

BIOCHIMIE ANALYTIQUE

I. ECHANTILLON

1. PRELEVEMENT

Le matériel utilisé en biochimie peut être constitué soit par des prélèvements de liquide biologique (sang, urine, liquide de ponction...) soit par des prélèvements tissulaires (biopsie du foie, muscles et peau). Il est indispensable de connaître l'origine de l'échantillon qui doit être authentique et représentatif c'est-à-dire qu'il doit donner une image valable de l'ensemble du tissu et du liquide que l'on étudie.

a- Sites de prélèvement du sang

Le recueil des échantillons de sang se fait par ponction veineuse. Le lieu de prélèvement varie selon les espèces animales :

- **Chez les grands mammifères notamment le chameau, le cheval, le bœuf, le mouton, la chèvre** : veine jugulaire ou tout autre veine apparente comme les veines mammaires et caudales.
- **Chez le lapin** : veine marginale de l'oreille.
- **Chez le chien** : veine saphène externe.
- **Chez les oiseaux** : veine alaire (brachiale).
- **Chez les petits animaux de laboratoire** : veine auriculaire ou veine rétro-orbitale de même qu'une ponction cardiaque.

Quelques précautions doivent être envisagées :

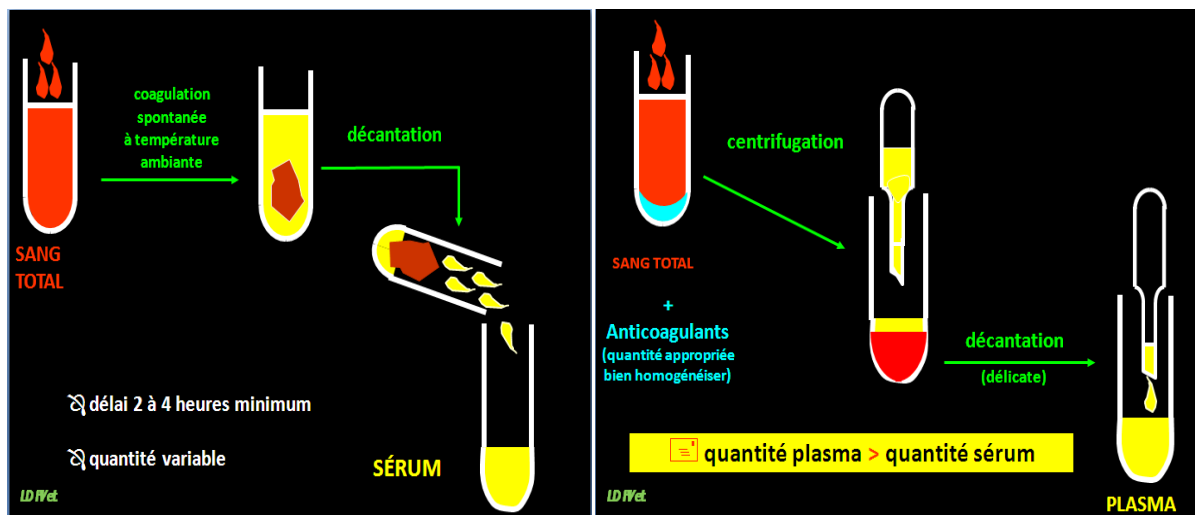
- La quantité maximale de sang pouvant être prélevée chez un animal varie en fonction de l'espèce, de la race ou lignée, du poids, et de l'état de santé.
- Lors du calcul du volume sanguin maximal pouvant être prélevé, une attention doit être portée aux animaux obèses ou vieux. Pour un même poids, leur volume sanguin sera plus petit que celui d'animaux en bonne santé.
- Il faut observer l'état général des animaux avant les prélèvements et noter toute anomalie. Si un animal présente des signes cliniques, un vétérinaire doit être consulté avant de procéder au prélèvement.

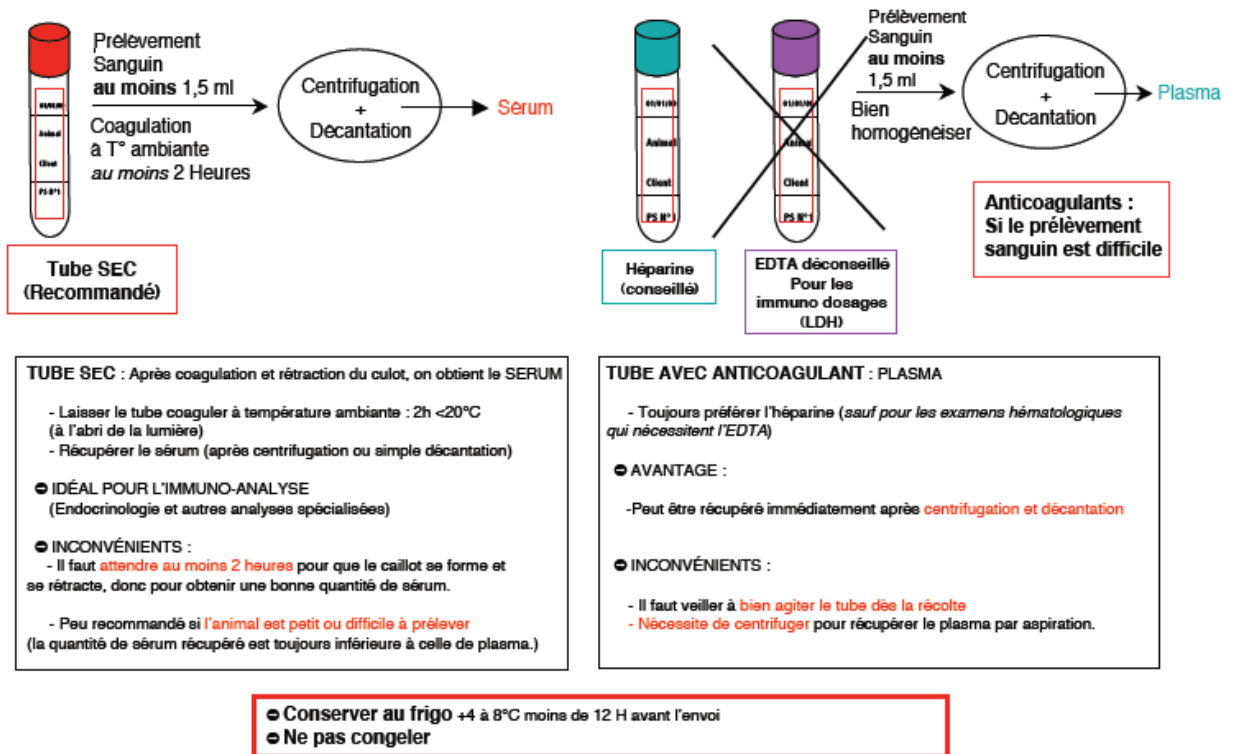
- Il faut prélever le minimum de sang requis pour les analyses à effectuer, il est donc important de choisir le site de prélèvement en fonction de l'échantillon requis.
- Il est préférable d'utiliser le plus grand calibre d'aiguille permis afin de faciliter le prélèvement et d'éviter l'affaissement du vaisseau sanguin.
- Le nombre de ponctions devrait se limiter à trois, après quoi l'assistance d'une personne expérimentée doit être demandée. Et il est dans ce cas obligatoire de d'administrer des fluides surtout après un prélèvement de plus de 10% du poids de l'animal.

b- Sérum ou plasma ?

Certaines analyses ne peuvent être effectuées que dans du sang total, du sérum ou du plasma, mais pour la plupart des analyses biochimiques les deux derniers spécimens peuvent être utilisés indifféremment.

Cependant, la préparation d'un plasma est plus rapide, permet de récupérer un volume supérieur à celui du sérum, et limite notablement l'hémolyse dans les espèces dont les globules rouges sont fragiles, comme le chien ou le mouton. Par ailleurs, pendant la coagulation, certains constituants « fuient » des cellules (par exemple les enzymes, le potassium, etc.) et modifient légèrement la composition du sérum.





➤ **Le plasma est plus simple et plus rapide à obtenir. Il est théoriquement plus représentatif de la réalité physiologique d'un sang non coagulé. Toutefois, certains dosages préfèrent le sérum pour des raisons diverses liées à la technique utilisée ou à la présence d'anticoagulants dans le plasma qui peut générer des interférences.**

2. CHOIX DES ANTICOAGULANTS

Pour réduire les interférences, plusieurs anticoagulants peuvent être utilisés. Les tubes pour la préparation du plasma distribués par les fournisseurs contiennent déjà leurs anticoagulants. Un code de couleur international pour le bouchon a été mis en place pour la détermination aisée du type d'anticoagulant utilisé.

⇒ **Les sels d'héparines** (héparinate de lithium, héparinate d'ammonium)

Les sels d'héparine sont très utilisés pour l'obtention de plasma. Attention, il faut tenir compte du sel utilisé pour éviter les interférences. Par exemple, les sels de lithium ne peuvent pas être utilisés pour le dosage de lithium, les sels d'ammonium ne peuvent pas être utilisés, ni pour le dosage de l'ammonium, ni pour le dosage de l'urée.

⇒ **L'EDTA**

L'EDTA est l'acide éthylène diamine tetra-acétique. Il inactive le calcium nécessaire à la coagulation, ainsi que d'autres ions comme le magnésium, en formant un complexe inactif. Il ne peut donc pas être utilisé pour doser le calcium, le magnésium et certains métaux lourds (plomb).

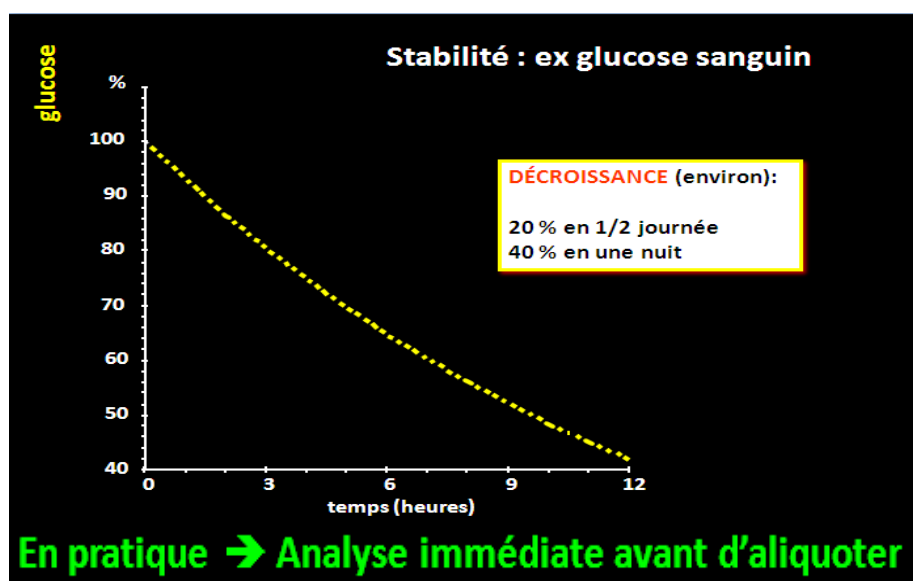
⇒ **Le citrate de sodium**

Le citrate de sodium inhibe également le calcium. Le citrate est souvent utilisé pour obtenir du plasma en vue d'examen de la coagulation ou pour la mesure de la vitesse de sédimentation. Il ne peut pas être utilisé, par exemple, pour le dosage du sodium.

⇒ **Les inhibiteurs de la consommation du glucose (fluorure de sodium, iodoacétate)**

Entre le prélèvement et la préparation du plasma, les cellules sanguines présentes dans le tube sont vivantes et continuent la consommation du glucose et du lactate contenu dans le plasma. Elles réduisent donc leur concentration et faussent l'interprétation de leur dosage. Pour un dosage correct qui ne tient pas compte de ce phénomène, il est nécessaire d'empêcher la consommation de ces composés par les cellules.

Le fluorure de sodium ou l'iodoacétate inhibent cette consommation et peuvent être utilisés conjointement à un autre anticoagulant pour le dosage de paramètres comme le glucose et le lactate.



Délais de consommation du glucose

Principaux anticoagulants utilisés

HÉPARINATE DE LITHIUM	EXTRAIT D'HÉPARINE NATURELLE → BIOCHIMIE
EDTA	SEL DIPOTASSIQUE DE L'ACIDE ETHYLÈNE DIAMINE TETRAACETIQUE → hématologie
CITRATE 9 %	CITRATE TRISODIQUE → coagulation
WINTROBE	OXALATE D'AMMONIUM DE POTASSIUM → coagulation
Éventuellement + fluorure de sodium ou iodoacétate	Inhibiteurs de la glycolyse Glucose / Lactate

- **L'héparine est l'anticoagulant de choix en biochimie car elle interfère peu avec le dosage de la plupart des constituants biochimiques sanguins.**
- **L'EDTA interfère avec le dosage de nombreuses enzymes sériques et ne doit pas être utilisé en biochimie.**
- **Le dosage différé du glucose sanguin doit impérativement être réalisé sur du sang conservé sur un anticoagulant inhibiteur de la glycolyse.**

3- ECHANTILLONS HEMOLYSES, LIPÉMIQUES, ICTÉRIQUES**a- L'hémolyse**

L'hémolyse si elle est présente modifie le pH des réactions chimiques et interfère directement avec les dosages réalisés par spectrophotométrie. Ces interférences sont dues à la libération dans le sérum ou le plasma de constituants présents dans les globules rouges. Cette altération des échantillons peut apparaître fortuitement, l'hémolyse doit donc être surveillée visuellement, et tout échantillon dont la couleur vire au rose ou au rouge ne doit pas être utilisé pour le diagnostic. Pour de nombreuses méthodes, l'hémolyse augmente faussement l'ALAT, l'ASAT, la créatinine, le calcium, l'albumine, le potassium. Une fausse diminution des triglycérides peut également se produire. Le glucose, le magnésium, le phosphore, et le cholestérol peuvent être augmentés ou diminués selon les méthodes utilisées.

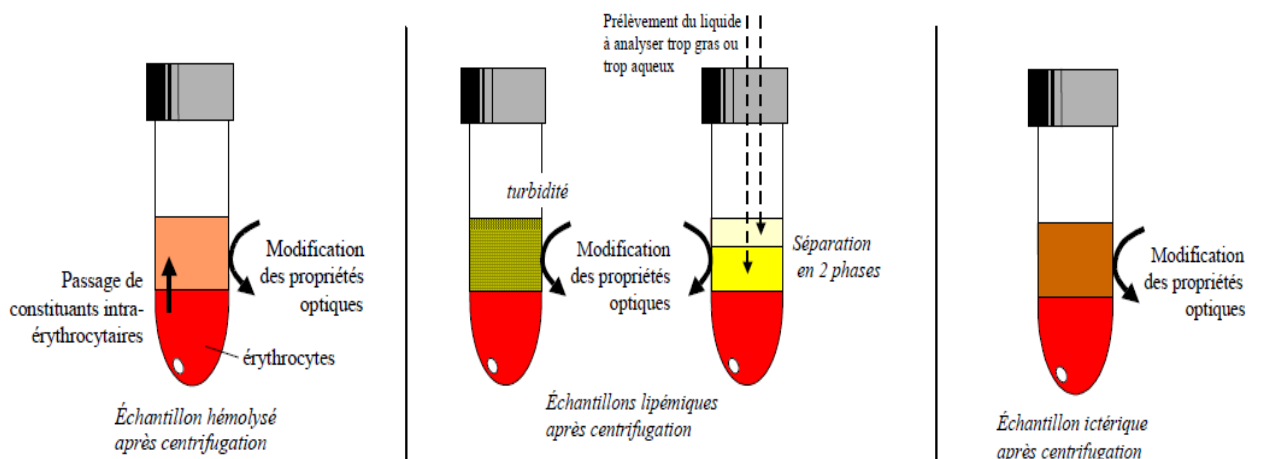
b- La lipémie

Un échantillon lipémique est un échantillon dont le sérum ou le plasma a un aspect trouble ou laiteux dû à l'augmentation des lipides. L'aspect lipémique d'un échantillon peut être significatif d'une anomalie du métabolisme des graisses. Un simple examen visuel de l'échantillon permet de détecter ces troubles.

La lipémie augmente faussement toutes les enzymes hépatiques, la bilirubine, le glucose, le calcium et le phosphore. Les protéines totales lorsqu'elles sont mesurées par réfractométrie seront faussement augmentées, mais la méthode de Biuret est peu affectée même par une grave hyperlipidémie. L'albumine est généralement diminuée en utilisant la méthode au vert de bromocrésol.

c- L'ictère

Un échantillon ictérique est un échantillon dont le plasma ou le sérum a perdu sa couleur normale jaune paille, en virant vers le jaune foncé, brun ou verdâtre. Cette situation est due à une augmentation anormale de la bilirubine, composé ayant une coloration brunâtre. De nombreuses pathologies, en particulier celle touchant le foie ou les globules rouges, sont associées à l'élévation anormale de la bilirubine dans le sang, colorant ainsi la peau et les liquides biologiques en jaune foncé ou brun. Un échantillon ictérique doit être signalé par le laboratoire d'analyses médicales.



II. VARIATION D'UNE MESURE DE LABORATOIRE DE BIOCHIMIE EN DEHORS DE TOUTE PERTURBATION PATHOLOGIQUE

En dehors des variations induites par une affection ou une maladie, un résultat d'analyse biologique peut varier pour différentes raisons. Il existe deux sources importantes de variation : analytique et biologique.

1. VARIATION ANALYTIQUE

On peut décomposer cette variation en deux groupes : pré- instrumentale quand cela concerne le prélèvement, le stockage et le transport de l'échantillon biologique ; instrumentale lors de la réalisation de l'analyse.

Le résultat d'une analyse peut être influencé par la qualité du prélèvement (hémolyse, lipémie), par le choix du tube de prélèvement (sec, EDTA, héparine, citrate) ainsi que par la prise en charge du prélèvement : il doit être traité le plus rapidement possible au laboratoire, transporté dans des conditions adéquates qui permettent la stabilité de l'échantillon, et rapidement décanté ou centrifugé. Il incombe à la personne qui fait le prélèvement de fournir au laboratoire d'analyse le meilleur prélèvement possible.

Concernant la variation instrumentale, elle dépend pour une partie de la qualité technique de la mesure et notamment de sa précision. Ainsi plus la méthode analytique sera précise et moins il y aura de variations liées à la technique dans les résultats.

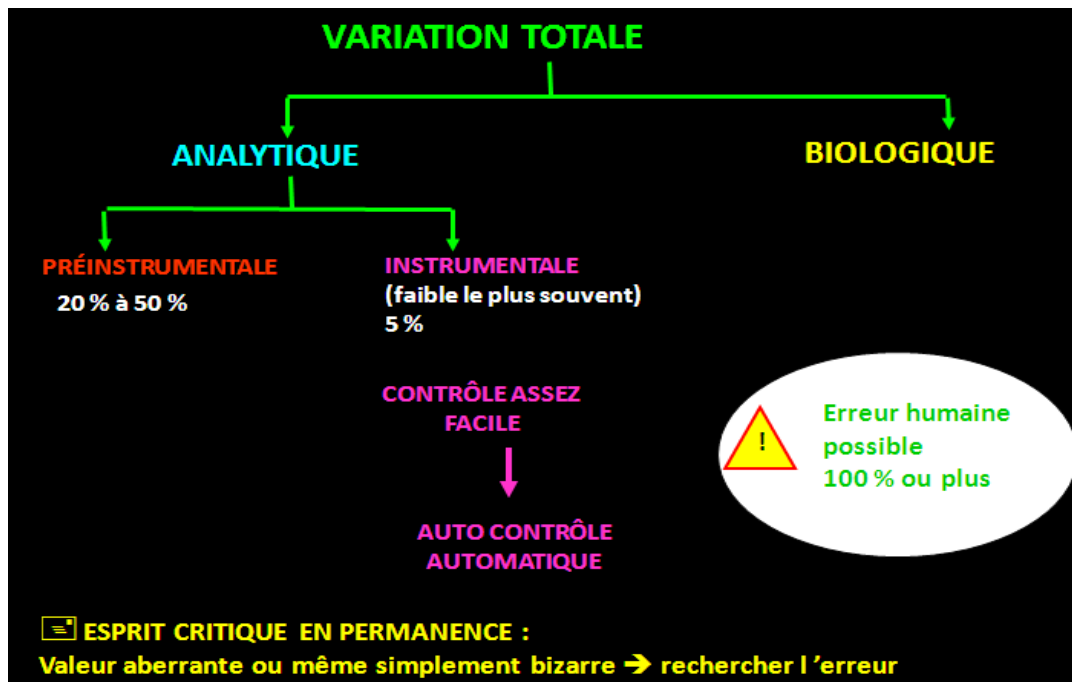
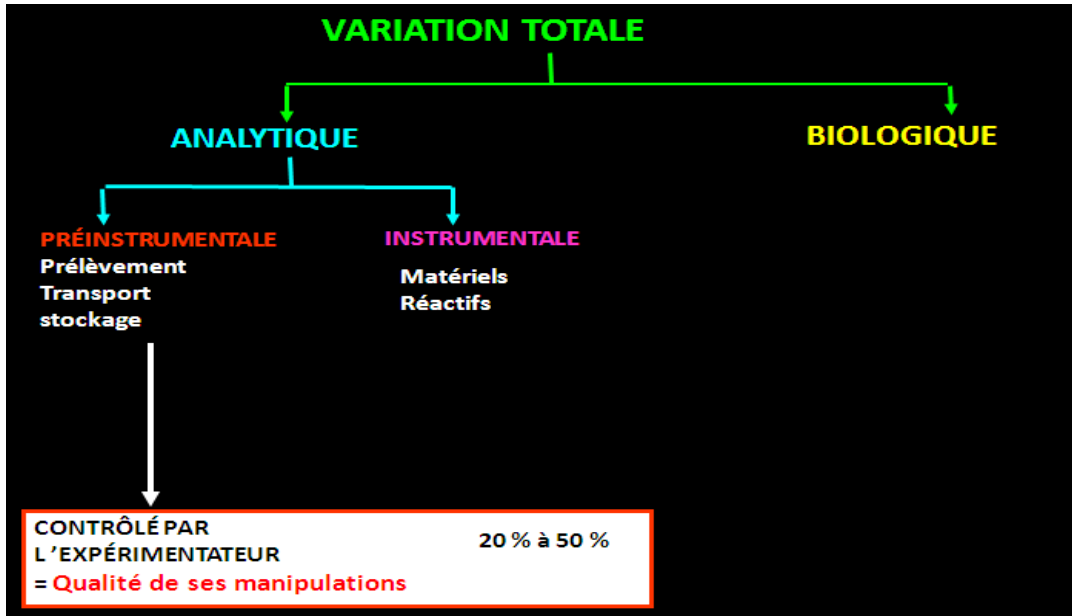
Cependant d'autres facteurs interviennent notamment la méthodologie et l'équipement utilisé pour réaliser les dosages.

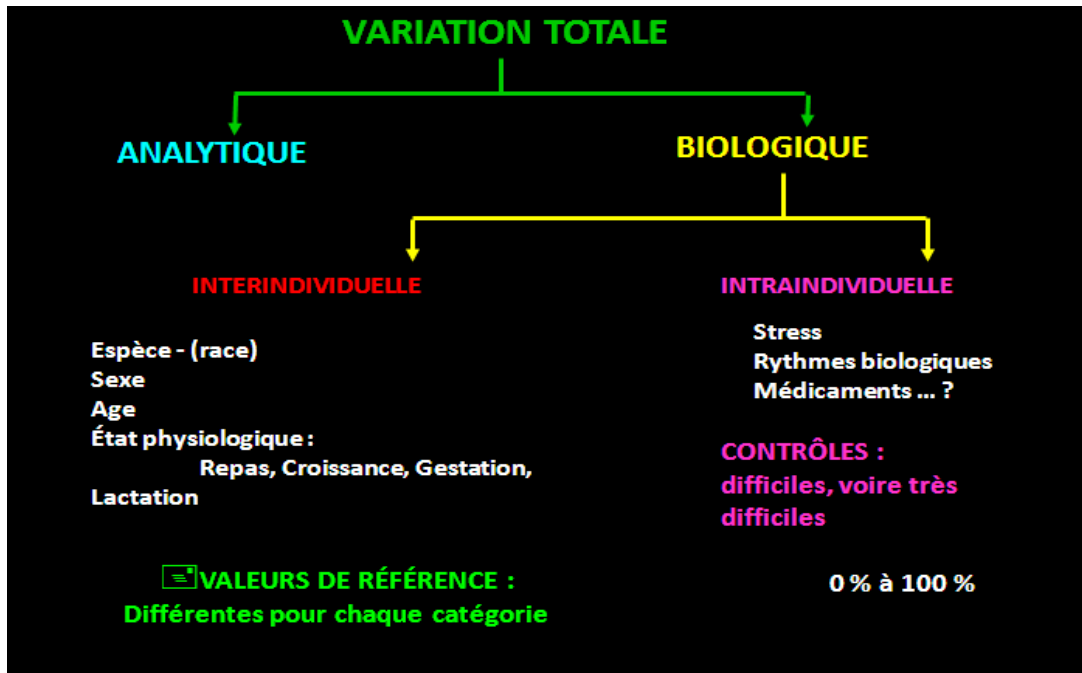
2. VARIATION BIOLOGIQUE

Plusieurs facteurs biologiques sont source de variations dans les résultats d'un paramètre biologique, non seulement l'espèce mais aussi la race, l'âge, le sexe, l'alimentation, et le stade physiologique. Les variations qu'ils génèrent sont généralement connues mais ce n'est pas toujours le cas. On peut alors établir des intervalles de référence pour un groupe donné avec des critères objectifs bien définis.

D'autres facteurs biologiques notamment intra individuels sont moins facilement identifiables comme l'état de stress d'un animal (lors de la contention, d'un transport, une excitation

passagère), le rythme biologique propre à chaque animal ou bien l'administration de médicaments ou de tranquillisants. Ils ont eux aussi un impact sur les résultats de l'analyse.





- **Chez les espèces animales monogastriques, le jeûne est recommandé pour éviter les interférences éventuelles de l'absorption digestive et les variations de concentrations sanguines qui en résultent.**
- **Lors de la ponction veineuse, la mise en place d'un garrot trop serré ou trop prolongé est un facteur d'hémoconcentration locale et de libération de facteurs tissulaires gênants pour la réalisation des tests d'hémostase.**
- **Le prélèvement sanguin doit être effectué sur un animal calme en évitant, dans la mesure du possible, toute contention brutale et le recours à une sédation ou anesthésie préalable.**

III. METHODES PHYSIQUES DE SEPARATION ET D'ANALYSE EN BIOCHIMIE

1- LA CHROMATOGRAPHIE

La chromatographie est une méthode physique d'analyse basée sur la séparation de constituants d'un mélange ; les différents constituants de ce mélange appelés solutés sont séparés et entraînés par un fluide (un liquide ou gaz) que l'on appelle phase mobile ; ils interagissent ou au contraire n'interagissent pas avec une phase fixe que l'on appelle phase stationnaire qui exerce sur eux un effet retardateur. L'origine du mot chromatographie vient

peut-être de la séparation de composés colorés puisque chroma (Χρωμα) en grec, signifie couleur et graphie signifie écrire.

a. Classification des techniques chromatographiques

Les méthodes chromatographiques se classent en trois façons:

1- Classification selon la technique mise en jeu

- la chromatographie sur colonne
- la chromatographie de surface (chromatographie sur papier ou chromatographie sur couche mince).

2- Classification selon la nature des phases

- la phase mobile est un fluide, donc soit un liquide, soit un gaz (soit encore un fluide "supercritique")
- la phase stationnaire est soit un solide, soit un liquide.

La combinaison de ces possibilités conduit à diverses possibilités :

- chromatographie liquide—solide (LSC)
- chromatographie liquide—liquide (LLC)
- chromatographie gaz—solide (GSC ou GC)
- chromatographie gaz—liquide (GLC ou GC)
- chromatographie supercritique (SFC)

La SFC représente un cas intermédiaire entre LC et GC, les fluides supercritiques possédant des propriétés à la frontière entre celles des liquides et celles des gaz.

3- Classification selon le phénomène chromatographique

Ce dernier dépend de la **nature** (et de la structure) de la phase stationnaire utilisée. On joue sur les propriétés des molécules qui vont passer. On distinguera donc :

- la chromatographie **d'adsorption** (LSC, GSC) (lorsque la phase stationnaire est un solide) et par extension.
- la chromatographie **d'affinité** : (on capte l'antigène retenu par les anticorps fixés sur la colonne) qui correspond à un cas où les propriétés d'adsorption de la phase stationnaire sont spécifiques vis-à-vis d'un (ou une famille de) composé(s).
- la chromatographie **de partage** (LLC, GLC), lorsque la phase stationnaire est un

liquide non miscible avec la phase mobile (mise en jeu de coefficients de partage).

- la chromatographie **d'échange d'ions** (IEC), où la phase stationnaire porte des groupes fonctionnels acides ou basiques, destinée à séparer des composés ionisés. On récupère ce qui reste accroché sur la phase stationnaire
- la chromatographie **d'exclusion** (SEC) où la phase stationnaire (poreuse) se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille; on parle aussi de chromatographie de perméation de gel (GPC).

b. La chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne est une méthode préparative qui permet de séparer et d'isoler les constituants d'un mélange. Cette technique est fondée principalement sur des phénomènes d'adsorption et permet de séparer pratiquement tous les mélanges possibles. Il suffit de trouver les bonnes conditions.

La phase stationnaire remplit une colonne de longueur et de section variables. Le mélange, en solution très concentrée, est déposé au sommet de la colonne. La séparation des constituants du mélange résulte de l'écoulement continu d'un éluant à travers la colonne par gravité. Dans la technique classique, l'éluant est un solvant unique mais on peut accroître progressivement la polarité de l'éluant de façon à accélérer le déplacement des constituants du mélange.

La phase stationnaire : Une grande surface spécifique de l'adsorbant est souhaitable pour obtenir de meilleures séparations. Les adsorbants les plus utilisés sont : l'alumine et le gel de silice.

L'éluant : L'éluant généralement employé est un mélange de deux solvants. Le plus souvent, au début de l'élution, on commence par le solvant le moins polaire qui entraîne les constituants les moins polaires (les moins retenus par l'adsorbant) ; on augmente ensuite la polarité de l'éluant par addition graduelle du solvant le plus polaire ; on élue ainsi les constituants les plus polaires. Il faut faire des essais sur CCM avec différents éluants pour avoir une bonne séparation entre les produits.

La vitesse d'élution : La vitesse d'élution doit être la plus constante possible; elle doit être suffisamment lente pour que le soluté soit plus près de l'équilibre entre les phases mobile et stationnaire. Si la vitesse d'élution est trop faible, les constituants diffusent dans l'éluant. Le chromatogramme présente alors des bandes larges et la séparation est médiocre ; une vitesse

d'élution élevée n'est autorisée que dans le cas où les substances à séparer ont des polarités très voisines.

La chromatographie sur colonne présente plusieurs inconvénients :

- Elle nécessite une grande quantité d'éluant
- La durée de l'élution est en général très grande (au minimum, plusieurs heures)
- La détection des composés exige une attention constante
- Il est indispensable de coupler cette chromatographie avec d'autres méthodes de façon à pouvoir détecter les constituants du mélange.



Colonne classique

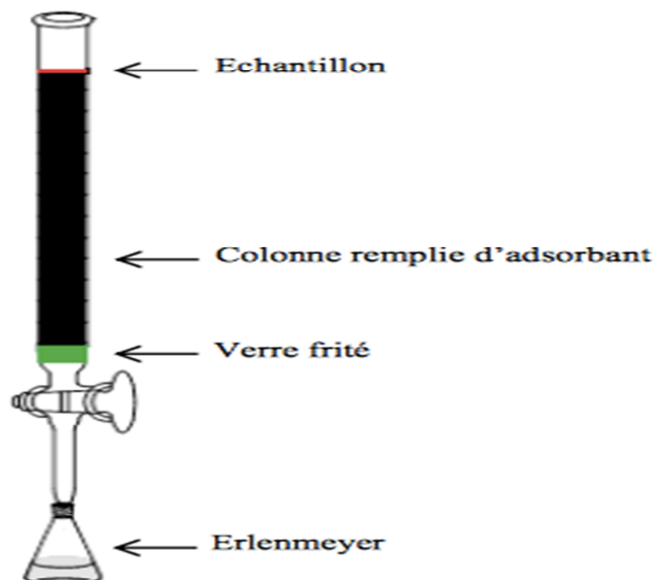


Schéma d'une colonne chromatographique

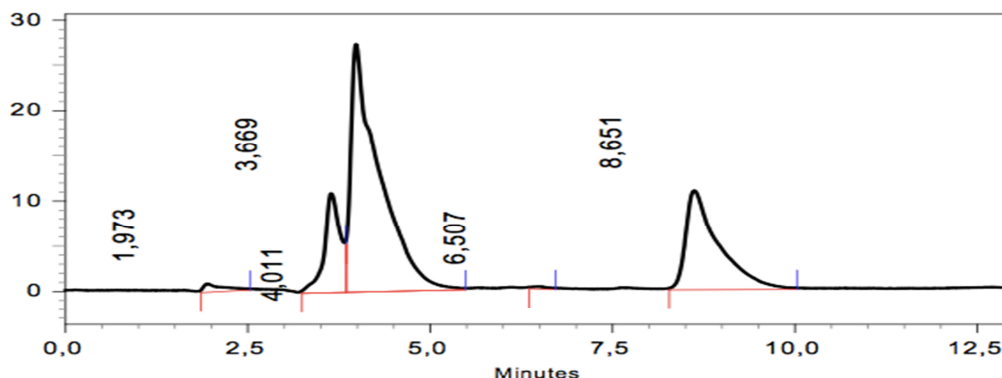


Schéma montrant la séparation de trois constituants par chromatographie

c. La chromatographie sur papier

Elle utilise des feuilles de papier filtre maintenues verticales dans une cuve qui est une enceinte fermée.

Il existe une phase stationnaire constituée par l'humidité du papier et une phase mobile qui est un solvant organique ou un mélange. Cette phase mobile va être disposée au fond de la cuve à la base du papier de telle sorte qu'elle monte par capillarité = chromatographie ascendante. Si elle est disposée près du bord supérieur du papier dans un petit récipient qui permet au solvant de couler lentement de haut en bas de la feuille = chromatographie descendante. Avant le passage du solvant, on va déposer sur le papier une goutte de l'échantillon à analyser et le solvant va séparer les substances contenues dans l'échantillon. Une fois le passage du solvant terminé, on va recueillir la feuille de papier ou chromatogramme, on va la sécher et on va la révéler. On va donc faire apparaître les différentes molécules qui ont été séparées sous forme de tache à l'aide d'un procédé approprié.

d. La chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

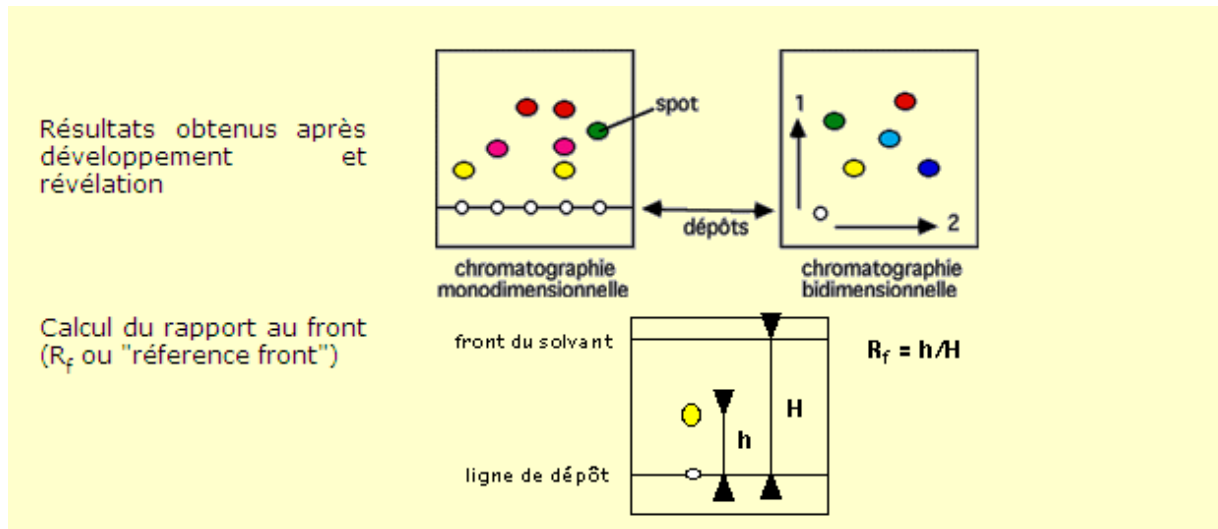
La cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre de forme variable ; fermé par un couvercle étanche. La phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixé sur une plaque de verre ou une feuille de matière plastique ou d'aluminium à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté, l'amidon ou polymère organique. L'échantillon : environ 1 μ l de solution diluée (2 à 5% de mélange à analyser) déposé en un point repère au-dessus de la surface de l'éluant. L'éluant : un solvant pur ou un mélange, il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.

Les adsorbants employés en CCM sont : le gel de silice, l'alumine et la cellulose. Ils sont utilisés dans une granulométrie plus grande en chromatographie sur colonne. L'éluant peut être composé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants ; il ne doit pas être ni trop polaire (entraînant les composants) ni trop apolaire (empêchant leur migration). Les solvants sont caractérisés par leur différence de polarité et leur non miscibilité. A l'aide d'une micropipette ou d'un tube capillaire, on dépose une goutte de chaque solution sur une plaque, chacune séparée de l'autre d'environ 1 cm. L'éluant qui aura entraîné le soluté à une distance proche de la moitié de la plaque sera considéré comme bon éluant.

Deux facteurs interviennent lors de l'interaction entre l'éluant et le soluté :

- La solubilité : on doit être en mesure de dissoudre le soluté dans l'éluant pour que la migration se fasse.
- La polarité de l'éluant va déterminer à quelle vitesse le composé migre

L'analyse est qualitative ou quantitative. Dans le cas de solutés incolores, il est nécessaire de visualiser les spots par une réaction colorée (qui peut être générale ou spécifique) ou par fluorescence; c'est la révélation. L'identification des constituants du mélange se fait par comparaison avec des témoins, en calculant le R_f (rapport au front) de chaque soluté, ou encore le R_t (rapport à un témoin) lorsque le solvant a dépassé le niveau supérieur de la plaque.



e. La chromatographie liquide haute performance

La chromatographie liquide haute performance appelé HPLC est une technique instrumentale qui permet de séparer les composants d'un mélange non volatile, thermosensible, de polarité élevée afin de les identifier et les quantifier. Elle met en œuvre, selon la nature de la phase stationnaire, des phénomènes de partage, d'adsorption, d'échange d'ions ou d'exclusion. Son développement très rapide, à partir de 1970, réside dans le fait qu'elle n'a pas les inconvénients de la chromatographie liquide classique ; cette dernière a toujours été peu utilisée, en raison de la lenteur de la séparation ; de l'absence de détecteur qui aurait permis de suivre facilement le développement de chromatogramme et la quantité considérable d'échantillon nécessaire.

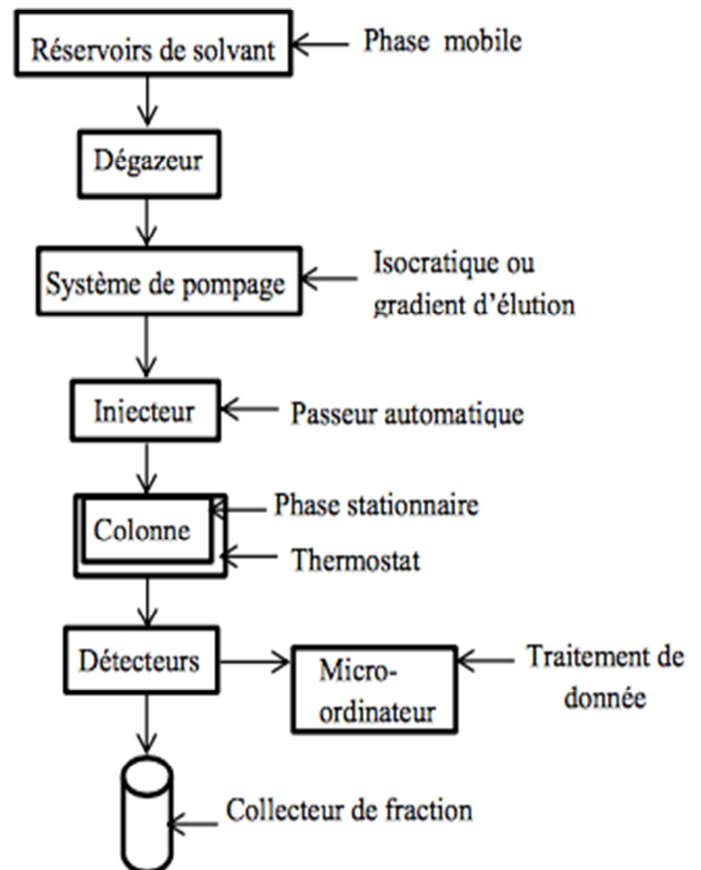
Un appareil CLHP comporte différents modules: un réservoir contenant la phase mobile, un système de pompage, un injecteur, une colonne, un détecteur à travers lesquels un liquide entraîne les substances d'un mélange à séparer et un système d'acquisition de données. Il nécessite également un dispositif de dégazage. Les différents modules sont reliés par des canalisations courtes et de très faible diamètre interne (0,1 mm).

Durant le pompage, dans la chambre de mélange ou dans la colonne elle-même, si les solvants ne sont pas dégazés, l'air dissout dans le liquide soumis à de forte pression, forme des bulles à l'intérieur du système, c'est là un inconvénient majeur pour le fonctionnement de la plupart des détecteurs en particulier ceux qui utilisent des propriétés optiques.

Le détecteur UV-Visible mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne et opère à longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'opérateur. Pour

que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil, et que son coefficient d'absorption soit suffisamment grand. La phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

Chromatographie Liquide Haute Performance



f. La chromatographie d'adsorption

L'adsorption est un phénomène physico-chimique qui consiste en la fixation d'une substance à l'état liquide (ou gaz) sur une surface solide. Ce phénomène fait intervenir des forces complexes entre le soluté et l'adsorbant : forces électrostatiques, forces de liaison d'hydrogène et autre. Pour que cette adsorption soit utilisable à des fins préparatoires, il faut que cette fixation soit réversible. La désorption consiste à remettre, à l'aide d'un éluant approprié la substance en solution par rupture des liaisons précédentes. La chromatographie liquide solide appelée aussi chromatographie d'adsorption met en œuvre des phases

stationnaires ayant des propriétés adsorbants, principalement les gels de silice poreuse et les gels d'alumine. Cette technique est complémentaire à la chromatographie de partage phase en normale. La séparation est fondée sur les différences d'adsorption des molécules du mélange sur cette phase, donc basée sur l'existence de dipôles dans une structure moléculaire.

g. La chromatographie de partage

La chromatographie de partage fonctionne par partage de solutés entre deux phases non miscibles ; l'une mobile et l'autre stationnaire. La phase stationnaire est un liquide qui imprègne un support en principe inerte ou est greffée par liaison chimique covalente sur ce support. Cette technique s'apparente à l'extraction liquide/liquide basée sur les différences de solubilités dans deux phases non miscibles, mais dans ce cas une des deux phases est immobilisée sur un solide dont les particules ont des diamètres très petits. Il s'établit un équilibre qui dépend de la solubilité relative du soluté dans les deux solvants donc du coefficient de partage.

h. La chromatographie d'échange d'ions

La chromatographie ionique (CI) est une technique analytique qui permet l'analyse qualitative (par séparation des espèces présentes) et quantitative des espèces ioniques présentes dans un échantillon liquide dépourvu de matières en suspension. La chromatographie d'échange d'ions est utilisée pour séparer des molécules ionisables, quelle que soit leur taille: ions minéraux (tous les cations alcalins, alcalino-terreux ou métalliques), acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, glucides ionisés et lipides ionisés. C'est une méthode analytique de référence en analyse des eaux, et est adaptée aux milieux biologiques.

i. La chromatographie d'exclusion

Dans cette technique de chromatographie on utilise des granules de gels poreux, dont les pores ont une taille voisine de celle des molécules des composés. La séparation résulte de la différence de taille, et est fondée sur la possibilité du soluté à pénétrer ou à ne pas pénétrer à l'intérieur des pores de la phase stationnaire (limite d'exclusion). Les molécules de l'échantillon ; certains sont assez petites pour pénétrer dans la matrice poreuse, tandis que les plus grandes restent dans le volume interstitiel de la phase stationnaire. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires.

j. La chromatographie d'affinité

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique pour un soluté de l'échantillon à analyser. Quand une solution contenant un mélange de protéines traverse la colonne, la protéine d'intérêt se liera au ligand immobilisé, alors que les autres protéines ne s'y lieront pas et sortiront de la colonne. On peut récupérer la protéine désirée sous une forme très pure en modifiant les conditions d'élution pour faire en sorte que la protéine se détache du ligand.

k. La chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation applicable aux composés gazeux ou susceptible d'être volatilisés par élévation de température sans décomposition (dont la masse moléculaire $MM < 300$) ; les constituants peuvent différer par leur nature et leur volatilité. La séparation exige des quantités de l'ordre du mg seulement ; parfois même du μg .

On distingue selon la phase stationnaire:

- Chromatographie de partage : La chromatographie gaz-liquide : la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide par imprégnation ou par greffage.
- Chromatographie d'adsorption : La chromatographie gaz-solide : la phase stationnaire est un solide poreux, réservé à l'analyse de mélanges de gaz ou de liquides à bas points d'ébullition.

2- L'ELECTROPHORESE DES PROTEINES

L'électrophorèse peut être utilisée pour tous les liquides biologiques contenant des protéines : sérum, urines, LCR, larmes, fèces, liquide d'épanchement. Pour réaliser une électrophorèse des protéines contenues dans les urines ou dans le liquide céphalorachidien, les techniques mises en œuvre seront sensiblement différentes.

De nombreuses affections entraînent des modifications qualitatives et quantitatives des protéines sériques. Les résultats de l'électrophorèse des protéines sériques constituent donc une aide dans la démarche diagnostique du praticien. Le sérum est ainsi le liquide biologique

le plus étudié par cette approche. Il existe de nombreux types d'électrophorèses parmi lesquels :

- ⇒ l'électrophorèse libre ou en veine liquide (le déplacement se réalise en milieu liquide),
- ⇒ l'électrophorèse de zone sur support (le déplacement se réalise sur un support stabilisateur), pour laquelle il existe de nombreux types de supports : papier filtre, acétate de cellulose, gel d'agarose, gel d'amidon, gel de polyacrylamide...,
- ⇒ l'électrophorèse haute résolution, permettant la séparation des protéines d'une même zone électrophorétique en bandes individuelles,
- ⇒ l'électrophorèse bidimensionnelle,
- ⇒ l'immunoélectrophorèse, fondée sur les propriétés antigéniques des protéines.

a. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les protéines sont soumises à un champ électrique dans une phase liquide. Leur séparation repose sur leurs différences de charge, de taille et de structure. La direction et la vitesse de migration des particules sont régies par la charge (négative ou positive), la taille et la structure de la protéine, l'intensité du champ électrique et la nature du support. À pH basique, la majorité des protéines sont chargées négativement (groupement COO⁻). Elles migrent de la cathode vers l'anode et vont se séparer en fractions selon leur taille (plus ou moins importante) et leur structure respective (globulaire ou non). L'albumine porte une importante charge négative : c'est elle qui migre le plus loin. Les autres protéines forment le groupe des globulines. Les globulines forment un groupe hétérogène de protéines portant une charge négative plus faible : elles migrent moins vite que l'albumine et se séparent généralement en trois bandes différentes (α -globulines, β -globulines, γ -globulines). Les α -globulines migrent le plus loin tandis que les γ -globulines restent proches de la ligne de dépôt. Chez un individu sain, chaque fraction globulinique se subdivise encore en sous-fractions dont le nombre varie selon l'espèce et la technique électrophorétique utilisée. Après la migration, les protéines sont colorées (rouge ponceau, bleu de coomassie ou noir amidon en général). Une analyse densitométrique de la coloration permet d'exprimer le résultat sous la forme d'une courbe. Ce tracé est dénommé électrophorégramme ou protéinogramme. Chaque fraction est repérée sur la courbe par la présence d'un pic. L'intégration des aires sous la courbe pour chaque pic définit les quantités relatives des protéines ou groupe de protéines. Ces quantités sont exprimées en pourcentage du total. En couplant une mesure des protéines totales à ces quantités relatives, on obtient la concentration de chaque protéine ou groupe de protéines.

L'aspect de l'électrophorégramme peut déjà apporter de nombreuses informations et être évocateur de certaines affections.

➤ **Les fractions électrophorétiques :**

- **L'albumine :** L'albumine est la plus abondante des protéines plasmatiques. Elle représente 45 à 55 % des protéines du sérum. C'est une protéine de grande taille, osmotiquement active, d'un poids approximatif de 69 000 daltons.
- **Les globulines :**
 - ⇒ **α globulines :** Les protéines les plus importantes des α -globulines se retrouvent majoritairement au sein des α_2 -globulines avec notamment : **des protéines de l'inflammation** : α_2 -macroglobuline, haptoglobine, céruloplasmine, et **des lipoprotéines** : High Density Lipoprotein (HDL).
 - ⇒ **β globulines :** Les β -globulines regroupent des protéines nombreuses et variées dont les plus importantes sont **des protéines de l'inflammation** : protéine C réactive, complément, des **immunoglobulines**: IgA, IgM, et **des lipoprotéines** : Very Low Density Lipoprotein, Low Density Lipoprotein (LDL).
 - ⇒ **γ globulines :** Avec des protéines d'un poids de 156 000 daltons en moyenne, la fraction des γ -globulines regroupe différentes immunoglobulines dont les plus importantes sont les immunoglobulines A, E et G.

Valeurs de référence pour les fractions protéiques chez quelques espèces animales

Serum protein electrophoresis	Dog	Cat	Cow	Sheep	Horse
Albumin (g/l)	27 - 37	27 - 41	28 - 37	26 - 36	24 - 34
Alpha globulin (g/l)	5 - 20	6 - 22	8 - 11	11 - 17	11 - 18
Beta globulin (g/l)	11 - 20	5 - 14	11 - 15	4 - 10	10 - 22
Gamma globulin (g/l)	5 - 10	12 - 20	8 - 17	19 - 33	9 - 18

➤ **Interprétation de l'électrophorèse des protéines sériques**

Avant tout début d'interprétation, il est nécessaire de recueillir une bonne anamnèse du cas :

- concernant l'animal lui-même (espèce, âge, sexe, état physiologique),
- commémoratifs, traitements en cours, hypothèses diagnostiques,
- examen clinique lors du prélèvement (déshydratation...),
- mesure de la protidémie sérique.

Une fois ces renseignements pris, l'interprétation de l'électrophorèse se base sur l'observation du tracé, sur le rapport albumine / globulines puis sur l'étude des différentes fractions.

- **Rapport albumine /globulines normal**

Lorsque que le rapport albumine/globulines est normal, le tracé est très souvent normal. En effet, cela signifie que les proportions entre les différentes fractions ont été conservées. La demande d'électrophorèse fait suite dans ce cas au résultat d'une valeur anormale de la protidémie. Le tableau ci-dessous présente les causes possibles des dysprotéinémies avec un rapport albumine/globulines normal.

Etiologie des dysprotéinémies lors de rapport albumine/globulines normal

Protidémie	Etiologie
Augmentée	<ul style="list-style-type: none"> • Déshydratation
Diminuée	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperhydratation • Hémorragie • Fuite plasmatiques (brûlures, abrasions, lésions exsudatives, parasitisme, maladie gastro-intestinale)

On remarque l'importance de l'examen clinique et la mise en évidence de la déshydratation de l'animal. Une mesure de l'hématocrite et des protéines totales permet d'identifier une anomalie de l'hydratation ou une hémorragie.

- **Rapport albumine/globulines bas**

Ce cas est le plus couramment observé en clinique. Il a pour origine soit une diminution de l'albumine soit une augmentation des globulines. Le tableau ci-dessous présente les causes possibles des dysprotéinémies avec un rapport albumine/globulines diminué.

Etiologie des dysprotéinémies lors de rapport albumine/globulines diminué

Origines	Causes	Etiologie
Albumine diminuée	Pertes sélectives	<ul style="list-style-type: none"> • Glomérulonéphrite • Syndrome néphrotique • Maladie gastro-intestinale • Parasitisme
	Défaut de synthèse	<ul style="list-style-type: none"> • Maladie chronique du foie • Malnutrition • Maladie inflammatoire chronique
Globulines augmentées	α 1-globulines augmentées	<ul style="list-style-type: none"> • Maladie inflammatoire aiguë
	α 2-globulines augmentées	<ul style="list-style-type: none"> • Maladie inflammatoire aiguë • Hépatite aiguë • Néphrite aiguë • Syndrome néphrotique
	β -globulines augmentées	<ul style="list-style-type: none"> • Hépatite aiguë • Syndrome néphrotique • Dermatite suppurative
	Pont β - γ	<ul style="list-style-type: none"> • Hépatite chronique (cirrhose)
	γ -globulines augmentées avec un pic large (polyclonal)	<ul style="list-style-type: none"> • Maladie inflammatoire chronique • Infection • Hépatite chronique • Abscès hépatique • Maladie suppurative (dermatite, tuberculose) • Maladie auto-immune (anémie hémolytique, thrombocytopénie, anémie infectieuse équine, lupus érythémateux disséminé, polyarthrite, glomérulonéphrite) • Lymphosarcome
	γ -globulines augmentées avec un pic étroit (monoclonal)	<ul style="list-style-type: none"> • Lymphosarcome • Myélome multiple • Macroglobulinémie • Ehrlichiose

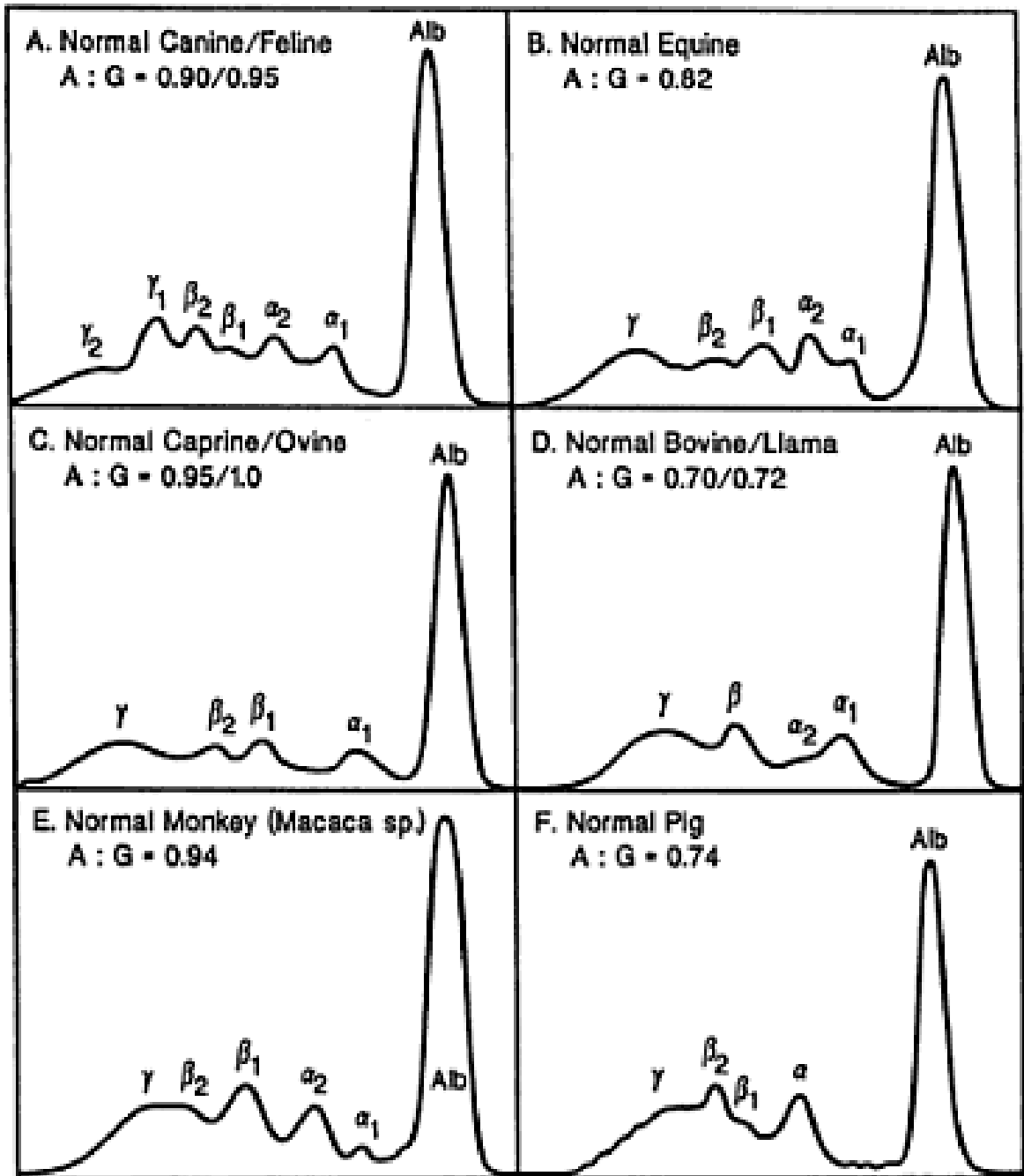
- Rapport albumine/globulines élevé

Ce cas est plus rare. Il a pour origine soit une augmentation de l'albumine soit une diminution des globulines. Le tableau ci-dessous présente les causes les plus fréquentes des dysprotéinémies avec un rapport albumine/globulines augmenté.

Etiologie des dysprotéinémies lors de rapport albumine/globulines augmenté

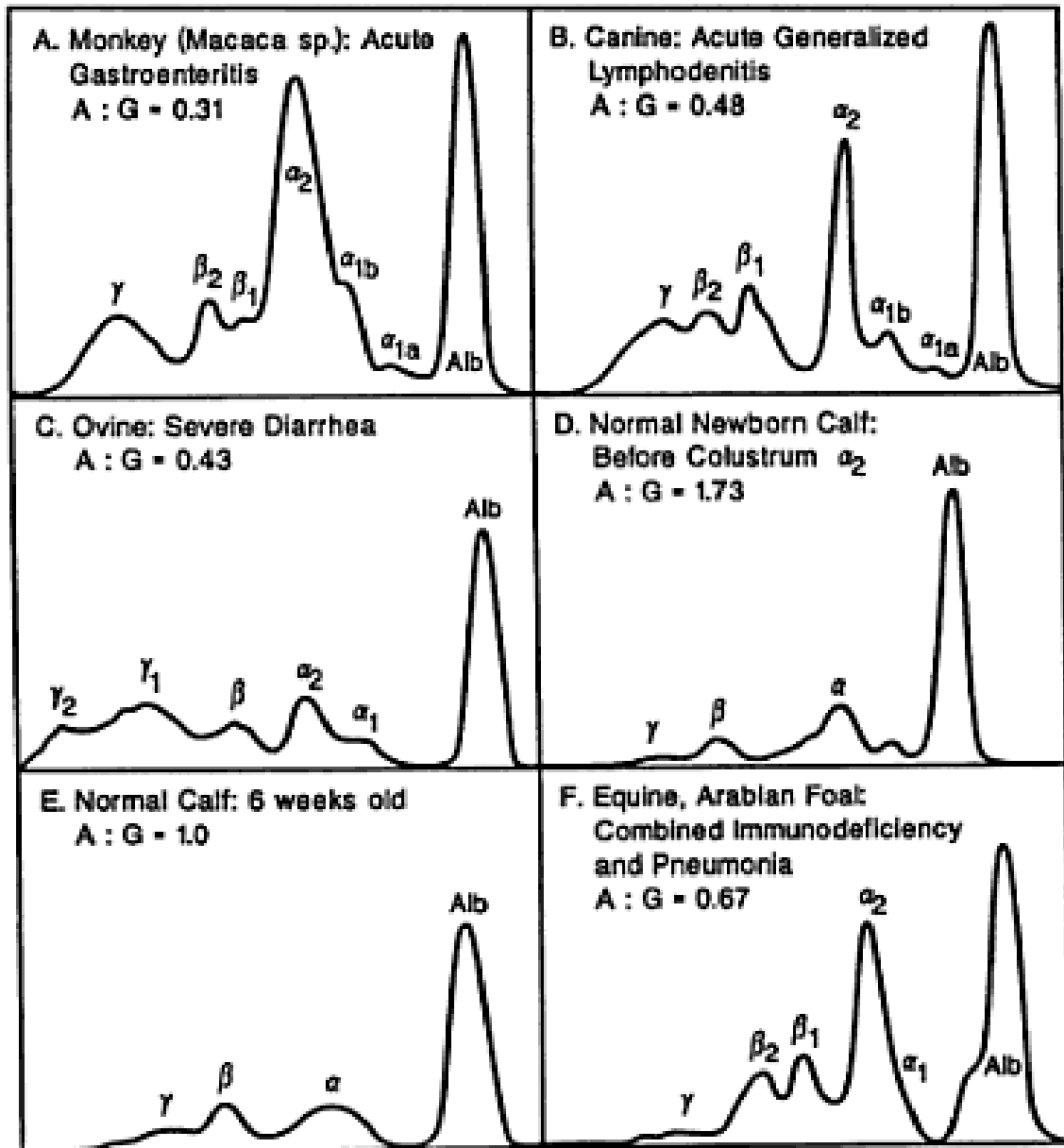
Origines	Etiologie
Globulines diminuées (γ -globulines diminuées)	<ul style="list-style-type: none"> • Nouveau-né avant la prise du colostrum • Immunodéficience du poulain arabe • Agammaglobulinémie acquise ou héréditaire

➤ Exemples de profils électrophorétiques normaux

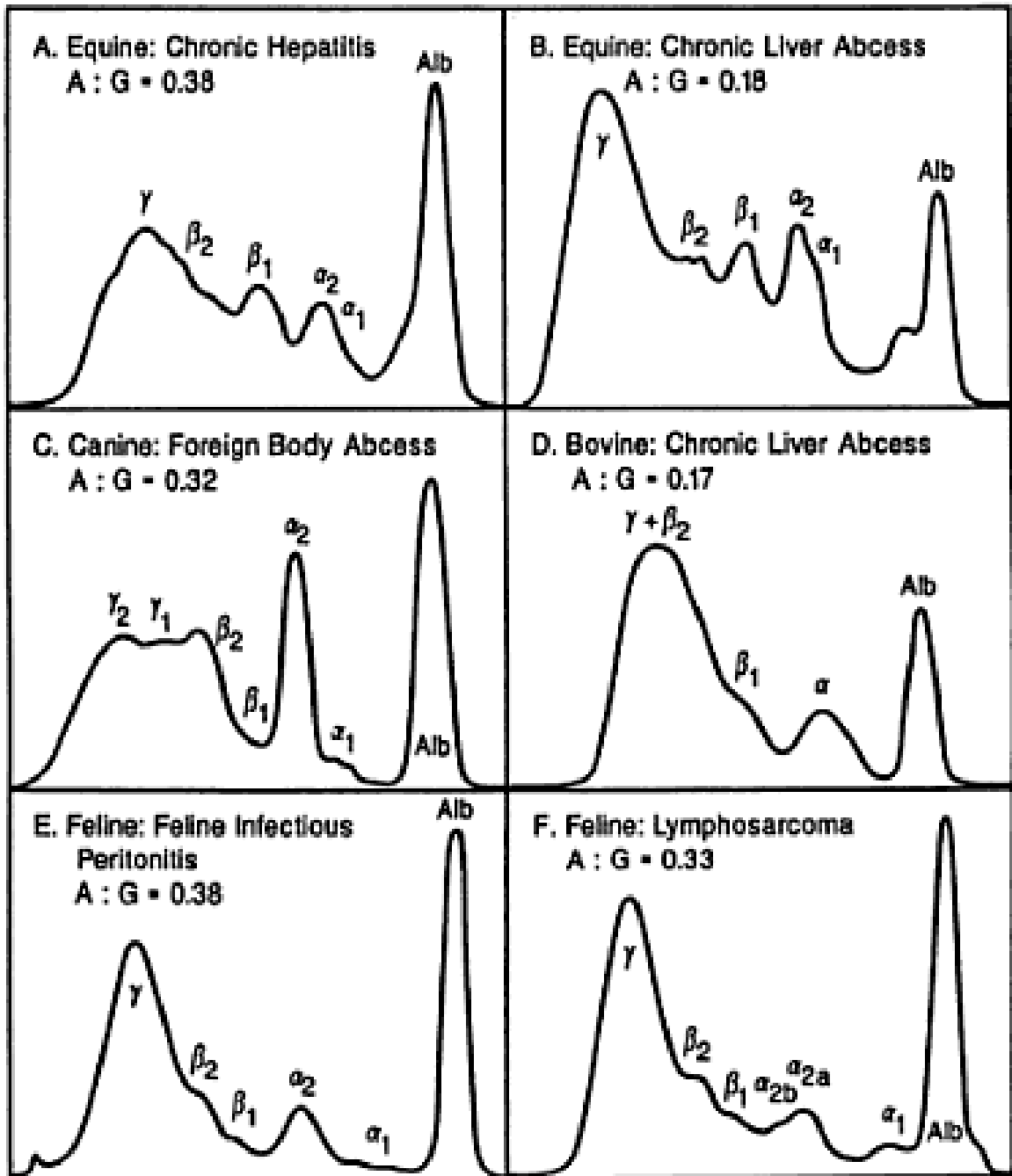


Electrophorégrammes normaux sur Acétate de Cellulose des protéines sériques de certains animaux adultes. Les ratios albumine/globulines sont dans les valeurs de références normales pour ces animaux.

➤ Exemples de profils électrophorétiques pathologiques



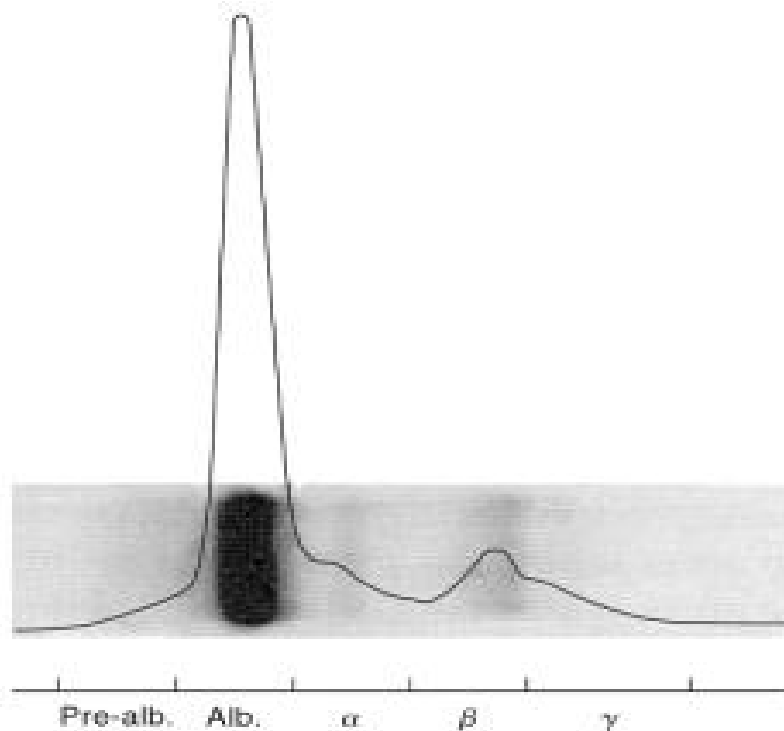
Electrophorégrammes sur Acétate de Cellulose des protéines sériques en cas de maladie inflammatoire aigue avec augmentation des protéines positives de l'inflammation (A,B,F), pertes gastro intestinales de l'albumine (C), nouveau-nés et jeunes veaux (D,E), et immunodéficience chez un poulain (F).



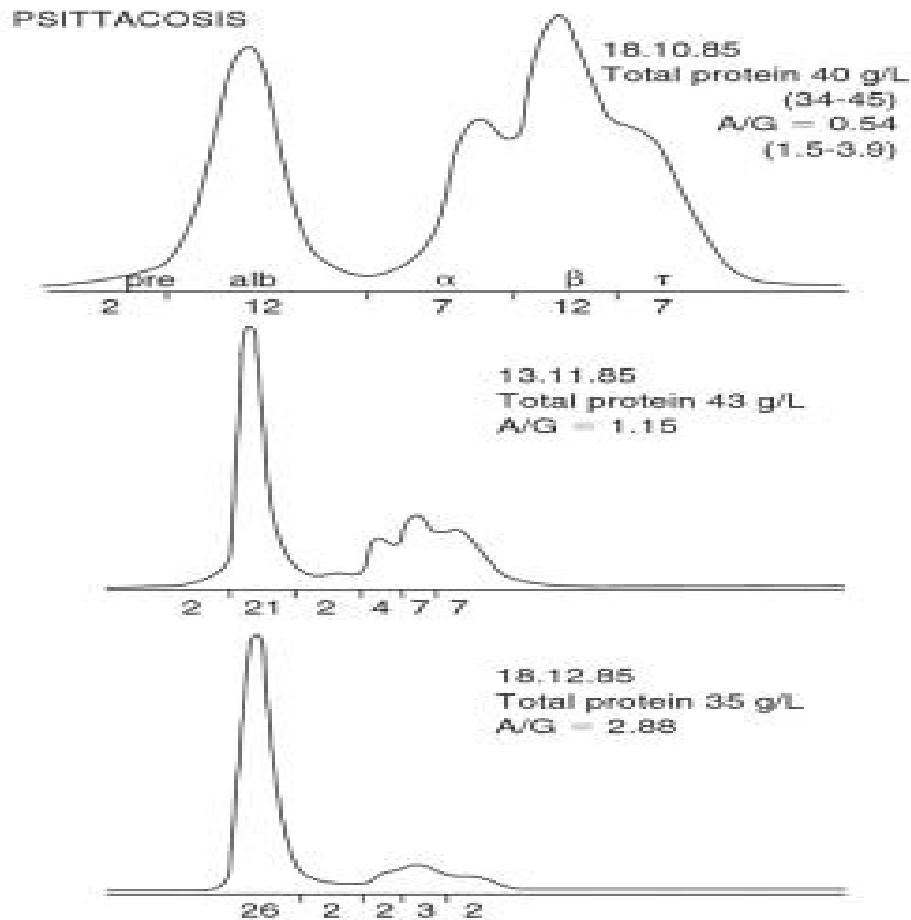
Electrophorégrammes sur Acétate de Cellulose des protéines sériques de certaines gammopathies monoclonales chez les animaux. Noter que les pics de globulines sont plus larges que les pics d'albumine.

➤ **Cas particulier des oiseaux**

Chez les oiseaux, l'électrophorèse des protéines sanguines est utilisée en tant que moyen diagnostique depuis une quinzaine d'années. Son utilisation en médecine aviaire est donc beaucoup plus récente que chez les mammifères. L'électrophorèse des protéines sanguines est principalement utilisée dans le diagnostic de phénomènes inflammatoires liés à des affections bactériennes, virales ou parasitaires chez les oiseaux. Elle est donc le plus souvent réalisée sur plasma en médecine aviaire. Les plasmas sont en effet moins sujets à l'hémolyse que les sérums, et ils contiennent **le fibrinogène**, protéine caractéristique de la phase aiguë de l'inflammation. L'électrophorèse des protéines permet chez l'oiseau, de combler l'absence totale de techniques de dosages de protéines spécifiques de l'inflammation tels que nous les connaissons chez les mammifères (dosage de la protéine C réactive par exemple).



Profil électrophorétique normal chez un pigeon. Noter la présence de la fraction pré-albumine chez les oiseaux



Profil électrophorétique et ratio A/G chez le perroquet gris d'Afrique atteint de Psittacose avant, pendant, et après traitement avec la Doxycycline. Les valeurs de référence pour les protéines totales et A/G sont mises entre parenthèses.

b. Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une microtechnique destinée à l'analyse qualitative et quantitative de solutions complexes, à partir d'échantillons de très faible volume. C'est une véritable innovation technique dans le domaine de la biologie clinique ; méthode de séparation analytique très performante et parfaitement adaptée à la routine d'un laboratoire, elle est rapide, quantitative, reproductible, et elle permet en quelques minutes l'analyse d'un micro échantillon prélevé sur un tube primaire identifié.

L'électrophorèse capillaire est une technique séparative récente. Elle se caractérise par un grand pouvoir de séparation, et par la possibilité de quantifier aussi bien les petites molécules que les biomolécules (protéines) difficilement séparables. Elle repose sur la migration dans un champ électrique et au contact d'un support approprié, des espèces présentes dans l'échantillon en solution, porteuses ou non d'une charge électrique globale. Le capillaire est en verre de silice de très faible diamètre (10 à 100 μm), ouvert à ses extrémités, sa paroi interne est chargée négativement, principalement par l'ionisation des groupes silanol. Ce capillaire, d'une longueur L variant entre 40 et 100 cm, est rempli d'un électrolyte tampon et soumis à un champ électrique continu. Afin de limiter l'échauffement du capillaire celui-ci doit néanmoins être placé dans une enceinte thermostatée. L'électrolyte est un mélange soigneusement filtré et dégazé. Un détecteur est placé à la distance de l'extrémité amont du capillaire près du compartiment cathodique. Le signal obtenu est à la base de l'obtention de l'électrophorégramme qui donne des renseignements sur la composition de l'échantillon, ne sont détectées que les espèces qui se dirigent vers la cathode.

IV. METHODES DE DOSAGE EN BIOCHIMIE

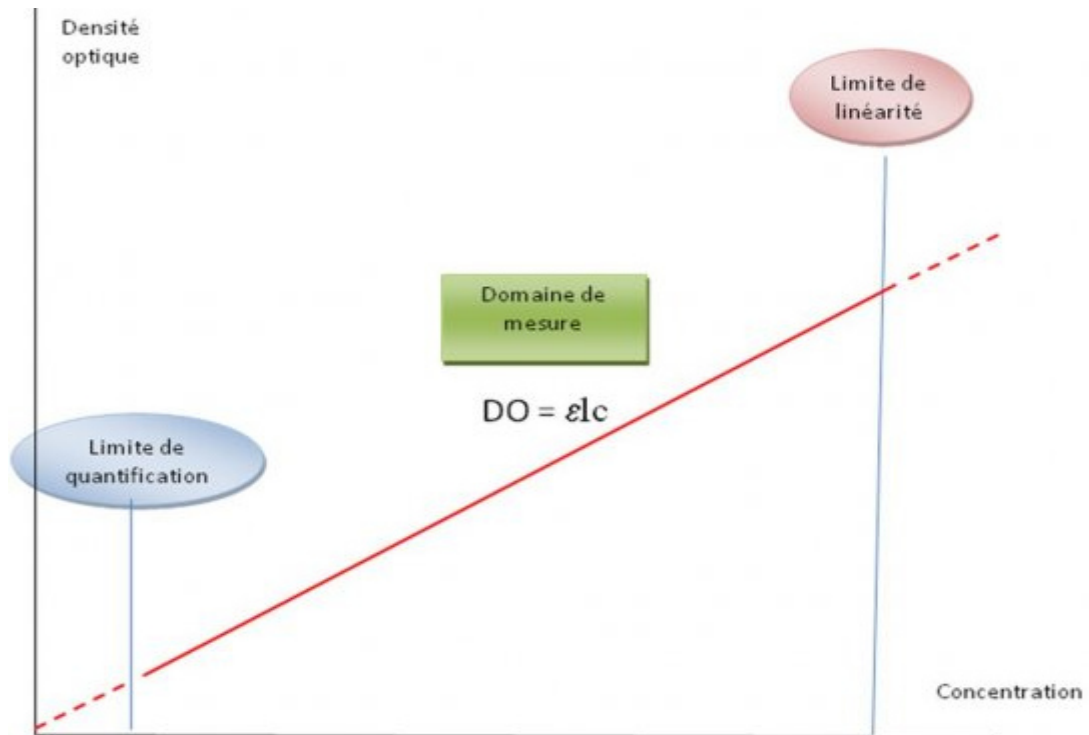
1. METHODES OPTIQUES

a- Photométrie et spectrophotométrie d'absorption moléculaire

La spectrophotométrie d'absorption moléculaire est utilisée pour l'identification et le dosage de molécules biochimiques.

Lorsque l'on fait passer de la lumière à travers une solution colorée, celle-ci absorbe de la couleur complémentaire. Si on utilise un rayon monochrome correspondant à cette couleur, il sera absorbé au moins en partie. On utilise les photomètres si seules certaines longueurs d'onde sont utilisables et les spectrophotomètres si toutes sont disponibles.

La densité optique étant proportionnelle à la concentration d'une solution. On peut doser cette dernière en lisant sa densité optique dans un appareil étalonné avec la même substance à différentes concentrations connues (utilisation d'un étalon).



Représentation graphique de la relation DO / concentration

On voit que la DO est proportionnelle à la concentration, et que la relation entre la DO et la concentration est linéaire, jusqu' à une concentration qui est la limite de linéarité.

- Schéma d'un spectrophotomètre

Un spectrophotomètre est un appareil dans lequel circule un rayon lumineux.

⇒ La source lumineuse émet une lumière polychromatique (lumière blanche) :

- Lampe à filament de tungstène ou tungstène halogène : visible et proche UV
- Lampe au deutérium : UV

⇒ Un dispositif appelé monochromateur permet de sélectionner 1 longueur d'onde :

- Le monochromateur peut être un prisme ou un réseau
- Il peut être remplacé par des filtres interchangeables permettant de sélectionner une longueur d'onde en arrêtant toutes les autres.

⇒ Les autres longueurs d'onde sont dispersées par un jeu de fentes et miroirs. Le rayon lumineux devient monochromatique

⇒ Le rayon monochromatique traverse une cuve de lecture dans laquelle se trouve la solution contenant le composé à doser :

- UV : cuve en quartz
- Visible et proche UV : cuve en verre

- Matières plastiques de qualité variable

⇒ Une partie du rayon est absorbée par la solution. Le reste continue son chemin jusqu'à un photodétecteur relié à un système électronique permettant de l'amplifier (photomultiplicateur) et de le quantifier.

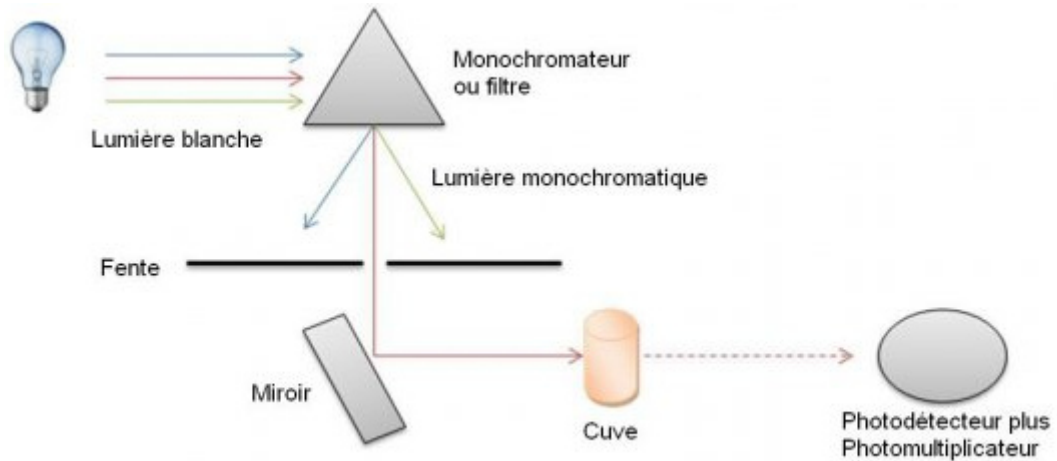


Schéma d'un spectrophotomètre

- Réalisation d'un dosage biochimique photométrique : Exemple du dosage du glucose par la méthode à la glucose oxydase (Méthode de Trinder)

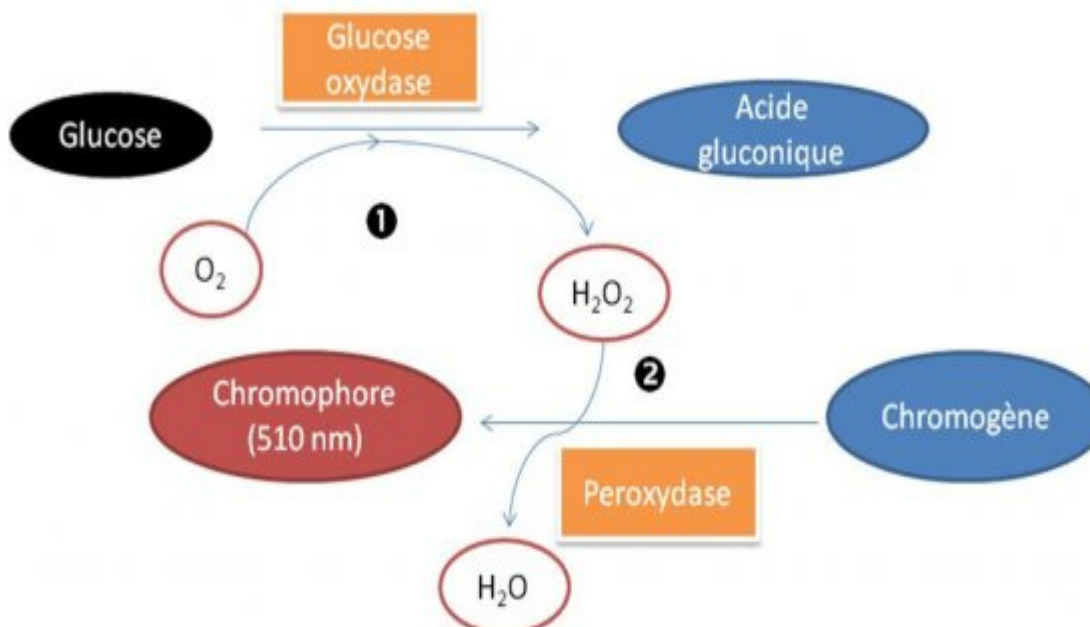


Schéma des réactions mises en jeu lors du dosage du glucose par la glucose oxydase

- **Le glucose est transformé en acide gluconique grâce à la glucose oxydase. Cette réaction consomme de l'oxygène (O₂) et produit de l'eau oxygénée (H₂O₂)**
- **L' H₂O₂ permet à une peroxydase de transformer une substance chromogène pour la rendre chromophore. Cette substance chromophore absorbe à une longueur d'onde de 510 nm.**
- **C'est la mesure de cette absorption qui permet le dosage du glucose. On désigne communément l'absorption par le terme « densité optique » ou DO.**
- **La longueur d'onde choisie dépend donc du spectre d'absorption du chromophore utilisé, et correspond en général à un de ses maxima d'absorption.**

- **Mesure en point final et en cinétique**

Détermination en point final : On attend la fin de la réaction, le « plateau », pour faire la mesure de DO. Plus la concentration est importante, plus la DO est élevée.

Détermination en cinétique : On effectue plusieurs mesures dans la phase de croissance de la DO. On détermine une pente ou Δ DO. Plus la concentration est importante, plus la pente est élevée.

Les activités enzymatiques (transaminases, phosphatases alcalines,...) sont généralement mesurées en cinétique. Les substrats comme la créatinine peuvent être mesurés par les 2 méthodes.

- ▶ En technique manuelle, la méthode en point final donne de bons résultats
- ▶ En technique automatisée, la méthode en cinétique permet de résoudre certains problèmes d'interférence et permet de diminuer le temps d'analyse.

b- SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE

DÉFINITION

La spectrométrie d'absorption atomique est une méthode d'analyse élémentaire qualitative et/ou quantitative basée sur le phénomène d'absorption du rayonnement électromagnétique UV-Visible par les vapeurs atomiques dans un domaine énergétique de l'ordre des transitions électroniques.

PHÉNOMÈNES D'ABSORPTION ET D'ÉMISSION ATOMIQUES

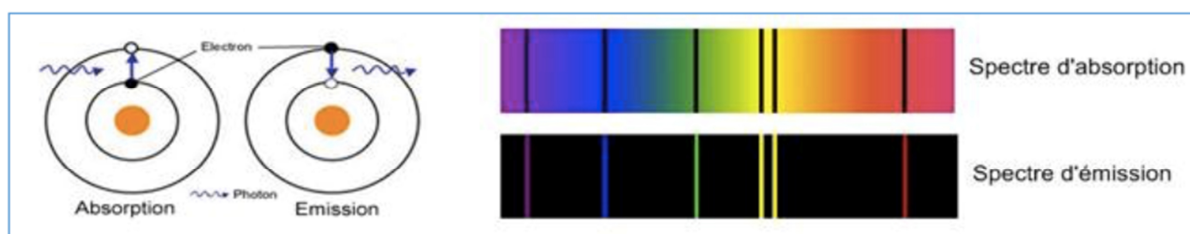
La spectrométrie d'absorption atomique (SAA) et la spectrométrie d'émission atomique (SEA) sont deux techniques largement utilisées pour l'analyse de plus de 70 éléments parfois à l'état de traces.

✚ Absorption atomique

L'absorption atomique est le phénomène observé lorsqu'un atome à l'état fondamental absorbe un rayonnement électromagnétique à une longueur d'onde spécifique et passe à un état excité. Il en résulte un spectre de raies noires sur fond clair (Spectre d'absorption).

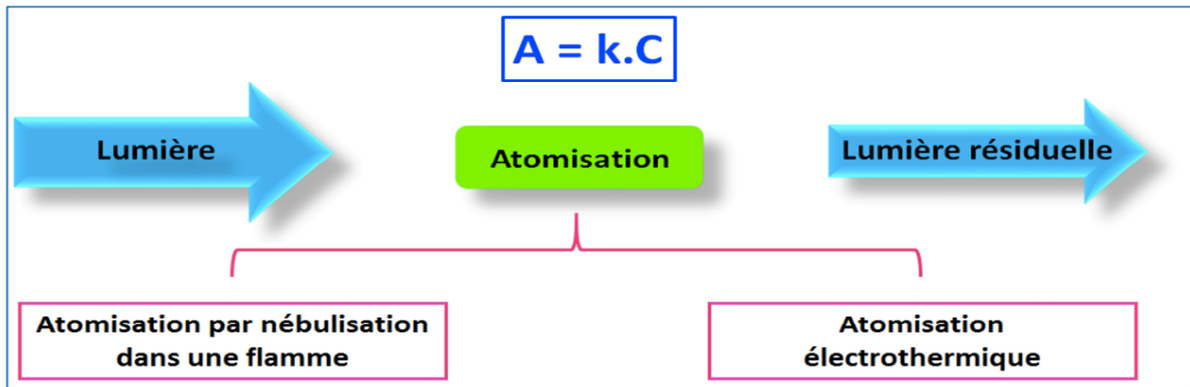
✚ Émission atomique

L'émission atomique est le phénomène observé lorsqu'un rayonnement électromagnétique est émis par des atomes ou des ions excités qui retournent à l'état fondamental. Il en résulte un spectre de raies claires sur fond noir (Spectre d'émission).



✚ Les deux techniques mettent en jeu des atomes libres à l'état de vapeur. L'appareillage va donc produire une vapeur atomique à partir de l'échantillon ce qui induit la destruction de la molécule à analyser, il est ainsi possible de doser simultanément toutes les formes d'un même élément.

PRINCIPE

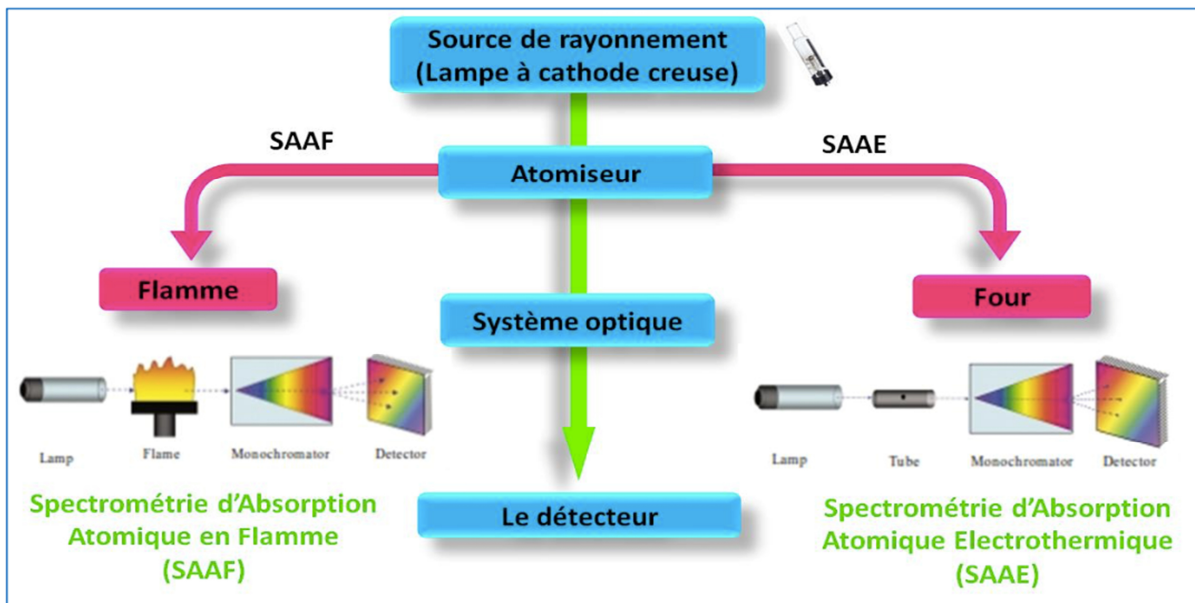


- ✓ L'échantillon est réduit en vapeur atomique.
- ✓ Les atomes à l'état fondamental absorbent le rayonnement spécifique.
- ✓ L'absorbance est proportionnelle à la quantité d'atomes de l'élément à doser.

En SAA, on obtient les vapeurs atomiques par :

- ✓ Atomisation par nébulisation dans une flamme
- ✓ Atomisation électrothermique

APPAREILLAGE



La source de rayonnement est le plus généralement une **lampe à cathode creuse**. Il en existe près d'une centaine, différentes, chacune est propre à un élément à doser. La lampe à cathode creuse est une lampe à décharge conçue pour une utilisation comme source de raie spectrale avec les spectromètres d'absorption atomique (AA). Une lampe à cathode creuse monoélément ou multiélément est requise pour déterminer chaque élément à l'aide de la technique d'absorption atomique. Une lampe à cathode creuse doit impérativement générer une raie d'émission étroite pour l'élément à déterminer.

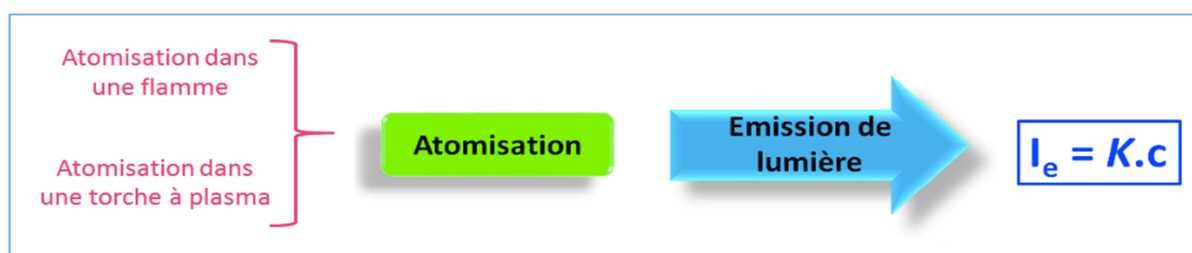
- ❖ Dans la SAAF, l'atomiseur est une flamme fournie par un bruleur à fente laminaire.
- ❖ Dans la SAAE, l'atomiseur est un four graphite.

c- SPECTROMETRIE D'EMISSION ATOMIQUE

DÉFINITION

La spectrométrie d'émission atomique est une méthode d'analyse élémentaire qualitative et quantitative basée sur le phénomène d'émission du rayonnement électromagnétique UV-Visible par les vapeurs atomiques dans un domaine énergétique de l'ordre des transitions électroniques.

PRINCIPE



- ✓ L'échantillon est introduit au niveau de l'atomiseur, ce dernier joue un double rôle :
 - Production de vapeurs atomiques.
 - Excitation des atomes.
- ✓ Après excitation, le retour à l'état fondamental est accompagné d'émission de rayonnements spécifiques de l'élément à doser (ou des éléments à doser).
- ✓ L'intensité du rayonnement émis est proportionnelle à la concentration de l'analyte considéré.

En SEA, il existe deux types d'atomiseurs :

- ✓ La flamme (**Photométrie d'émission de flamme**).
- ✓ La torche à plasma (**Spectrométrie d'émission optique à plasma par couplage inductif = Induced Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry ICP-OES**). Le plasma est le quatrième état de la matière. Il s'agit d'un gaz ionisé où les électrons sont arrachés de leurs orbitales atomiques. Le plasma est constitué d'atomes isolés à l'état d'équilibre entre leur forme neutre et forme ionisée.

NB

- La SEA permet une analyse **élémentaire qualitative de composition**, c'est-à-dire, qu'il est possible d'identifier les éléments d'un échantillon de composition inconnue contrairement à la SAA, où on ne dose que l'élément pour lequel le spectromètre a été préparé par le choix de la lampe de l'élément à analyser.

- Après excitation, pour chaque atome, il existe une centaine de possibilités de retour à l'état fondamental et pour chacune un rayonnement de longueur d'onde spécifique est émis. Ainsi, le spectre de l'émission atomique présente plusieurs raies d'émission, qui constituent une empreinte de l'élément à doser tandis qu'en SAA, les mesures se font sur une longueur d'onde, sélectionnée par la bande passante (le spectre présente une seule bande d'absorption).

APPAREILLAGE

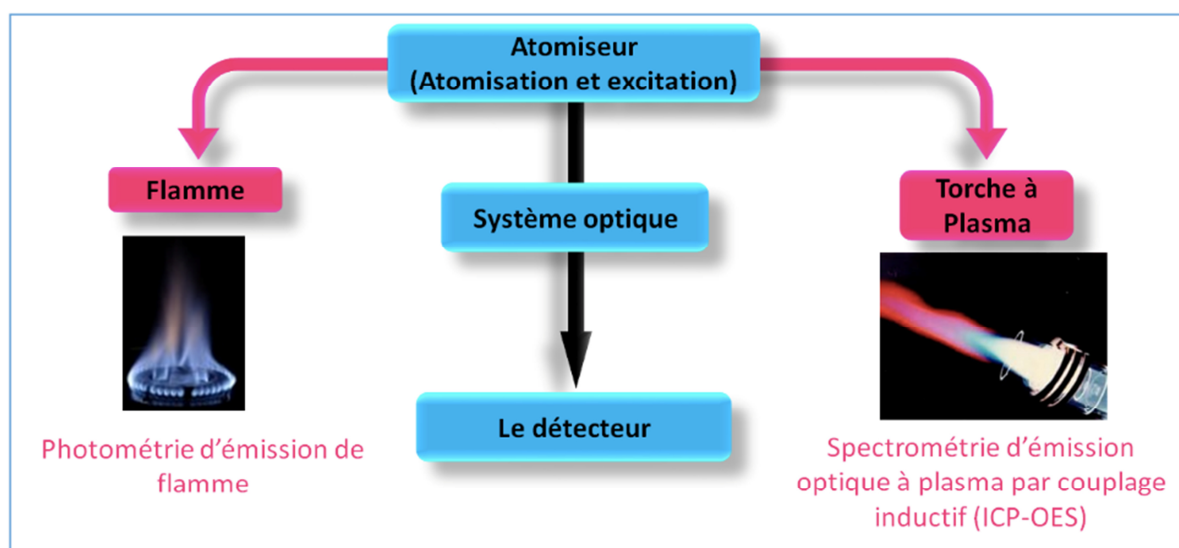


Tableau comparatif entre les différentes techniques spectrométriques atomiques d'absorption et d'émission

	Nature de l'élément	Sensibilité	Vitesse de l'analyse	Coût
SAA-flamme	Métaux de transition (Fe, Cu, Mn, Co...)		La plus longue	+
SAA-four	Mg, Al, Si Métaux de transition et métaux lourds	++		++
SEA-flamme	Alcalins Li, Na, K, Rb, Cs			-
SEA-ICP	Tout les éléments du tableau périodique sauf les non métaux.	++ ++		++++