



HAL
open science

MICRO-DOSAGE AUTOMATISÉ SANS DÉPROTÉINISATION DU 3-HYDROXYBUTYRATE PLASMATIQUE CHEZ LES BOVINS

J. Barnouin, N. El Idilbi, Y. Chilliard, J.P. Chacornac, Renée Lefaiivre

► **To cite this version:**

J. Barnouin, N. El Idilbi, Y. Chilliard, J.P. Chacornac, Renée Lefaiivre. MICRO-DOSAGE AUTOMATISÉ SANS DÉPROTÉINISATION DU 3-HYDROXYBUTYRATE PLASMATIQUE CHEZ LES BOVINS. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1986, 17 (2), pp.129-139. <hal-00901640>

HAL Id: hal-00901640

<https://hal.science/hal-00901640v1>

Submitted on 11 May 2020

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.



HAL Authorization

MICRO-DOSAGE AUTOMATISÉ SANS DÉPROTÉINISATION DU 3-HYDROXYBUTYRATE PLASMATIQUE CHEZ LES BOVINS

J. BARNOUIN¹, N. EL IDILBI¹, Y. CHILLIARD², J.P. CHACORNAC¹ et Renée LEFAIVRE²

1 : Laboratoire d'Éco-Pathologie, INRA-CRZV Theix, 63122 Ceyrat, France.

2 : Laboratoire de la Lactation, INRA-CRZV Theix, 63122 Ceyrat, France.

Summary

AN AUTOMATED MICRO-METHOD FOR THE DETERMINATION OF 3-HYDROXYBUTYRATE IN BOVINE PLASMA WITHOUT ACID PRECIPITATION.-- An automated method for the determination of plasma 3-hydroxybutyrate (3-HB) is described. The enzymatic principle of Williamson and Mellanby is applied to a discrete computerized analyzer (Isamat, Isa-Biologie, 94230 Cachan, France). Using this method, a single operator can determine each day the 3-HB content of 500-600 bovine plasma samples, without perchloric acid precipitation and without adding hydrazin. Aceto-acetate and acetone don't interfere in 3-HB determination. Addition of oxalate (5 mM) in Tris buffer abolishes the interference of lactate dehydrogenase (LDH). The method is accurate, with a precision of 2.8 %, linear over the range 0.05-8 mM, low in cost because it needs small volumes of reagent, and correlates well with results from standard end-point manual method (common variance between the two methods: 94-98 %). The method allows to use plasma 3-HB determination for assessing nutritional state of cow herds after a convenient standardization of sampling.

Le 3-hydroxybutyrate plasmatique (3-HB) représente plus de 80 % des corps cétoniques chez la vache (Filar, 1979). Son dosage permet d'apprécier l'état de nutrition énergétique des animaux, et notamment de dépister la stéatose et la cétose sub-cliniques (Roberts *et al.*, 1981; Whitaker *et al.*, 1983; Coulon *et al.*, 1984).

Or ces troubles sub-cliniques, bien que mal quantifiés (Grohn *et al.*, 1983), semblent fréquents chez les vaches laitières; au contraire, l'acétonémie clinique apparaît peu fréquente (1 cas par an pour 100 vaches en France d'après Barnouin *et al.*, 1983).

Pour permettre une meilleure appréciation des

états stéatosiques et subcliniques dans les troupeaux, il convient donc de mettre à la disposition des utilisateurs une méthode de dosage du 3-HB répondant aux contraintes de simplicité et de faible coût qu'implique la pratique vétérinaire.

Or la nécessité, chez les bovins, de déprotéiniser les échantillons (André et Coppin, 1982; Knox et Jones, 1984) si l'on utilise le principe de dosage enzymatique de Williamson et Mellanby (1974) est un frein non négligeable à la simplification de la procédure analytique. Ceci nous a amenés à mettre au point et à évaluer un micro-dosage du 3-HB plasmatique entièrement automatisé et n'incluant pas d'étape de déprotéinisation.

Matériel et Méthodes

Animaux

Des vaches laitières d'un troupeau expérimental ont été utilisées durant deux années (1982-1983).

En 1982, on s'est servi de 21 vaches Holstein x Frisonnes ayant reçu une alimentation à base d'ensilage de maïs *ad libitum* ou en quantité fortement restreinte, et ayant produit des quantités très variables de lait (0 à 40 kg) selon l'animal et le stade physiologique (de 6 semaines avant vêlage à 18 semaines après).

En 1983, on a utilisé de 50 vaches de même race et de stades physiologiques comparables, alimentées *ad libitum* ou fortement sous-alimentées dans le cadre d'un essai factoriel 2 x 2 sur les niveaux d'apport énergétique avant et après mise-bas.

On a choisi cette population de vaches afin de disposer, pour comparer les méthodes de détermination du 3-HB plasmatique, de valeurs ayant une dispersion qui soit supérieure à celle que l'on rencontre couramment dans les troupeaux de rente.

Prélèvements

1. Méthode automatisée:

Le sang jugulaire hépariné (5 U/ml) a été centrifugé immédiatement après prélèvement. Le plasma obtenu a été placé à -20 °C.

2. Méthode manuelle:

Immédiatement après centrifugation, 1 volume du même plasma a été pipeté dans 2 volumes d'acide perchlorique (0,6 M). Le défécât a été conservé à -20 °C.

Analyses

1. Principe:

Il est basé sur la méthode de Williamson et Mellanby, c'est-à-dire la mesure de l'absorption du NADH produit

au cours de la transformation, 3-hydroxybutyrate + NAD \rightleftharpoons acétoacétate + NADH + H⁺, catalysée par la 3-HB-deshydrogénase (3-HB-DH).

2. Automate:

L'automatisation a été réalisée sur un analyseur à transfert mono-canal informatisé Isamat (Isa-Biologie, 94 230 Cachan, France) dont la description et l'évaluation ont été effectuées par Pressac *et al.* (1983).

3. Réactifs:

3.1. Méthode automatisée:

Réactif 1: tampon Tris (hydroxyméthyl) - aminométhane (Merck, Réf. 8387) à 0,2 M ajusté à pH 9,5 avec HCl 3N; de l'oxalate de potassium (5 mM; Prolabo, Réf. 26 886) a été ajouté dans le tampon pour éliminer l'interférence de la lactate deshydrogénase.

Réactif 2: une solution de NAD à 25 mM (Sigma, Réf. N 8881) a été préparée dans le réactif 1. De la 3-HB-DH (Boehringer, Réf. 127833; activité spécifique 3U/mg de protéine à 25 °C, 5 mg/ml; contaminants: LDH < 0,1 % et MDH < 5 %) a été ajoutée extemporanément à raison de 71,4 µl/ml.

Gamme étalon: la gamme était préparée à partir de D-L-3-hydroxybutyrate de sodium contenant 49 % de D-3-hydroxybutyrate (Sigma, Réf. H 6501); les points de gamme titraient 0 (blanc gamme), 0,5 et 3 mM de D-3-hydroxybutyrate.

3.2. Méthode manuelle:

Réactif 1: tampon Tris (Prolabo, Réf. 28 812) à 0,17 mM, hydrazine hydrate (Prolabo, Réf. 24 693) à 6 %; l'hydrazine réagit avec l'acétoacétate, ce qui déplace l'équilibre de la réaction. Le pH du réactif a été ajusté avec HCl N, de façon à ce que le pH du milieu réactionnel soit égal à 8,5 (5 volumes de réactif I et 1 volume d'acide perchlorique 0,4 M).

Réactif II: une solution de NAD à 1,5 mM (Sigma, Réf. N 8881) a été préparée dans le réactif I et utilisée pour la préparation des blancs (sans enzyme).

PARAMETRES

```

NOMBRES DE BLANC :2
LE BLANC EST-IL UN ETALON :1
NOMBRES D'ETALONS :3
MODE UTILISE :2
NB DE TOURS DE CHAUFFAGE :2
NB DE TOURS D'ATTENTE :0
NB DE TOURS A IGNORER :0
PRECHAUFFAGE BRAS :1
VOLUME PRELEVEMENT % :12
VOLUME DILUANT % :24
VOLUME REACTANT MICRO L :50
VITES. SERINGUE PREL. :7
VITESSE SERINGUE DILUANT :6
LIMITE INFERIEUR BLANC :-50
LIMITE SUPERIEUR BLANC :1000
LIMITE DE LINEARITE (G) :6
COEF. CONVERSION G-SI :0
NOMBRES DE DECIMAL :2
FILTRE :340
TEMPERATURE :30
OPTION 1 :0=NON ,1=OUI :0
NOM ANALYSE :B OH BUTYRATE

```

Fig.1. -- Paramètres du micro-ordinateur SIM/SILEX pour la détermination du 3-hydroxybutyrate plasmatique.

Tableau 1. -- Teneurs en 3-hydroxybutyrate plasmatique des populations de vaches utilisées dans la comparaison entre méthodes

Teneur en 3-hydroxybutyrate	Année			
	1982		1983	
	méthode de comparaison		méthode de comparaison	
	Automatique	Manuelle	Automatique	Manuelle
Nombre d'échantillons	253	253	382	382
Moyenne (mM)	0,681	0,640	1,102	0,992
Minimum (mM)	0,150	0,210	0,300	0,100
Maximum (mM)	4,670	4,420	8,160	8,910
Coefficient de variation (%)	68	66	95	111

Réactif III : on a ajouté extemporanément au réactif II de la 3-HB-DH (Sigma, Réf. H 6126 ; activité spécifique 6,3 u/mg de protéine à 37 °C, 5 mg/ml ; contaminants : LDH < 0,2 % et MDH < 5 %) à raison de 3 µl/ml.

Gamme étalon : elle était préparée à partir de D-L-3 hydroxybutyrate de sodium ; les points de gamme titraient 0 (blanc gamme), 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5 et 2 mM de D-3-hydroxybutyrate dans de l'acide perchlorique 0,4 M.

4. Mode opératoire :

4.1. Méthode automatisée :

Le dosage était effectué à 30 °C. On utilisait par analyse 6 µl d'échantillon (plasma) éventuellement enrichi en LDH (Boehringer, Réf. 127 221) pour certaines mises au point. L'échantillon était mélangé à 240 µl de réactif 1, auxquels étaient ajoutés, après 5 à 8 minutes d'incubation, 60 µl de réactif 2. Les paramètres du micro-ordinateur Sim/Silex (Isa-Biologie) étaient fixés selon la figure 1 à partir d'une disquette 6 pouces « point terminal » (Isa-Biologie, Réf. 1.0.00.099).

Le développement de la réaction a été apprécié à 340 nm par deux mesures de Densité Optique (DO), la première effectuée 13 secondes après adjonction du réactif déclenchant, la seconde, 69 secondes après la première, cette variation de DO étant utilisée pour le calcul des concentrations de 3-HB. La méthode a permis une cadence de 80 à 110 échantillons par heure pour un opérateur (500 à 600 échantillons par jour toutes manipulations comprises).

La gamme et un plasma de contrôle de concentration connue ont été insérés tous les 26 échantillons, ainsi qu'un blanc « gamme » dont l'éventuelle absorption a été déduite automatiquement de la variation de DO mesurée pour chaque échantillon.

4.2. Méthode manuelle :

Le dosage, en point terminal, a été effectué à température ambiante. On a utilisé par analyse 100 µl de défécats mélangés à 500 µl de réactif 3. Après trois heures

d'incubation, on a lu l'absorption à 366 nm à l'aide d'un photomètre à filtres. Pour chaque analyse, on a réalisé parallèlement un blanc (100 µl de défécats et 500 µl de réactif 2 sans enzyme) et on a déduit sa valeur après incubation. La gamme a été traitée de la même manière, en triple, pour chaque série d'analyses.

5. Dosage de la lactate-deshydrogénase

Le dosage a été effectué sur plasma hépariné, à 30 °C, sur analyseur Isamat à partir d'un coffret Boehringer (Réf. 124 893). Le NADH consommé a été lu à 340 nm et à pH 7,5 en présence de pyruvate, selon le principe réactionnel suivant : Pyruvate + NADH + H⁺ ↔ L-lactate + NAD⁺.

Résultats

1. Comparaison de la méthode automatisée sans déprotéinisation et de la méthode manuelle avec déprotéinisation

Afin d'évaluer la méthode automatisée, une comparaison a d'abord été faite entre cette méthode et une méthode manuelle classique sur défécats ; de manière générale, les teneurs moyennes en 3-HB ont été plus fortes et plus variables en 1983 qu'en 1982 (tabl. 1).

Les valeurs mesurées ont été un peu plus élevées (0,04 en 1982 et 0,11 mM en 1983) avec la méthode automatisée. Sur l'ensemble des 635 plasmas entrant dans la comparaison, la méthode automatisée donnait des résultats supérieurs en moyenne de 9,6 % (0,075 mM) à ceux obtenus avec la méthode manuelle avec déprotéinisation.

Les équations de régression étaient toutefois proches de la bissectrice et la différence sur les moyennes était due en 1982 à la pente de la

Tableau 2. -- Relations entre les résultats obtenus par les méthodes automatisée ou manuelle

	Année	
	1982	1983
Équation de régression (a)	$y = 1,10x - 0,023$	$y = 0,95x + 0,157$
r^2 (x 100)	94	98
Écart-résiduel de la régression de y sur x (S_{yx}) de x sur y (S_{xy})	0,112 0,102	0,147 0,154
Coefficient de variation résiduel (%) de y sur x de x sur y	16 16	13 15

a: résultats obtenus par les méthodes automatisée (y) et manuelle (x), l'équation est celle de la droite des moindres rectangles (meilleur ajustement au nuage de points, c'est-à-dire où y et x jouent le même rôle) (Dagnélie, 1978).

variation de la
densité optique
(340 nm)

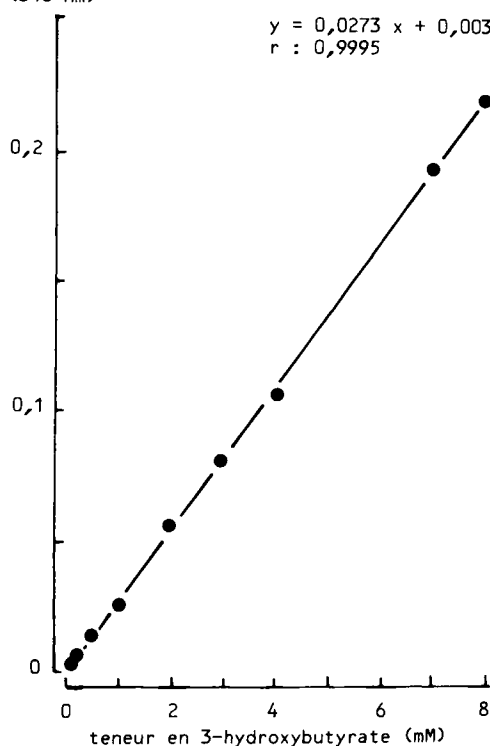


Fig. 2. -- Linéarité du dosage du 3-hydroxybutyrate en solution aqueuse.

droite et en 1983 à l'ordonnée à l'origine (tabl. 2). Par ailleurs, la variance commune (r^2) était élevée (94 ou 98 %), la corrélation entre les méthodes apparaissant donc satisfaisante.

Enfin, les corrélations calculées entre les taux plasmatiques de 3-HB et les apports et les bilans UFL étaient pratiquement identiques avec les deux méthodes. Elles étaient négatives et significatives, mais faiblement ($r = -0,32$ et $-0,41$ avec la méthode automatisée, $r = -0,32$ et $-0,40$ avec la méthode manuelle), en raison de la double origine du 3-HB, digestion de la ration d'une part, lipomobilisation et cétogénèse hépatique de l'autre.

2. Mise au point de la méthode automatisée

2.1 -- Spécificité et élimination de l'interférence de la lactate-deshydrogénase (LDH)

Les interférences éventuelles de l'acéto-acétate et l'acétone ont d'abord été testées à l'aide de solutions aqueuses d'acéto-acétate et d'acétone à des concentrations comprises entre 0,1 et 2 mM: aucune interférence n'a été mise en évidence.

L'étude de l'interférence de la LDH, transformant le NAD parallèlement à la 3-HB deshydrogénase, a été effectuée à partir de 25 plasmas bovins dont 3 enrichis en LDH; la comparaison des méthodes avait en effet montré que les valeurs mesurées étaient supérieures avec la méthode automatisée sans déprotéinisation, ce qui laissait supposer un certain manque de spécificité de cette méthode, attribuable à la présence de LDH dans les plasmas.

Des blancs sans enzyme (3-HB-DH) ont donc été réalisés, leurs variations de DO déterminées

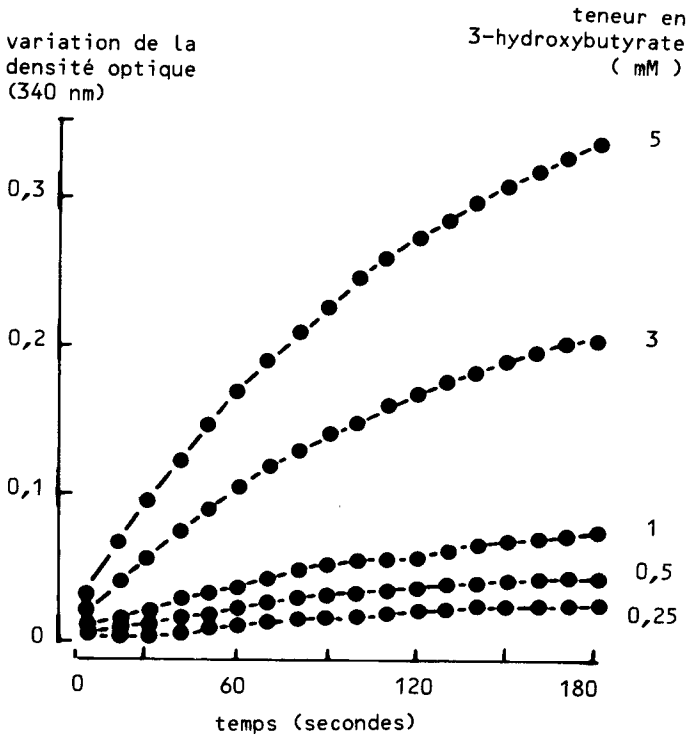


Fig.3. -- Cinétique d'absorption du NADH produit avec des solutions aqueuses de 3-hydroxybutyrate.

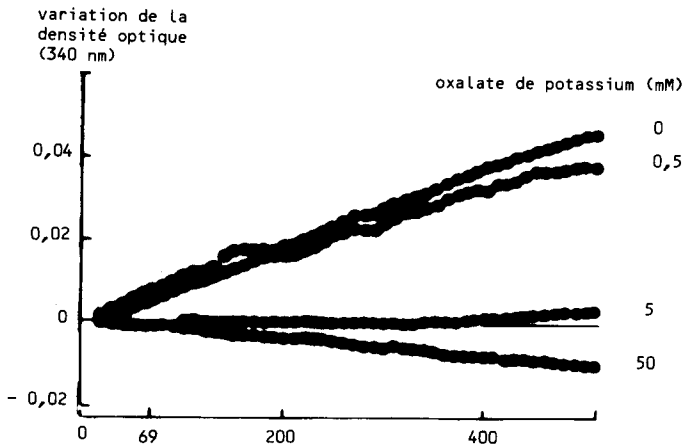


Fig.4. -- Cinétique d'absorption du NADH produit avec un blanc échantillon sans 3-hydroxybutyrate deshydrogénase selon la concentration d'oxalate de potassium dans le tampon.

Tableau 3. — Variabilités intra- et inter-séries de la méthode de dosage automatisée du 3-hydroxybutyrate plasmatique

Numéro de série	3-hydroxybutyrate plasmatique (mM) concentration			
	Faible		Élevée	
	Moyenne (écart-type)	Coefficient de variation	Moyenne (écart-type)	Coefficient de variation
1	0,33 (0,007)	2,1	0,95 (0,004)	0,4
2	0,36 (0,015)	4,2	0,97 (0,010)	1,0
3	0,38 (0,018)	4,7	0,99 (0,030)	3,0
4	0,36 (0,005)	1,4	1,00 (0,040)	4,0
5	0,35 (0,008)	2,3	0,98 (0,010)	1,0
6	0,35 (0,015)	4,3	0,99 (0,010)	1,0
7	0,37 (0,005)	1,4	0,99 (0,007)	0,7
8	0,36 (0,009)	2,5	1,02 (0,010)	1,0
9	0,36 (0,009)	1,7	1,02 (0,026)	2,6
10	0,36 (0,007)	1,9	1,00 (0,016)	1,6
Total	0,36 (0,013)	3,6	0,99 (0,021)	2,1

et leurs valeurs calculées 69, 345 et 759 secondes après ajout du réactif déclenchant (réactif 2).

Dans nos conditions de dosage (69 secondes), la valeur moyenne des blancs sans enzyme était de $0,063 \pm 0,132$ mM d'équivalent 3-HB, contre $0,365 \pm 0,221$ mM à 345 secondes et $0,501 \pm 0,308$ mM à 759 secondes. En ne considérant que les 22 plasmas non enrichis, la valeur des blancs était de $0,048 \pm 0,125$ mM à 69 secondes, valeur qui correspondrait à la surestimation moyenne entraînée par la LDH (ou d'autres interférences) dans nos conditions analytiques.

Le dosage de la LDH, effectué sur les 25 plasmas, a indiqué par ailleurs des taux plasmatiques variant entre 167 et 1442 U/l pour les plasmas non enrichis et entre 41 230 et 42 429 U/l pour les plasmas enrichis. La corrélation entre les valeurs des blancs et les taux de LDH est apparue faiblement significative en considérant les 25 plasmas ($r = 0,443$; $P < 0,05$) ou les seuls plasmas non enrichis ($r = 0,467$; $P < 0,05$); en fait, l'activité de la LDH mesurée à partir du principe réactionnel que nous avons employé (transformation du pyruvate en lactate) n'est pas l'activité en cause dans le processus d'interférence -- où la LDH intervient en transformant le lactate en pyruvate -- ce qui rend sans doute aléatoire un calcul de corrélation.

L'interférence de la LDH dans la détermination du 3-HB semble donc faible dans nos conditions

analytiques, mais elle n'est toutefois pas nulle. Pour essayer d'éliminer cette interférence, un inhibiteur compétitif de la LDH, l'oxalate de potassium, dont l'action est maximale à pH 9,3, a été utilisé et ajouté au tampon Tris-HCl.

La figure 4 montre l'évolution dans le temps, mesurée toutes les 10 secondes sur un plasma bovin non enrichi en LDH, de la DO du blanc sans enzyme, sans adjonction d'oxalate et avec adjonction à 0,5, 5 et 50 mM.

L'adjonction d'oxalate à 5 mM a permis d'annuler strictement la DO du blanc plasma sans enzyme jusqu'à environ 280 secondes après le début de la mesure, ce qui est satisfaisant dans nos conditions d'analyse. La mesure de la DO du plasma avec enzyme (3-HB-DH), en l'absence et en présence d'oxalate à 5 mM (fig. 5) a confirmé l'élimination de l'interférence due à la LDH. En l'absence d'oxalate, plus le temps de développement de la réaction choisi est grand, plus l'interférence est relativement importante, la transformation du NAD par la LDH évoluant selon un modèle linéaire (fig. 4) alors que sa transformation par la 3-HB-DH est d'allure asymptotique (fig. 5).

Le tableau 6 indique qu'il existait une surestimation de 10,9% (0,069 mM) des valeurs des 25 plasmas dosés sans oxalate par rapport à celles des défécats dans nos conditions de dosage (69 secondes), différence expliquée par la valeur du blanc sans enzyme; sur les 22 plasmas non enri-

Tableau 4. -- Pourcentages de récupération du 3-hydroxybutyrate

	3-hydroxybutyrate (mM)		
	Valeur		Récupération (vm/vt) × 100
	Théorique (vt)	Mesurée (vm)	
Dilution au 1/2 sans ajout	0,61	0,60	98,4
avec ajout de 3-hydroxybutyrate (mM)			
0,5	0,86	0,82	95,3
1	1,11	1,10	99,1
3	2,11	2,25	106,6
5	3,11	3,32	106,8
10	5,61	5,39	96,1

chis et dans les mêmes conditions, la surestimation moyenne était de 0,063 mM (+ 9,9 %), ce qui était très proche de la différence mise en évidence entre les méthodes automatisée et manuelle lors de la comparaison portant sur 635 échantillons (+ 9,6 % et + 0,075 mM avec la méthode automatisée). L'addition de 5 mM d'oxalate de potassium a par contre permis d'obtenir des valeurs comparables entre défécats et plasmas (tabl. 6) : l'écart moyen entre les valeurs (- 0,014 mM) a été en effet inférieur à la sensibilité minimum de la méthode définie plus loin (0,025 mM).

Enfin, le tableau 6 montre que la valeur moyenne des plasmas après soustraction du blanc sans enzyme (0,640 mM) était très proche de la valeur moyenne des défécats (0,634 mM).

2.2 -- Linéarité, cinétique de réaction

La linéarité de la méthode automatisée a été évaluée à l'aide de solutions aqueuses de 3-hydroxybutyrate (fig. 2); la méthode s'est révélée linéaire de 0,05 à 8 mM ($r = 0,9995$). La cinétique de la réaction, mesurée toutes les 10 secondes et pour des concentrations de 3-HB en solution aqueuse comprises entre 0,25 et 5 mM est précisée par la figure 3. Le mode opératoire choisi (mesure de la vitesse de réaction entre 13 et 82 secondes après ajout du réactif déclenchant) a permis de réduire le temps d'analyse par rapport à une mesure en point terminal, tout en entraînant selon nos observations une meilleure linéarité et une plus grande reproductibilité du dosage.

2.3 -- Précision, sensibilité

La précision a été évaluée à l'aide de deux plasmas de vache à concentrations en 3-HB dites

« faible » et « forte ». Dix séries de trois déterminations ont été effectuées sur les deux plasmas sur une seule journée, en changeant les gammes et les réactifs entre chaque série et en interrompant à chaque fois le fonctionnement de l'automate.

Le tableau 4 indique un coefficient de variation (CV) entre séries (reproductibilité) de 3,6 % pour le plasma « faible » et de 2,1 % pour le plasma « fort ». Les CV intra séries (répétibilité) ont varié selon les séries entre 1,4 et 4,7 % pour le plasma « faible » et entre 0,4 et 4 % pour le plasma « fort ».

Un essai de répétibilité sur solutions aqueuses de 3-HB (10 répétitions) a indiqué un CV de 3,1 % pour une concentration basse (0,5 mM) et de 1,3 % pour une concentration élevée (2 mM).

La précision a été aussi déterminée par des tests de récupération (tabl. 5) effectués à partir d'un plasma dosé 10 fois dans la même série (valeur: $1,21 \pm 0,01$ mM, considérée comme valeur de référence). Le plasma a été ensuite dilué au 1/2 dans de l'eau bi-distillée (modalité 1) puis ont été ajoutées au plasma dilué, à volume égal, des solutions aqueuses de 3-HB à 0,5, 1, 3, 5 et 10 mM (modalités 2 à 6).

Dans ces conditions, le pourcentage moyen de récupération pour les 6 modalités a été de 100,4 %.

Enfin, la sensibilité de la méthode a pu être évaluée en déterminant la différence de valeur entre deux échantillons en dessous de laquelle les valeurs des échantillons ne peuvent être considérées comme statistiquement différentes au risque de 5 % : cette valeur était de 0,025 mM en considérant la reproductibilité du plasma « faible »

Tableau 5. -- Influence de l'oxalate de potassium sur l'interférence de la lactate-deshydrogénase dans le dosage du 3-hydroxybutyrate

	Moyenne (mM) (écart-type)	Différence avec le défécate	
		Absolue (mM)	Relative (%)
Défécate (a)	0,634 (0,288)
Plasma			
3-hydroxybutyrate-deshydrogénase			
sans (b)	0,063 (0,132)
avec	0,703 (0,310)	+ 0,069	+ 10,9
oxalate (c)			
50 mM	0,665 (0,286)	+ 0,031	+ 4,9
5 mM	0,620 (0,288)	- 0,014	- 2,2

a: la détermination du 3-hydroxybutyrate sur le défécate était effectuée avec un analyseur Isamat afin de n'étudier que l'effet «oxalate» et d'éliminer l'effet «méthode».

b: blanc sans enzyme.

c: concentration d'oxalate de potassium dans le tampon Tris; dosages en présence de 3-hydroxybutyrate-deshydrogénase.

et de 0,041 mM si l'on considère celle du plasma «fort».

2.4 -- Influence de la décongélation-congélation

Pour préciser la faisabilité du dosage dans certaines conditions de conservation, cinq aliquotes de 5 plasmas ont été congelées à -20°C juste après prélèvement et la concentration en 3-HB mesurée après 1 à 5 décongélation étalées sur 5 jours; les plasmas restaient 1 heure à température ambiante avant recongélation, modalité sans influence sur le taux de 3-HB.

L'aliquote subissant une seule décongélation-congélation l'a subie le 5ème jour, l'aliquote en subissant 2 a été décongelée les 1er et 5ème jours et ainsi de suite jusqu'à la 5ème aliquote, qui a été donc décongelée-congelée chaque jour. Toutes les aliquotes ont été dosées dans la même série, immédiatement après la dernière décongélation.

Le tableau 6 montre que le nombre de décongélation-congélation n'a pas eu d'influence sur le taux de 3-HB plasmatique.

Discussion

Les valeurs moyennes de 3-HB que nous avons mesurées sur le troupeau expérimental sont supérieures en moyenne en 1983 à celles déterminées par différents auteurs sur des populations de vaches «normales» (0,66 mM par Fischer *et al.*, 1975; 0,43 mM pour Filar, 1979; 0,56 mM pour Tyopponen et Kauppinen, 1980; 0,73 mM pour Fayet *et al.*, 1986).

La raison des valeurs plutôt élevées que nous

avons trouvées est la présence au sein des animaux prélevés de lots de vaches grasses au vêlage et sous-alimentées en début de lactation (B. Rémond, Y. Chilliard, S. Larnicol, non publié); ce fait explique par ailleurs la grande variabilité des teneurs en 3-HB des échantillons étudiés (tabl. 1).

La méthode de dosage automatisée du 3-HB sans déprotéinisation que nous avons décrite a un domaine de linéarité supérieur aux méthodes automatisées précédemment publiées (Hansen et Freier, 1978; Li *et al.*, 1980; Knox et Jones, 1984). La spécificité vis-à-vis de l'acéto-acétate que nous avons mise en évidence a été également constatée par Hansen et Freier (1978), Li *et al.* (1980) et Knox et Jones (1984).

Quant à l'interférence avec la LDH qui obligerait, selon Knox et Jones (1984) à déprotéiniser les plasmas bovins, elle est éliminée dans notre méthode par l'addition d'oxalate de potassium (5 mM) dans le tampon Tris.

La comparaison de méthodes, effectuée en l'absence d'oxalate sur 635 échantillons, indique pourtant une corrélation assez satisfaisante entre les valeurs obtenues à partir des plasmas et des défécats: ceci peut être d'abord expliqué par la relativement faible interférence de la LDH dans nos conditions d'analyse (faible temps de développement de la réaction); on peut ensuite penser qu'au sein du troupeau expérimental qui a été utilisé pour la comparaison (composé d'animaux assez homogènes quant à la race, le mode de conduite et l'état de santé) les taux plasmatiques de LDH n'étaient pas très différents entre les animaux. Par ailleurs, la différence moyenne enregistrée entre les deux méthodes est logique,

Tableau 6. -- Influence de la décongélation-congélation sur la teneur plasmatique en 3-hydroxybutyrate (méthode automatisée)

Nombre de congélations-décongélation	Concentration de 3-hydroxybutyrate (mM) (nombre d'échantillons : 5)	
	Moyenne (écart-type)	Valeurs extrêmes
1	0,696 (0,207)	0,52 – 1,03
2	0,702 (0,250)	0,46 – 1,09
3	0,722 (0,296)	0,52 – 1,06
4	0,690 (0,240)	0,43 – 1,06
5	0,694 (0,194)	0,54 – 0,96

compte-tenu du fait que le blanc échantillon sans enzyme n'était déduit que dans le cas de la méthode manuelle.

Si l'adjonction d'oxalate paraît déterminante pour assurer la spécificité de la méthode dans le cas de la vache, des études complémentaires sont à effectuer, principalement chez les autres espèces, afin de préciser chaque fois la modalité optimale de blocage de l'activité de la LDH.

En effet, Knox et Jones (1984) ont montré, dans leurs conditions analytiques, que la surestimation du taux de 3-HB due à la LDH ou à des facteurs associés -- en l'absence de déprotéinisation -- était différente selon l'espèce (forte chez

les ovins et les bovins, faible chez le cheval et le poulet, nulle chez le rat et l'homme); ceci peut être dû à la distribution différente des isoenzymes selon l'espèce et à leur aptitude différente à transformer le NAD dans les systèmes lactate-pyruvate ou glyoxylate-oxalate (Zewe et Fromm, 1965; Heck, 1969; Warren, 1970). La faible corrélation que nous avons observée entre les valeurs des blancs sans 3-HB-DH et les taux de LDH fait pourtant penser que d'autres facteurs pourraient être en cause dans l'interférence, en particulier la teneur du plasma en lactate.

La comparaison de méthodes (manuelle avec hydrazine à pH 8,5 et automatisée sans hydrazine

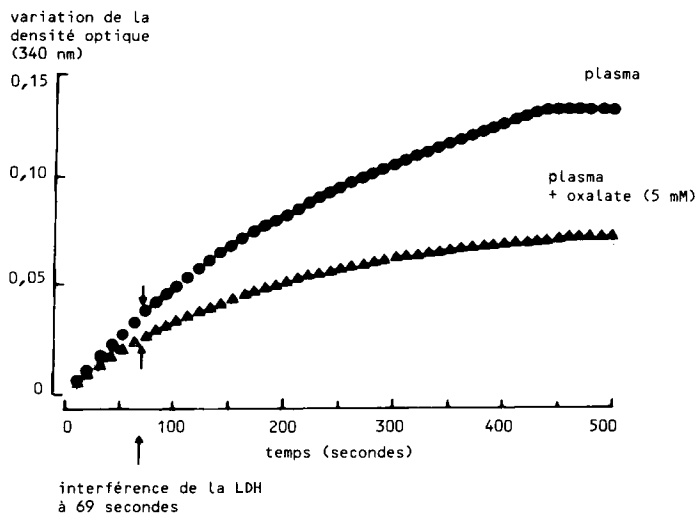


Fig.5. -- Cinétique d'absorption du NADH produit avec un plasma bovin en absence ou en présence d'oxalate de potassium dans le tampon et en présence de 3-hydroxybutyrate deshydrogénase.

à pH 9,5) semble indiquer par ailleurs l'absence d'intérêt à effectuer le dosage en présence d'hydrazine dans les conditions de la méthode automatisée. Dans d'autres conditions (André et Coppin, 1982; Knox et Jones, 1984) l'hydrazine serait nécessaire alors que Gurtler *et al.* (1984) n'ont pas mis en évidence son utilité.

La répétabilité et la reproductibilité de la méthode automatisée apparaissent satisfaisantes étant peu supérieure à celles des méthodes précédemment publiées, pour des concentrations en 3-HB comprises entre 0,3 et 1 mM (Li *et al.*, 1980; Moore *et al.*, 1982; André et Coppin, 1982; Knox et Jones, 1984) et entre 2 et 4 mM (Hansen et Freier, 1978; Li *et al.*, 1980). Les pourcentages de récupération apparaissent comparables à ceux indiqués par Li *et al.* (1980), Moore *et al.* (1982) et Knox et Jones (1984).

La non-influence de la décongélation-congélation, non analysée par ailleurs, accentue la faisabilité du dosage du 3-HB, considéré par ailleurs comme stable, notamment après congélation (Brivet et Moatti, 1981; El Idilbi, 1981; André et Coppin, 1982; Custer *et al.*, 1983).

La miniaturisation de la technique entraîne une plus faible consommation de 3-hydroxybutyrate deshydrogénase (principale responsable du coût analytique) qu'avec les autres méthodes et permet d'effectuer le dosage avec un volume d'échantillon très faible, soit 6 µl contre 10 µl pour Knox et Jones (1984) et 15 à 100 µl pour les autres auteurs.

L'automatisation sur l'analyseur Isamat implique en outre une très grande vitesse d'analyse, sur laquelle les auteurs ne donnent pas une précision suffisante, excepté Tyopponen et Kauppinen (1980) dont la méthode permet une cadence deux à trois fois moins élevée qu'avec l'Isamat.

Les conditions de dosage que nous avons définies permettent de déterminer le 3-HB chez les bovins :

- sans déprotéiniser l'échantillon
- avec une méthode linéaire, reproductible, sensible et spécifique
- sans effectuer de blanc plasma sans enzyme (3-HB-DH)
- sans ajouter d'hydrazine
- en utilisant de faibles volumes d'échantillon et de réactifs impliquant un faible coût analytique (4 à 5 francs/échantillon, réactifs et main d'œuvre compris, année 1984).
- avec une cadence de dosage élevée, permettant un court délai de réponse du laboratoire après prélèvement.

Dans ces conditions, un suivi de l'état nutritionnel des troupeaux de vaches peut être facilement réalisé en déterminant notamment les concentrations plasmatiques d'un groupe d'individus en 3-HB, ainsi qu'en acides gras non estérifiés, comme l'ont montré Chilliard *et al.* (1984).

Une condition essentielle à réaliser, indépendante de la méthode de dosage, reste cependant la standardisation rigoureuse des prélèvements vis-à-vis du type d'anticoagulant (Custer *et al.*, 1983; Knox et Jones, 1984) du stade physiologique, de l'heure du prélèvement et de la prise alimentaire (Doreau, 1983; Fayet *et al.*, 1986) ainsi que de l'état clinique des animaux.

Reçu le 29 janvier 1985

Manuscrit révisé le 30 août 1985

Accepté le 15 septembre 1985

Remerciements

Nous remercions l'ensemble du personnel des Laboratoires d'Éco-Pathologie et de la Lactation, dont la volonté de collaboration a permis la réalisation de ce travail, ainsi que Messieurs A. Obled et A. Talmant, de la Station de Recherches sur la Viande du CRZV de Theix.

Résumé

Une méthode de dosage automatisée du 3-hydroxybutyrate (3-HB) plasmatique est décrite. Elle a été mise au point sur un analyseur à transfert informatisé (Isamat, Isa-Biologie, 94230 Cachan, France), à partir du principe enzymatique défini par Williamson et Mellanby. La méthode permet à une personne de déterminer la teneur en 3-HB du plasma bovin à une cadence journalière de 500 à 600 échantillons sans déprotéinisation et en l'absence d'hydrazine. Aucune interférence de l'acéto-acétate et de l'acétone n'est mise en évidence. L'addition d'oxalate (5mM) dans le tampon Tris HCl permet d'éliminer l'interférence de la lactate-deshydrogénase (LDH). La bonne linéarité (0,05 à 8 mM), la précision de la méthode (coefficient de variation entre séries : 2,8 %), le coût analytique très réduit qu'elle entraîne (faibles volumes réactionnels) et sa bonne corrélation avec une méthode manuelle classique en point terminal (variance commune entre les deux méthodes : 94 à 98 %) permettent l'utilisation du dosage automatisé du 3-HB plasmatique en tant que paramètre d'évaluation de l'état nutritionnel des troupeaux de vaches, à condition de standardiser rigoureusement les conditions de prélèvement.

Références

- ANDRÉ F., COPPIN F., 1982. Étude technique du dosage de l'hydroxybutyrate et de l'acétoacétate dans le sang et le lait des bovins. *Ann. Rech. Vet.*, **13**, 211-219.
- BARNOUIN J., FAYET J.C., BROCHART M., PACCARD P., BOUVIER A., 1983. Enquête Éco-Pathologique Continue : 1 -- Hiérarchie de la pathologie observée en élevage bovin laitier. *Ann. Rech. Vét.*, **14**, 243-248.
- BRIVET M., MOATTI N., 1981. Dosage enzymatique du D- β hydroxybutyrate et de l'acéto-acétate sanguins au cours des épreuves de jeûne prolongé de l'enfant. *Ann. Biol. Clin.*, **39**, 296-298.
- CHILLIARD Y., BAUCHART D., BARNOUIN J., 1984. Determination of plasma non-esterified fatty acids in herbivores and man: a comparison of values obtained by manual or automatic chromatographic, titrimetric, colorimetric and enzymatic methods. *Reprod. Nutr. Develop.*, **24**, 469-482.
- COULON J.B., DOREAU M., REMOND B., JOURNET M., 1984. Capacité d'ingestion des vaches laitières en début de lactation 2. Les anomalies de l'ingestion: liaison avec l'état sanitaire et quelques paramètres du métabolisme énergétique et de la digestion. *Bull. Techn. CRZV Theix*, (55), 43-51.
- CUSTER E.M., MYERS J.C., POFFENBARGER P.L., SCHOEN I., 1983. The storage stability of 3-hydroxybutyrate in serum, plasma and whole blood. *Am. J. Clin. Pathol.*, **80**, 375-380.
- DAGNELIE P., 1978. La droite des moindres rectangles. In: *Théorie et méthodes statistiques*, Vol. 2, Presses Agronomiques, Gembloux, 303-307.
- DOREAU M., 1983. Influence de la prise alimentaire sur les variations de différents constituants plasmatiques chez la vache en fin de gestation et en début de lactation. *Ann. Rech. Vet.*, **14**, 39-48.
- EL IDILBI N., 1981. *Paramètres plasmatiques du bilan énergétique chez le ruminant: étude particulière du β OHB-biosynthèse, physiopathologie, dosage*. Mémoire de D E A, Laboratoire d'Éco-Pathologie INRA Theix, Université de Clermont-Ferrand, 51 pp.
- FAYET J.C., GENEST M., CHACORNAC J.P., CHONION N., FAYE B., BARNOUIN J., PACCARD P., CHASSAGNE M., BROCHART M., 1986. Enquête Éco-Pathologique Continue. 6. Influence de facteurs zootecniques et spatio-temporels sur quelques variables biochimiques chez les vaches laitières. *Ann. Rech. Vet.* (sous presse).
- FILAR J., 1979. Über den Gehalt an β -Hydroxybutyrate, Azetazetat und Aceton in Blut von gesunden und an Ketose erkrankten Kühen. *Wien Tierärztl. Monatsschr.*, **66**, 377-380.
- FISCHER L.J., DONNELLY O.E., HUTTON J.B., DUGANZICH D.M., 1975. Relationships between levels of feeding and certain blood metabolites in dairy cows in mid lactation. *J. Agric. Sci. Camb.*, **84**, 29-37.
- GROHN Y., LINDBERG L.A., BRUSS M.L., FARVER T.B., 1983. Fatty infiltration in spontaneously ketotic dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **66**, 2320-2328.
- GURLER H., BRYCH H., SCHOPP W., 1984. Zur enzymatischen Bestimmung von D- β 3-Hydroxybutyrat im Blutplasma. *Monatsh. Vet. Med.*, **39**, 340-342.
- HANSEN J.L., FREIER E.F., 1978. Direct assay of lactate, pyruvate, β -hydroxybutyrate, and acetoacetate with a centrifugal analyser. *Clin. Chem.*, **24**, 475-479.
- HECK A.H. 1969. Porcine heart lactate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4375-4381.
- KNOX D.P., JONES D.G., 1984. An automated micro-method for the enzymatic determination of D-B hydroxybutyrate in ruminant plasma. *Vet. Res. Com.*, **8**, 103-115.
- LI P.K., LEE J.T., MAC GILLIURAY M.H., SCHAEFER P.A., SIEGEL J.H., 1980. Direct, fixed-time kinetic assays for β -hydroxybutyrate and acetoacetate with a centrifugal analyser or a computer-backed spectrophotometer. *Clin. Chem.*, **26**, 1713-1717.
- MOORE J.J., MARCUS M., SAX S.M., 1982. Kinetic assay of β -hydroxybutyrate in plasma with a COBAS-BIO centrifugal analyser. *Clin. Chem.*, **28**, 702-703.
- PRESSAC M., VILLEVAL J.L., LEFEBVRE H., AYMARD P. 1983. Évaluation d'un analyseur a transfert Isamat. Étude de dosages sériques en cinétique et en point final. *Inform. Sci. Biol.*, **9**, 21-45.
- ROBERTS C.J., REID I.M., ROWLANDS G.J., PATTERSON A., 1981. A fat mobilisation syndrome in dairy cows in early lactation. *Vet. Rec.*, **108**, 7-9.
- TYOPPONEN J., KAUPPINEN K., 1980. The stability and automatic determination of ketone bodies in blood samples taken in field conditions. *Acta Vet. Scand.*, **21**, 55-61.
- WARREN W.A., 1970. Catalysis of both oxydation and reduction of glyoxylate by pig heart lactate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **245**, 1675-1681.
- WILLIAMSON D.H., MELLANBY J., 1974. D-(-) 3-hydroxybutyrate. In Bergmeyer H.U., (Ed.) *Methods of enzymatic analysis*, Vol 4, Academic Press, New-York, 1836-1839.
- WHITAKER P.A., KELLY J.M., SMITH E.J. 1983. Subclinical ketosis and serum beta-3 hydroxybutyrate levels in dairy cattle. *Br. Vet. J.*, **139**, 462-463.
- ZEWE V., FROMM H.H., 1965. Kinetic studies of rabbit muscle lactate deshydrogenase. 2. Mechanism of the reaction, *Biochemistry*, **4**, 782-792.