

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 :

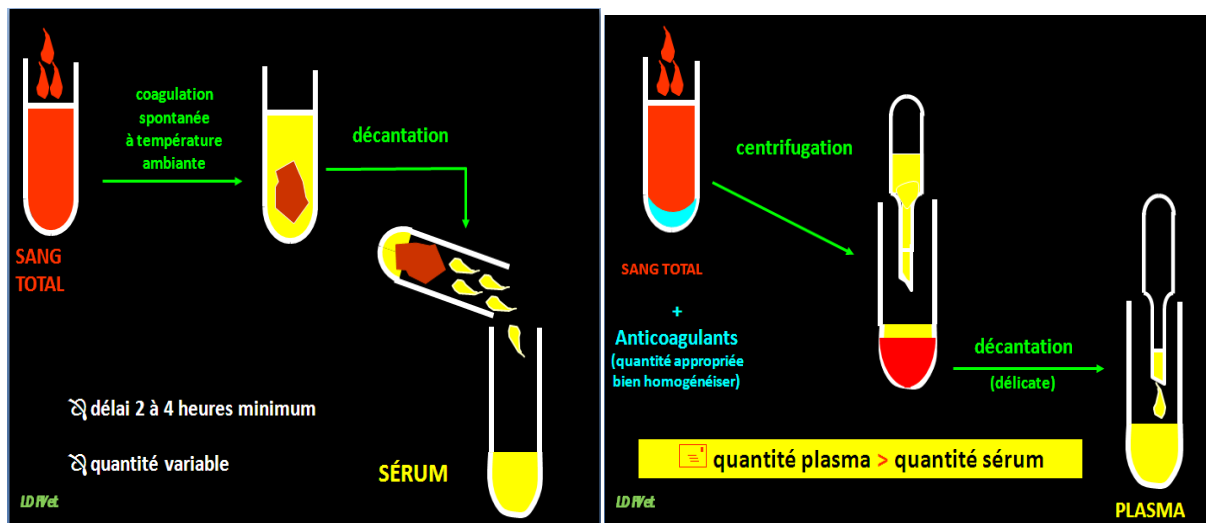
- La quantité maximale de sang pouvant être prélevée chez un animal varie en fonction de l'espèce, de la race ou lignée, du poids, et de l'état de santé.
- Lors du calcul du volume sanguin maximal pouvant être prélevé, une attention doit être portée aux animaux obèses ou vieux. Pour un même poids, leur 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.

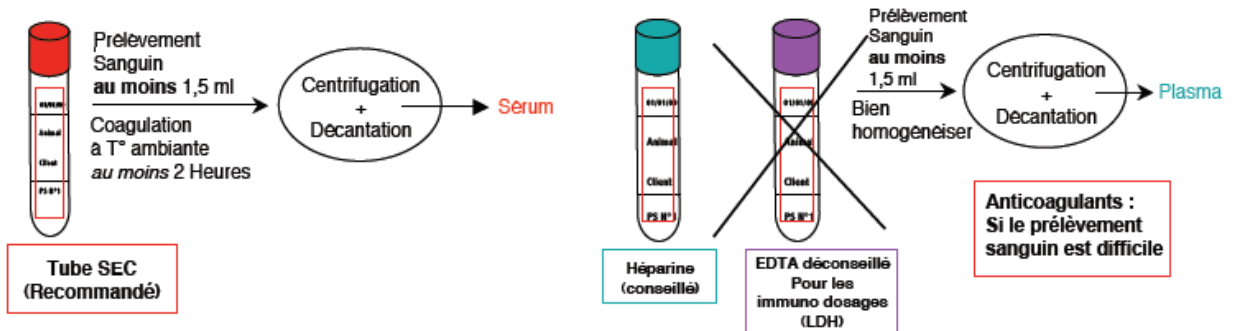
- Il est préférable d'utiliser le plus grand calibre d'aiguille permis afin de faciliter le prélèvement et d'éviter l'affaissement du vaisseau sanguin.
- Le nombre de ponctions devrait se limiter à trois, après quoi l'assistance d'une personne expérimentée doit être demandée. Et il est dans ce cas obligatoire 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.





TUBE SEC : Après coagulation et rétraction du culot, on obtient le SERUM

- Laisser le tube coaguler à température ambiante : 2h <20°C (à l'abri de la lumière)
- Récupérer le sérum (après centrifugation ou simple décantation)

● **IDÉAL POUR L'IMMUNO-ANALYSE**
(Endocrinologie et autres analyses spécialisées)

● **INCONVÉNIENTS :**

- Il faut attendre au moins 2 heures pour que le caillot se forme et se rétracte, donc pour obtenir une bonne quantité de sérum.
- Peu recommandé si l'animal est petit ou difficile à prélever (la quantité de sérum récupéré est toujours inférieure à celle de plasma.)

TUBE AVEC ANTICOAGULANT : PLASMA

- Toujours préférer l'héparine (sauf pour les examens hématologiques qui nécessitent l'EDTA)

● **AVANTAGE :**

- Peut être récupéré immédiatement après centrifugation et décantation

● **INCONVÉNIENTS :**

- Il faut veiller à bien agiter le tube dès la récolte
- Nécessite de centrifuger pour récupérer le plasma par aspiration.

● Conserver au frigo +4 à 8°C moins de 12 H avant l'envoi
● Ne pas congeler

➤ **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).

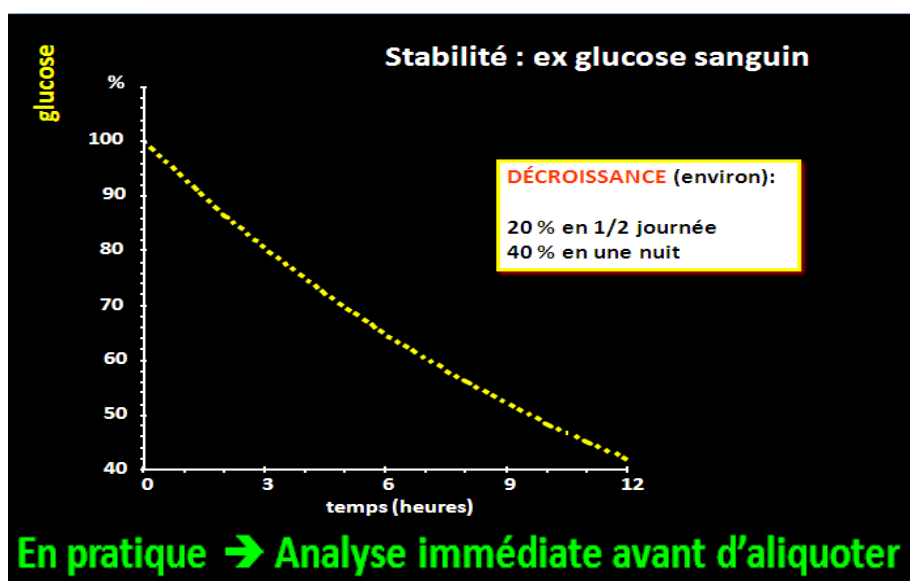
⇒ **Le citrate de sodium**

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.



Délai de consommation du glucose

Principaux anticoagulants utilisés

| | |
|--|--|
| HÉPARINATE DE LITHIUM | EXTRAIT D'HÉPARINE NATURELLE → BIOCHIMIE |
| EDTA | SEL DIPOTASSIQUE DE L'ACIDE ETHYLÈNE DIAMINE TETRAACÉTIQUE → 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, LIPEMIQUES, ICTERIQUES**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.

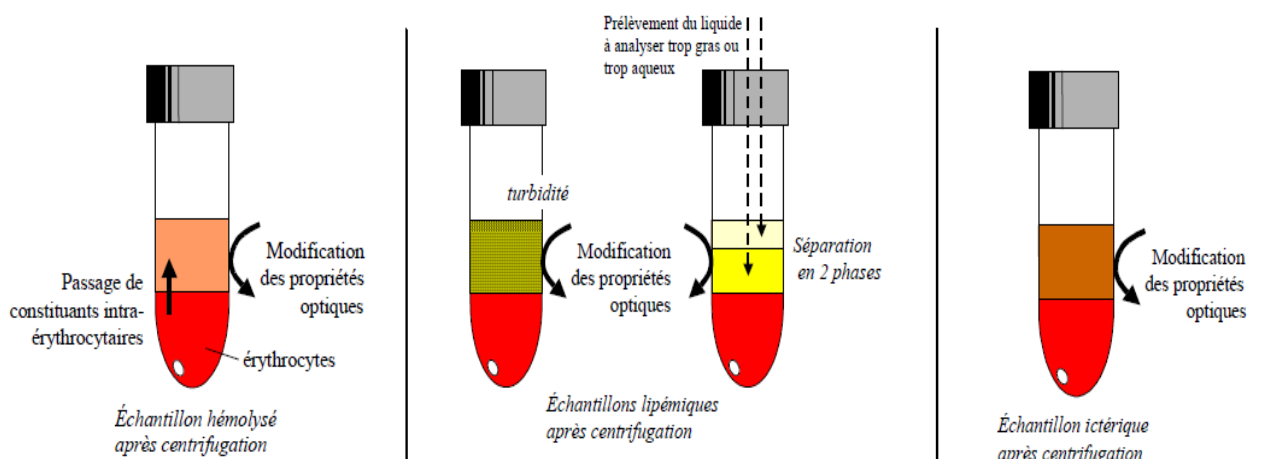
b- La lipémie

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.

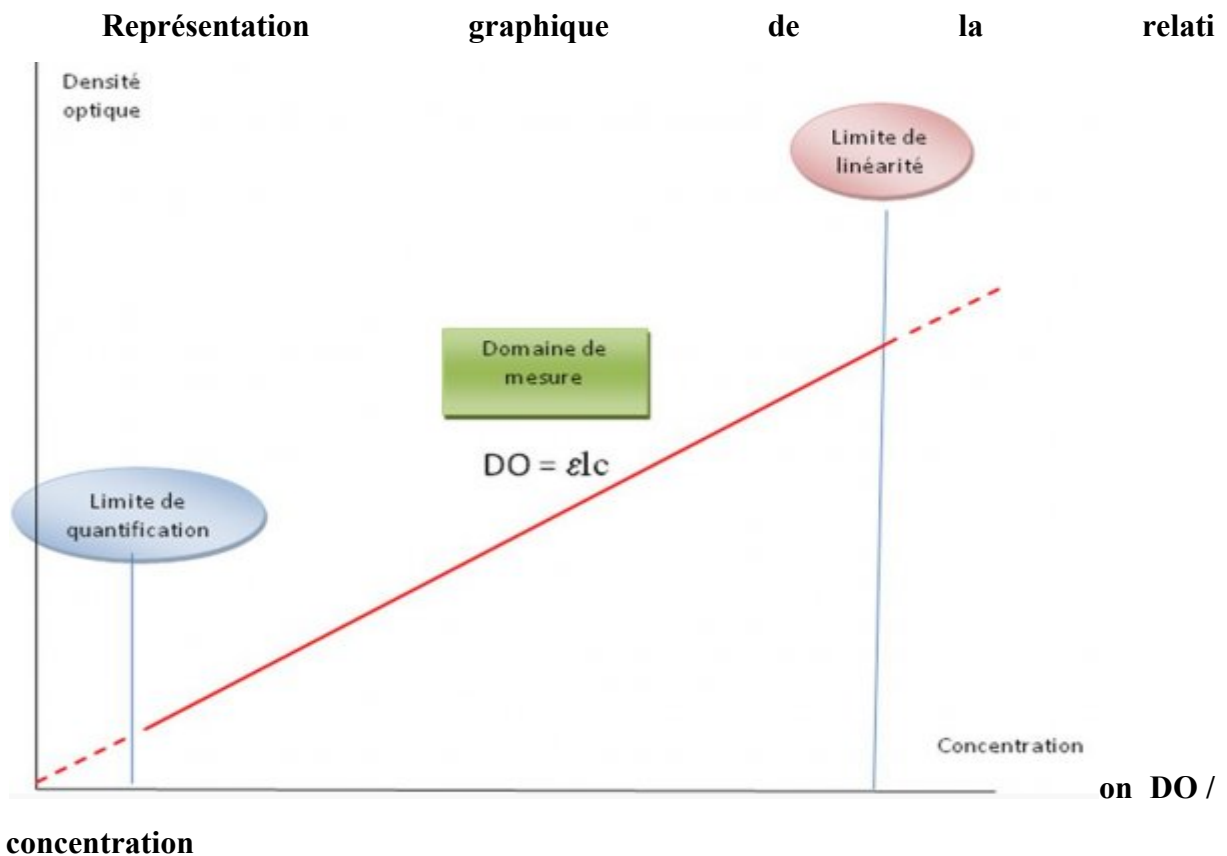


II. SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION MOLECULAIRE

La spectrophotométrie d'absorption 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.



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.

1. 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.

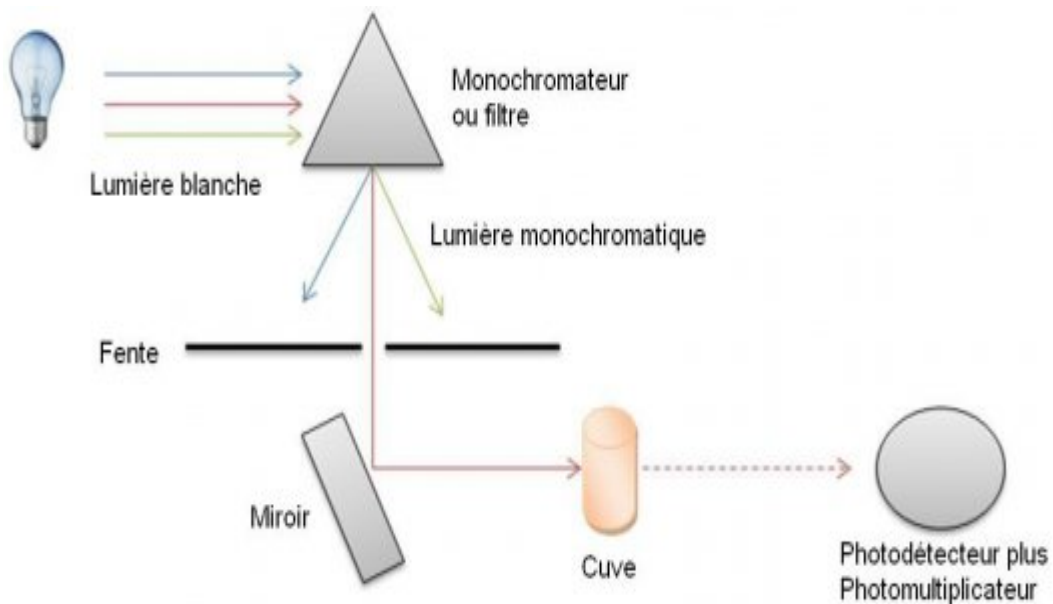


Schéma d'un spectrophotomètre

2. Réalisation d'un dosage biochimique photométrique : Exemple du dosage du glucose par la méthode à la glucose oxydase

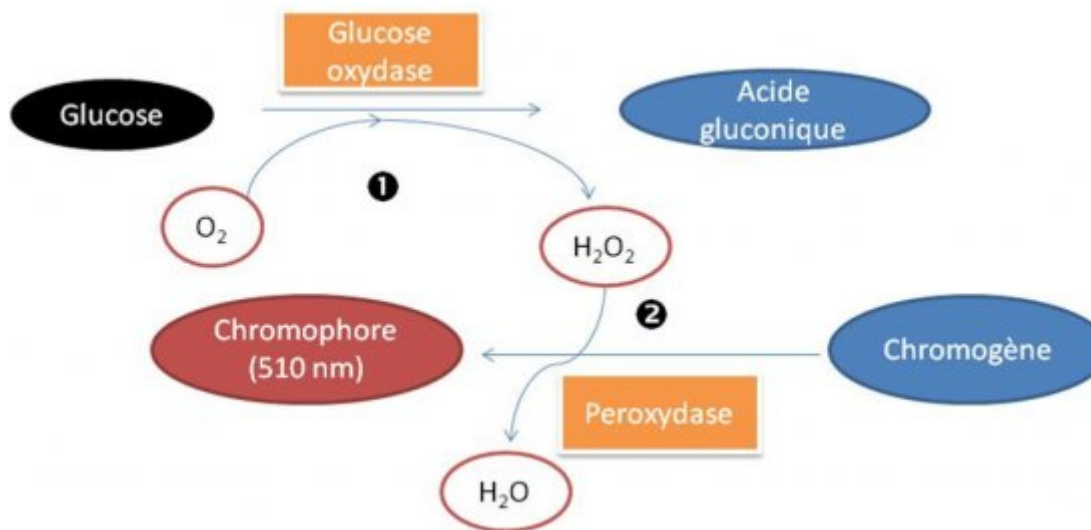


Schéma des réactions mises en jeu lors du dosage du glucose par la glucose oxydase

- Le glucose est transformé en acide gluconique grâce à la glucose oxydase. Cette réaction consomme de l'oxygène (O_2) et produit de l'eau oxygénée (H_2O_2)
- L' H_2O_2 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.

3. 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.