages sériques en cinétique et en point final. *Inforsci Biol* 9, 21-45
- Prugnaud J, Pion R (1976) Dosage des acides aminés dans les aliments. In: *Journ biochimie : l'analyse des acides aminés*. Beckman, Paris, 23 p
- Rérat A, Simoes Nunes C, Vaissade P, Roger L (1987) Comparaison de deux techniques d'estimation (ninhydrine vs TNBS) de l'azote des acides aminés circulants, appliquées à l'étude de l'absorption intestinale de solutions d'acides aminés libres ou de petits peptides. *Reprod Nutr* 27, 955-966

- Satake K, Okuyama T, Ohashi M, Shinoda T (1960) The spectrophotometric determination of amino acid and peptide with 2,4,6-trinitrobenzene 1-sulfonic acid. *J Biochem* 47, 654-660
- Satake K, Take T, Matsuo A, Tazaki K, Hiraga Y (1966) Amino acid analyzer using 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid. *J Biochem* 60, 12-16
- Zimmerman RA, Scott HM (1965) Interrelationship of plasma amino acid levels and weight gain in the chick as influenced by suboptimal and superoptimal dietary concentration of single amino acids. *J Nutr* 87, 13-18