

INTRODUCTION A LA 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 :

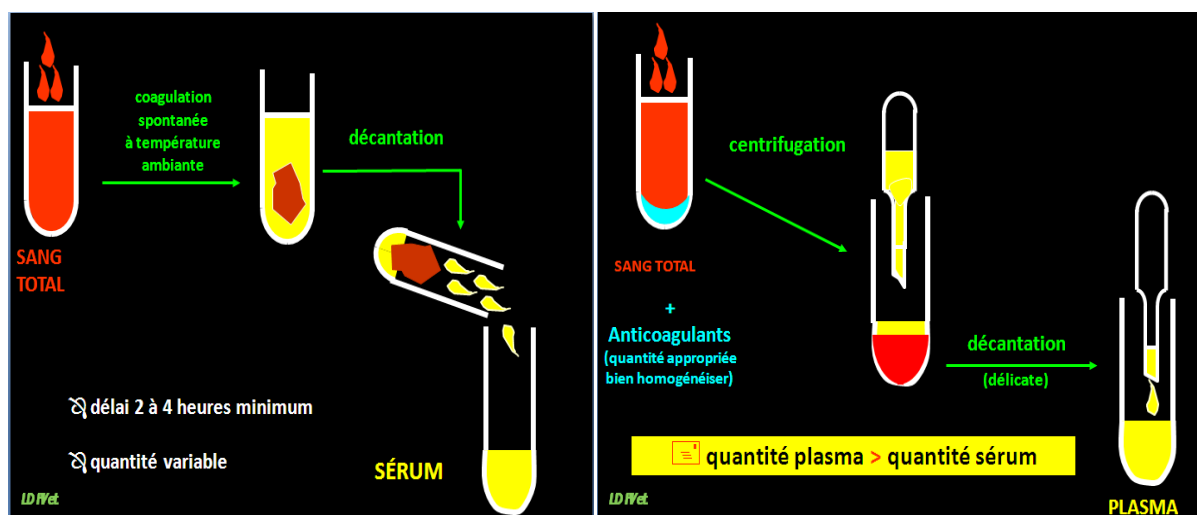
- La quantité maximale de sang pouvant être prélevée chez un animal varie en fonction de l'espèce, de la race ou lignée, du poids, et de l'état de santé.
- Lors du calcul du volume sanguin maximal pouvant être prélevé, une attention doit être portée aux animaux obèses ou vieux. Pour un même poids, leur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

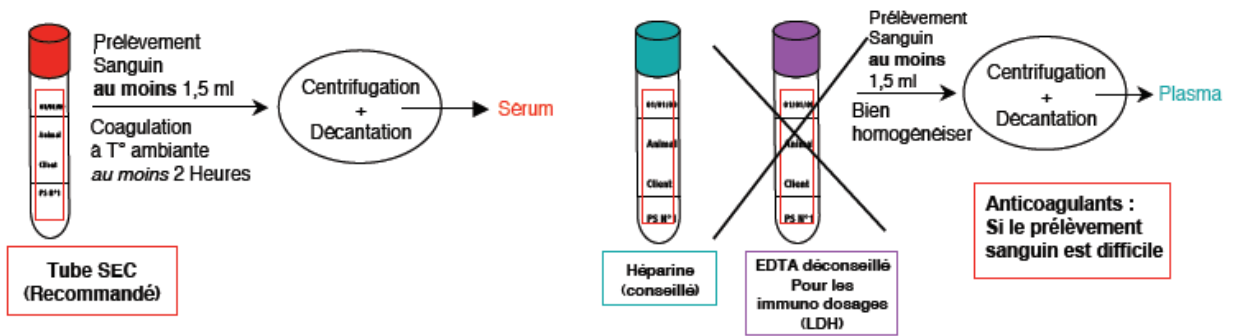
- Il faut observer l'état général des animaux avant les prélèvements et noter toute anomalie. Si un animal présente des signes cliniques, un vétérinaire doit être consulté avant de procéder au prélèvement.
- Il faut prélever le minimum de sang requis pour les analyses à effectuer, il est donc important 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.





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.

c. 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).

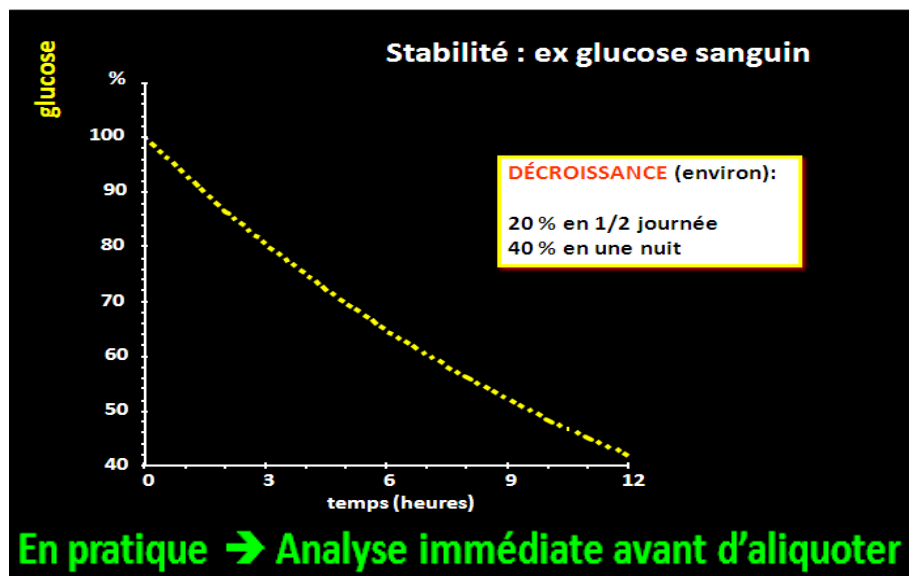
⇒ **Le citrate de sodium**

Le citrate de sodium inhibe également le calcium. Le citrate est souvent utilisé pour obtenir du plasma en vue d'examens 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 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, 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.

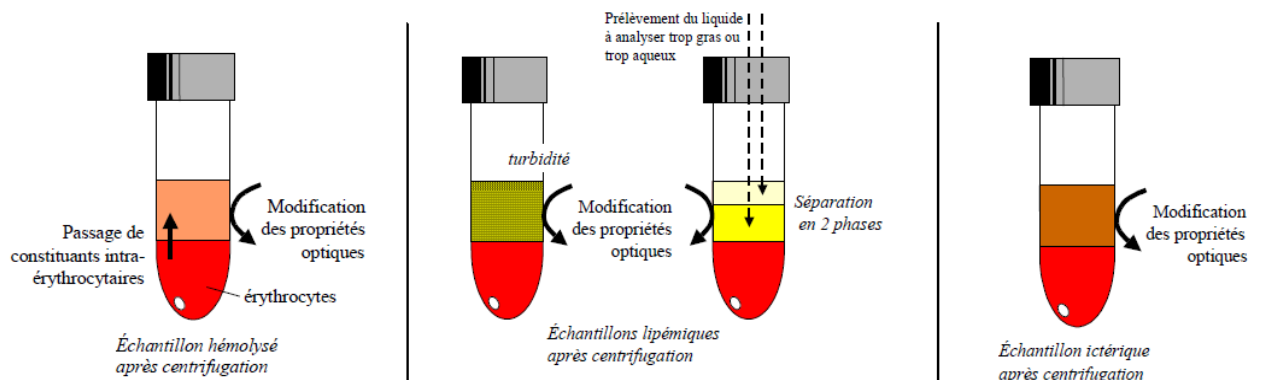
b. La lipémie

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. 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.

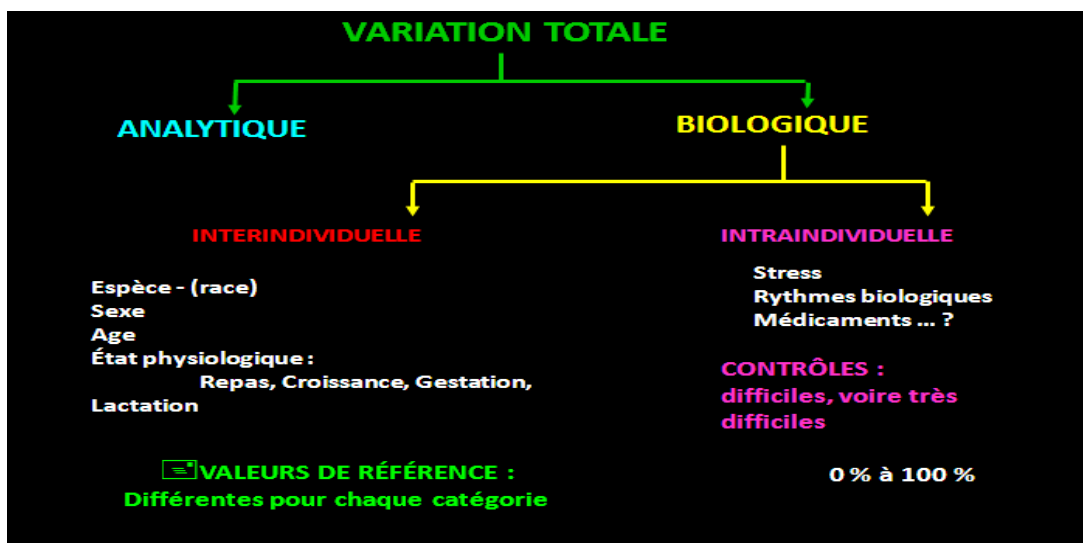
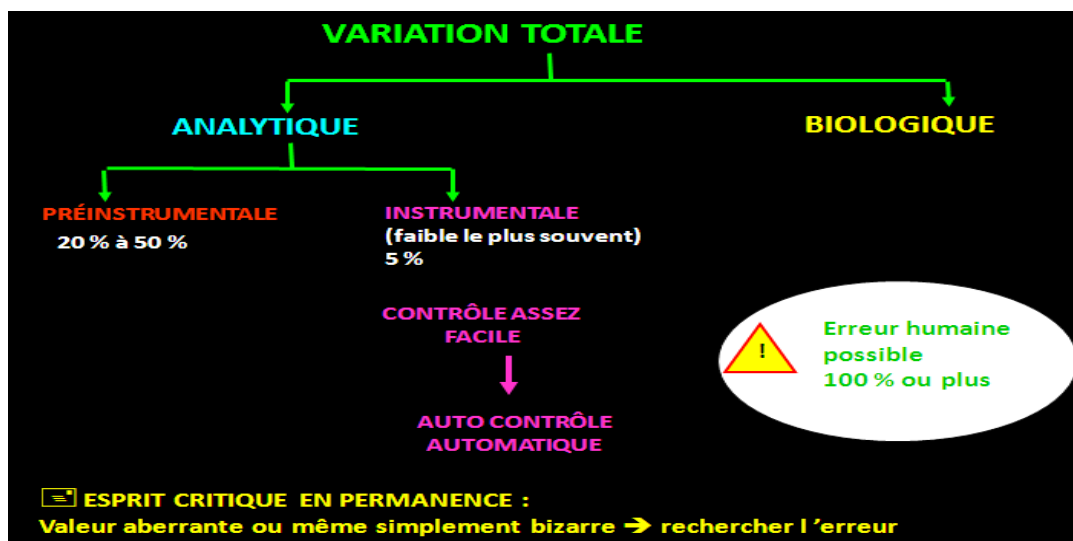
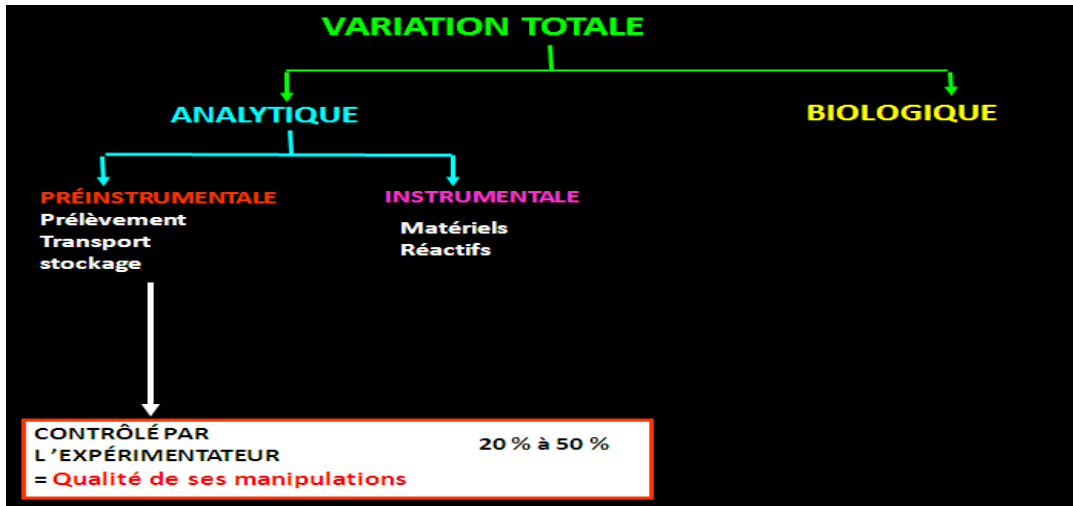
Concernant la variation instrumentale, elle dépend pour une partie de la qualité technique de la mesure et notamment de sa précision. Ainsi plus la méthode analytique sera précise et moins il y aura de variations liées à la technique dans les résultats.

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. QUALITES TECHNIQUES D'UNE ANALYSE

1. FIABILITÉ = performances de l'analyse

a. Spécificité analytique = capacité de différencier un constituant parmi ses proches (ex hémoglobine / bilirubine).

b. Exactitude – Précision: - **Exactitude** = la valeur mesurée doit être la plus proche possible de la valeur exacte. Ce critère est difficile à apprécier, car on ne connaît que très rarement cette valeur. Les laboratoires de qualité utilisent des sérums de contrôles produits industriellement, qui leur permettent de vérifier leurs résultats ; **les petits automates vétérinaires ont des bandelettes tests, il faut les utiliser régulièrement pour être sûr de leurs résultats.**

- **Précision** = plusieurs mesures d'un même échantillon, en une fois ou au cours de différentes manipulations doivent être les plus proches possibles. Elle est généralement de 5 à 10% (glucose, urée,...) pour les paramètres classiques, de 20 % pour les enzymes et les analyses utilisant des méthodes immunologiques (hormones, vitamines, etc.).

En pratique, cela implique de ne pas tenir compte des faibles variations : - 5 % de précision : Exemple pour le glucose : 0,95 ~ 1,00 g/L ~ 1,05 ; - 10 % de précision seuls 2 premiers chiffres à prendre en compte. Exemple : créatinine 11 ~ 12 mg/L ~ 13 ;

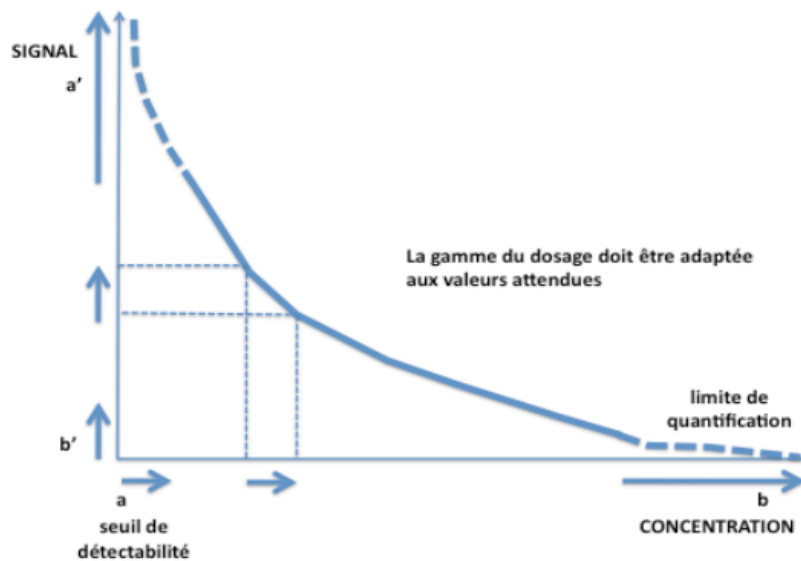
- 20 % de précision : Exemple : activité enzymatique : ALAT 80 ~ 100 U / L ~ 120.

c. Sensibilité analytique = C'est le rapport entre la variation de concentration et la variation de signal. Cette relation est rarement linéaire. On définit pour chaque analyse, 2 grandeurs : le seuil de détectabilité et la limite de quantification. Ces valeurs sont importantes pour l'interprétation des résultats. **La gamme du dosage doit se situer entre ces deux grandeurs.**

- **Le seuil de détectabilité** est la plus petite valeur mesurable différente de 0. En pratique : si le résultat de l'analyse est inférieur, on ne doit pas tenir compte du résultat chiffré. Exemple : si la limite de détection de la bilirubine est de 10 μ Mole et le résultat rendu par l'automate est 6 μ Mole, le résultat juste est $\leq 10 \mu$ Mole (on sait cependant que le résultat est très faible).

- **La limite de quantification** signifie que le signal est bloqué sur une valeur maximale.

Exemple : si la limite de quantification de l'activité PAL est 1 500 U et le résultat rendu par l'automate est 2300 U, on ne doit pas tenir compte du résultat chiffré, le résultat juste est $> 1 500$ U, (on sait cependant que le résultat est très fort).



Sensibilité d'une technique

2. PRATICABILITÉ = C'est la facilité de réalisation de l'analyse.

C'est à dire qu'elle ne doit pas nécessiter un personnel trop spécialisé et très entraîné, ni un matériel très sophistiqué ou fragile et être disponible rapidement (par exemple auprès du client, particulièrement vrai en rurale et en équine). En pratique, c'est très important de prendre en compte cela lors de l'achat de matériel.

3. EFFICACITÉ = pertinence de l'analyse = son pouvoir diagnostique.

Le paramètre analysé doit être **caractéristique** de l'organe et sa variation devrait être pathognomonique d'une maladie, de l'effet d'un toxique ou d'un médicament. **C'est rarement le cas**. Un organe peut avoir plusieurs marqueurs d'intérêts différents. Par exemple concernant le pancréas, on peut mesurer l'Insuline, le Glucose, la Fructosamine, les Triglycérides, le Trypsinogène, l'Amylase, la Lipase dans le sang et l'urine, le Glucose et les Corps cétoniques, etc.

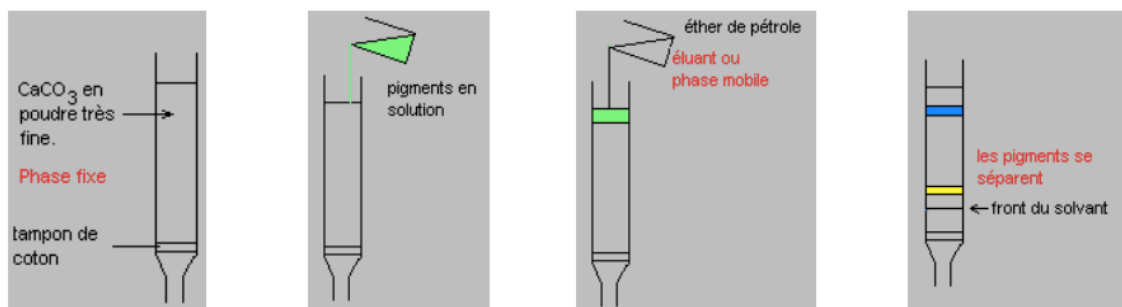
Un marqueur peut aussi varier avec plusieurs maladies et il peut y avoir des **variations identiques du même marqueur pour des causes différentes**. Exemple = l'activité des PAL comporte des variations physiologiques (Croissance ou Lactation), pathologiques (Cholestase, Syndrome de Cushing chez le Chien, néoplasie, atteinte osseuse), iatrogènes (Glucocorticoïdes chez le Chien, Barbituriques).

METHODES PHYSIQUES DE SEPARATION ET D'ANALYSE EN BIOCHIMIE

I. LA CHROMATOGRAPHIE

1. Définition

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 de la séparation de composés colorés puisque chroma (Χρωμα) en grec, signifie couleur et graphie signifie écrire. Elle a été réalisée en 1906 par le botaniste russe Mikhaïl Tswett et consistait à séparer les pigments d'une feuille d'épinards sur une colonne en CaCO_3 .



Séparation de pigments de feuille d'épinards par chromatographie

2. Principe de la séparation

Le principe de la chromatographie consiste à entraîner l'échantillon à l'aide d'un éluant (gazeux ou liquide) appelé phase mobile (PM), qui se déplace au contact d'une seconde phase fixée sur un support (colonne ou surface plane). Celle-ci, dite stationnaire (PS), elle est insoluble dans la première.

Chaque composé est caractérisé par un coefficient de distribution de Nernst K (appelé également coefficient de partition) défini comme suit:

$$K = \frac{C_s}{C_m} = \frac{\text{concentration du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{concentration du soluté dans la phase mobile}}$$

3. Classification des techniques chromatographiques

Les méthodes chromatographiques se classent de 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).

3.1 La chromatographie en phase liquide

3.1.1 La chromatographie de partage

a. 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 taches à l'aide d'un procédé approprié.

b. 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.

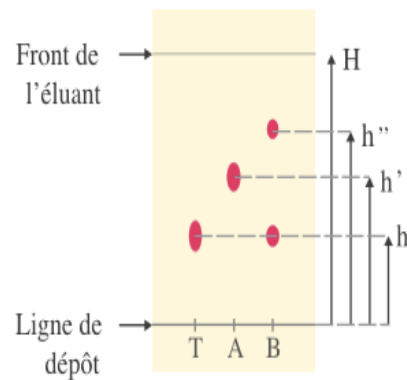
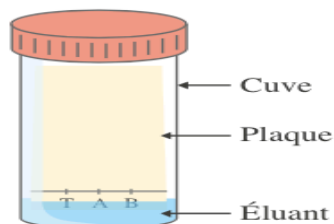
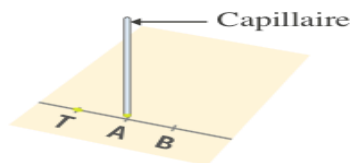
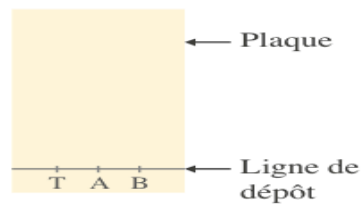
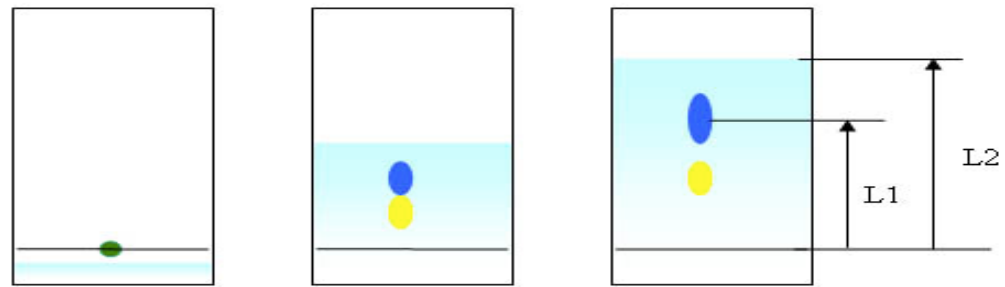
La cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre de forme variable ; fermé par un couvercle étanche. La phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixé sur une plaque de verre ou une feuille de matière plastique ou d'aluminium à l'aide 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.



Principe de séparation par CCM

Applications

La chromatographie sur papier est employée principalement pour l'analyse de composés très polaires, tels que les acides aminés, les sucres et les composés polyfonctionnels.

La CCM présente plusieurs applications ; elle permet le contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique, le suivi de la réaction chimique ou d'un fractionnement chromatographique sur colonne et la recherche du meilleur solvant, avant d'entamer une séparation sur colonne classique. Elle permet également la purification de petites quantités de produit (jusqu'à 100 mg). La bande qui contient le produit purifié est grattée, puis la silice est extraite avec un solvant. Le succès de ce mode de chromatographie est dû notamment à la facilité de sa mise en œuvre.

3.1.2 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 poreux et les gels d'alumine. Cette technique est complémentaire à la chromatographie de partage en phase 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.

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'éluant, 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'éluant : La vitesse d'éluant 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'éluant est trop faible, les constituants diffusent dans l'éluant. Le chromatogramme présente alors des bandes larges et la séparation est médiocre ; une vitesse d'éluant 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'éluant 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

- Une **colonne** est remplie avec une **phase stationnaire** ou fixe.
- Une **phase mobile**, ou solvant organique (ou mélange de solvants) ou **éluant**, est introduite au sommet de la colonne et entraîne les constituants (ou solutés) du mélange.
- Le solvant entraîne les molécules de solutés. Il existe une série de **transferts entre les 2 phases**.
- Les constituants du mélange migrent avec des **vitesse**s différentes. Ils sont élués (déplacés) et recueillis séparément, en solution dans la phase mobile, dans un détecteur de concentration.
- Un **chromatogramme** présente des pics en fonction du temps.

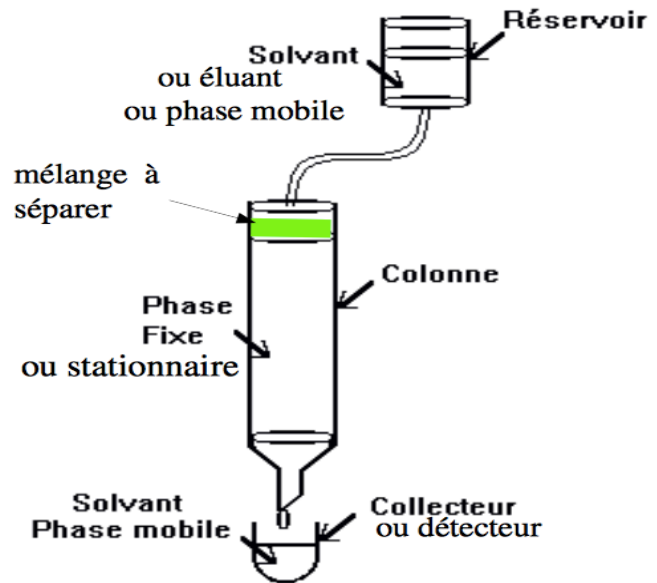


Fig. Chromatographie d'éluion sur colonne

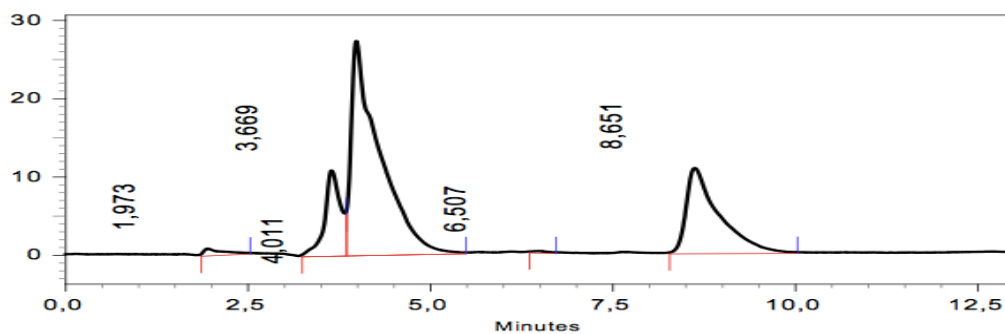


Schéma montrant la séparation de trois constituants par chromatographie

3.1.3 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.

En chromatographie ionique le mécanisme de séparation se produit par échange d'ions entre une phase stationnaire, qui porte des groupements fonctionnels chargés et une phase mobile. Des gels de silice chimiquement modifiés à l'état solide remplissent une colonne d'acier et servent de phase stationnaire.

La phase stationnaire dans la chromatographie ionique est une résine sous formes de billes échangeuses d'ions contenant des groupements chargés positivement ou négativement permettant la rétention des espèces dont on désire obtenir la séparation. Le soluté ionique ou ionisable interagit avec les groupes de charges opposées de la phase stationnaire.

La phase mobile est une solution aqueuse de force ionique donnée (généralement un tampon de pH). On peut éluer avec une solution de composition constante (conditions isocratiques) ou avec un gradient de pH et (ou) de force ionique, pour décrocher successivement les différents ions fixés sur l'échangeur.



Appareillage de chromatographie d'échange d'ions

Applications

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.

3.1.4 La chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion sur gel est une technique chromatographique qui permet de séparer des molécules, en fonction de leur taille et de leur forme.

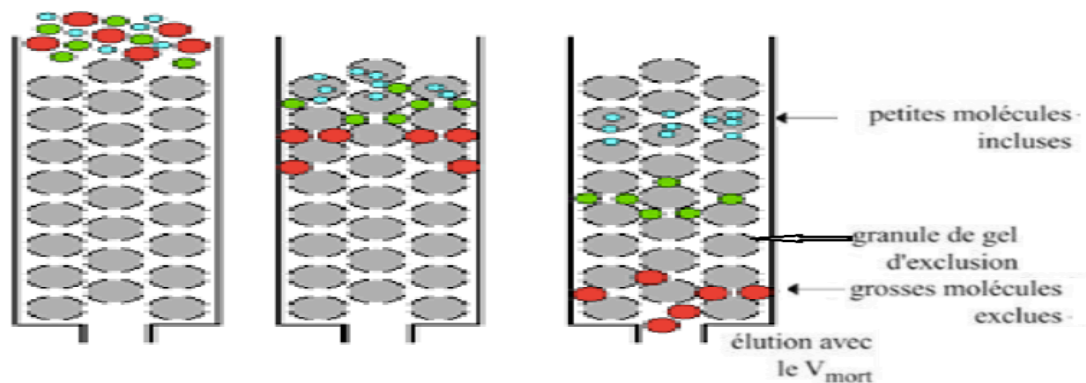
Dans cette technique de chromatographie on utilise des granules de gels poreux, dont les pores ont une taille voisine de celle des molécules des composés. La séparation résulte de la différence de taille, et est fondée sur la possibilité du soluté à pénétrer ou à ne pas pénétrer à l'intérieur des pores de la phase stationnaire (limite d'exclusion).

Les molécules de l'échantillon ; certaines 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.

Les phases stationnaires sont constituées par des polymères réticulés organiques ou minéraux, sous forme de grains sphériques de 3 à 10 mm de diamètre avec des pores compris entre 4 nm et 200 nm, sous forme de billes ou de perles parfaitement calibrées.

La phase mobile doit surtout être capable de mouiller la phase stationnaire et d'éviter l'adsorption. Lorsque le gel est mou, le solvant doit pouvoir le gonfler puisque la taille des pores de ce gel dépend de la quantité de solvant imbibée. Les solvants les plus couramment utilisés sont : Eau, chloroforme, trifluoroéthanol.

V = volume mort de la colonne, c'est le volume d'éluion d'une substance qui n'interagit pas avec la phase stationnaire



Principe de la chromatographie d'exclusion

Applications

Les applications de la chromatographie d'exclusion sont diverses, on peut citer, à titre d'exemple la séparation de polymères ou de macromolécules de poids moléculaires élevé d'origine biologique (fractionnement des polymères et des protéines).

3.1.5 La chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité est basée sur les interactions entre un effecteur, lié par covalence à un support inerte qui constitue la phase stationnaire (fixe), et son partenaire d'affinité en solution (molécule à purifier). Dans le complexe de nature biologique, dont la formation est à la base de la chromatographie d'affinité, l'un des partenaires au moins est une protéine ; cette protéine peut constituer le ligand fixe ou le partenaire d'affinité en solution. En général, le complexe peut être :

- enzyme-substrat
- hormone-récepteur
- antigène-anticorps

Le principe de cette technique consiste à préparer le gel d'affinité (résine), en fixant le effecteurs (ligand) sur un support inerte.

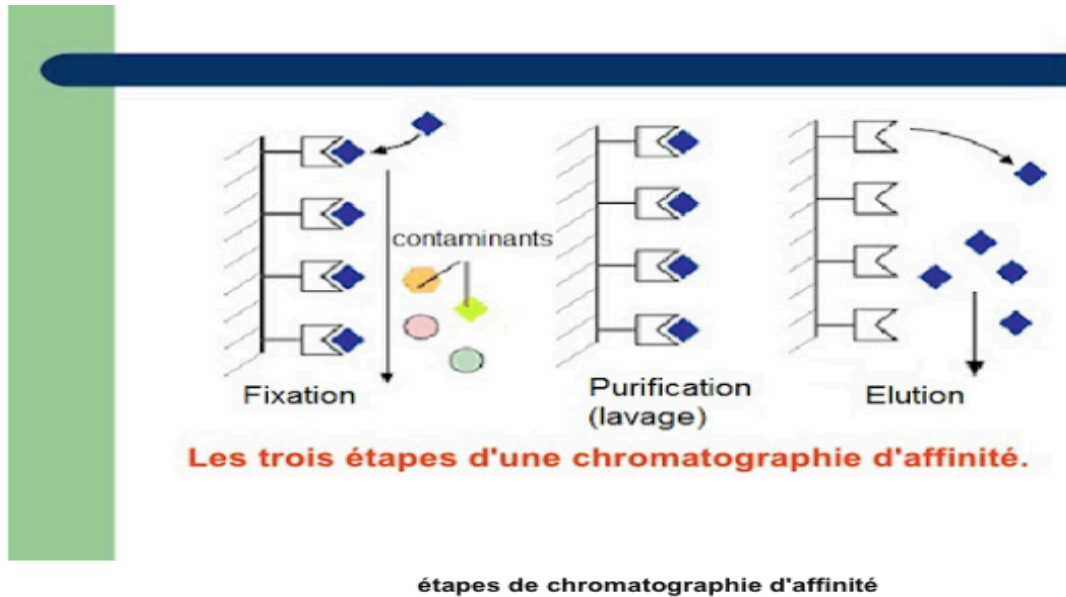
Effecteurs (Ligand) : Peuvent être effecteurs, toutes les substances capables de former des complexes stables avec les molécules à isoler. Les effecteurs utilisés sont :

- pour la purification des enzymes : des substances et analogues de substrats, des inhibiteurs réversibles, des coenzymes
- en immunologie : des antigènes, des anticorps.
- pour l'étude des protéines réceptrices : des hormones.

Une colonne est remplie de ce gel d'affinité, on y fait passer la solution aqueuse contenant la molécule à purifier. Celle-ci est retenue, alors que les contaminants en solution passent librement.

On élimine toute trace de produits indésirables par des lavages successifs. Enfin, on élue la molécule retenue en décomposant le complexe.

Pour cela, on modifie les conditions de milieu : changement de pH, utilisation d'un dénaturant réversible ou l'on fait passer une solution contenant un ligand ayant, pour la macromolécule retenue, plus d'affinité que le ligand fixe (inhibiteur compétitif réversible).



Applications

La chromatographie d'affinité a été utilisée :

- en enzymologie, pour l'extraction d'enzymes et la purification d'extraits enzymatiques.
- en immunologie, pour la purification d'anticorps.
- en protéinochimie, pour l'étude des protéines membranaires.

3.1.6 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.

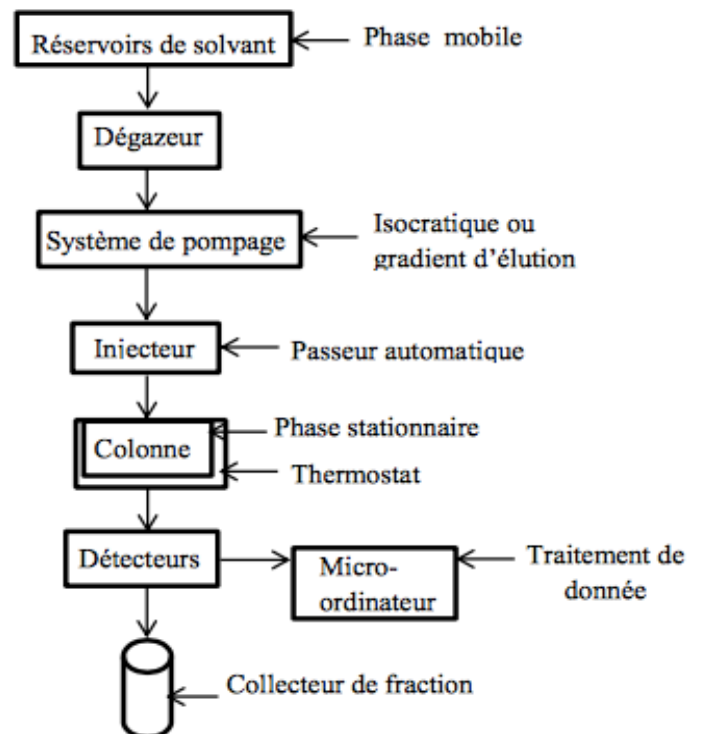
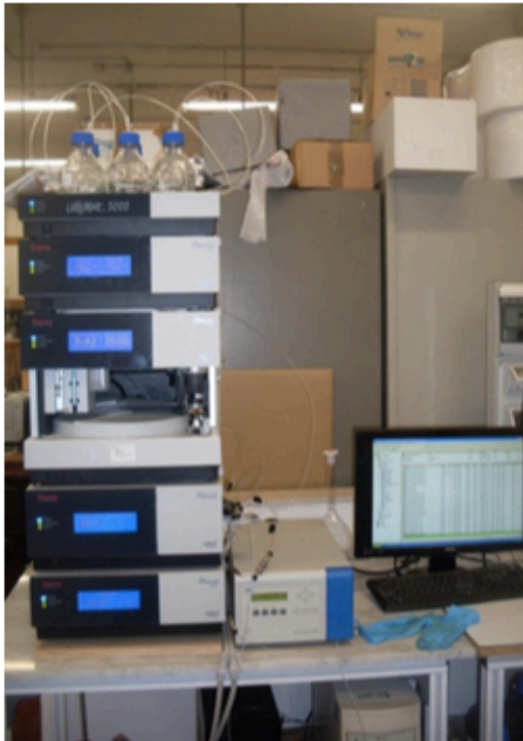
Un appareil CLHP comporte différents modules: un réservoir contenant la phase mobile, un système de pompage, un injecteur, une colonne, un détecteur à travers lequel un liquide

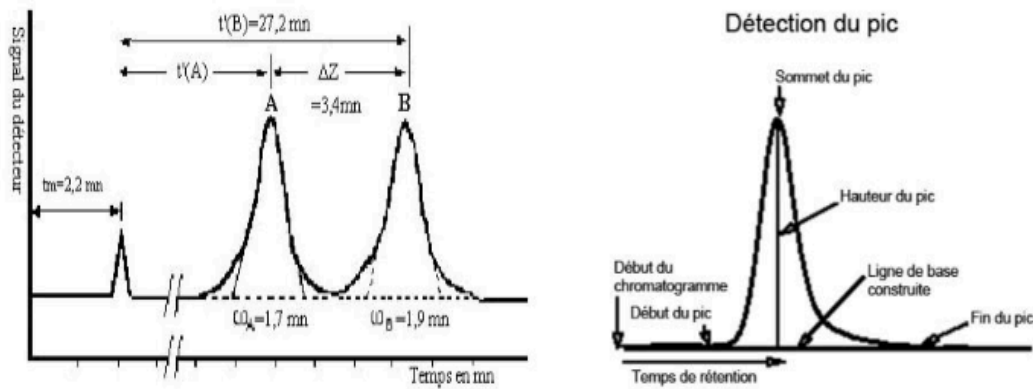
entraîne les substances d'un mélange à séparer et un système d'acquisition de données. Il nécessite également un dispositif de dégazage. Les différents modules sont reliés par des canalisations courtes et de très faible diamètre interne (0,1 mm).

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





V_0 = volume mort de la colonne, c'est le volume d'élution d'une substance qui n'interagit pas avec la phase stationnaire

t_0 = temps mort = V_0 / D

$t - t_0$ = temps de rétention réduit

V = volume de rétention total (volume de solvant nécessaire pour éluer le composé).

$V - V_0$ = volume de rétention réduit

W_b = largeur du pic à la base

W_h = largeur du pic à mi-hauteur

h = hauteur du pic

Applications

Les domaines d'applications sont nombreux et vastes, l'HPLC est particulièrement employée en biochimie:

- elle permet l'analyse de substances thermiquement instables, puisque l'opération s'effectue à T° ambiante.
- l'analyse de substances peu volatiles.
- l'analyse des substances ionisées (protéines, acides aminés...)

3.2 La chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode de séparation dont les principes généraux sont les mêmes que ceux énoncés pour la chromatographie en général, c'est-à-dire fondés sur la migration différentielle des constituants du mélange à analyser au travers d'un substrat choisi.

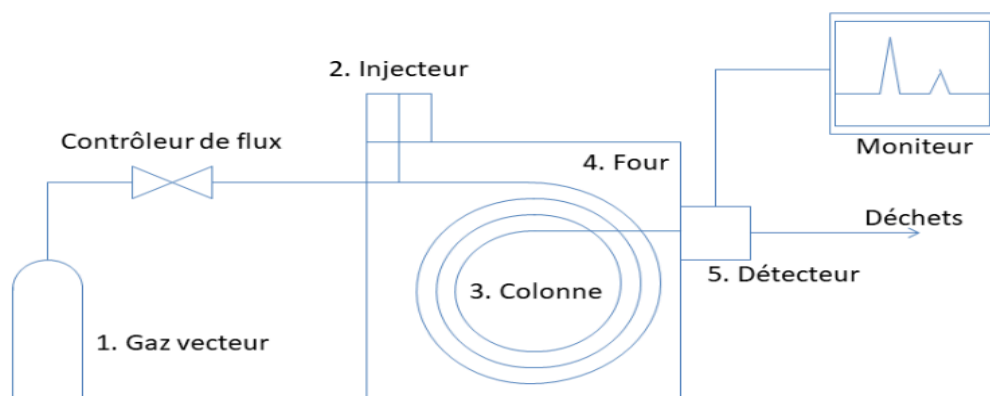
La particularité du procédé est d'opérer en totalité sur des produits volatilisés, ce qui implique de maintenir une température minimale convenable, mais sans qu'il y ait volatilisation du substrat, et de travailler en circuit étanche au gaz.

La chromatographie en phase gazeuse est une transposition de la chromatographie sur colonne dans laquelle la phase mobile liquide a été remplacée par un gaz.

- La CPG gaz-solide est une chromatographie d'adsorption, la phase stationnaire étant un solide adsorbant, la migration différentielle est assurée par les différences d'adsorbance.
- La CPG gaz-liquide est une chromatographie de partage, la phase stationnaire étant un liquide non volatil réparti sur un support inerte. Le gaz vecteur est le gaz qui véhicule les solutés. La migration différentielle est obtenue par les différences de solubilité dans le liquide fixe. Le soluté se partage entre le gaz vecteur et le liquide stationnaire.

Le gaz vecteur peut être de l'hélium, de l'azote, de l'hydrogène ou de l'argon, son choix dépend de facteurs tels que la disponibilité, la pureté, la consommation et le type de détecteur utilisé (avec des détecteurs à conductivité thermique, on choisit l'hélium en raison de sa conductivité thermique élevée par rapport à la plupart des vapeurs de composés organiques).

L'alimentation en gaz vecteur à haute pression implique des débitmètres et des régulateurs de pression, l'efficacité de l'appareil dépend beaucoup du maintien d'un débit constant du gaz vecteur.



Appareillage de la CPG

La CPG repose sur l'équilibre de partage des analytes entre une phase stationnaire et une phase mobile gazeuse. La séparation des analytes repose sur la différence d'affinité de ces composés pour la phase mobile et pour la phase stationnaire.

Le mélange à analyser est vaporisé puis transporté à travers une colonne renfermant une substance liquide ou solide qui constitue la phase stationnaire. Le transport se fait à l'aide d'un gaz inerte appelé gaz vecteur qui constitue la phase mobile.

La colonne est contenue dans un four de type chaleur tournante, dont la température est ajustable (entre 20 et 350°C) et programmable. Les températures utilisables dépendent des domaines de stabilité en température de la colonne utilisée et des composés analysés.

Plus la température du four (et donc de la colonne) est élevée, plus les analytes se déplacent rapidement dans la colonne, mais moins ils interagissent avec la phase stationnaire, et donc moins les analytes sont séparés.

Plus la température du four est basse, meilleure est la séparation des analytes, mais plus longue est l'analyse.

Le choix de la température est donc un compromis entre la durée de l'analyse et le niveau de séparation désiré.

Applications

- Détection des traces (toxicologie,...)
- Dosages en biologie (stéroïdes, acides gras, oses...)
- Microbiologie (analyse des produits de fermentation, taxonomie

II. 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.

1. 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.

a. 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 |

b. 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 | |

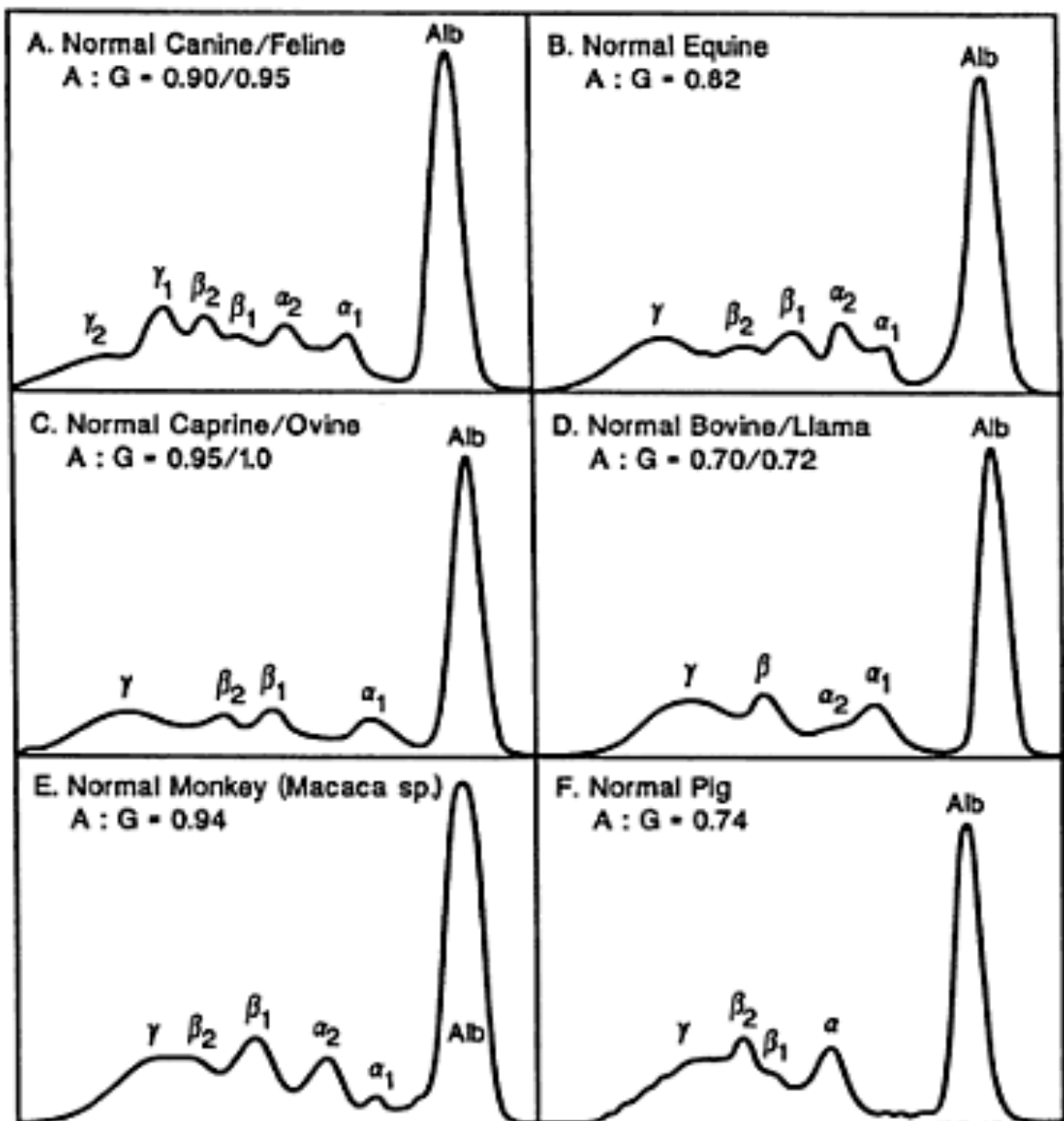
- Rapport albumine/globulines élevé

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

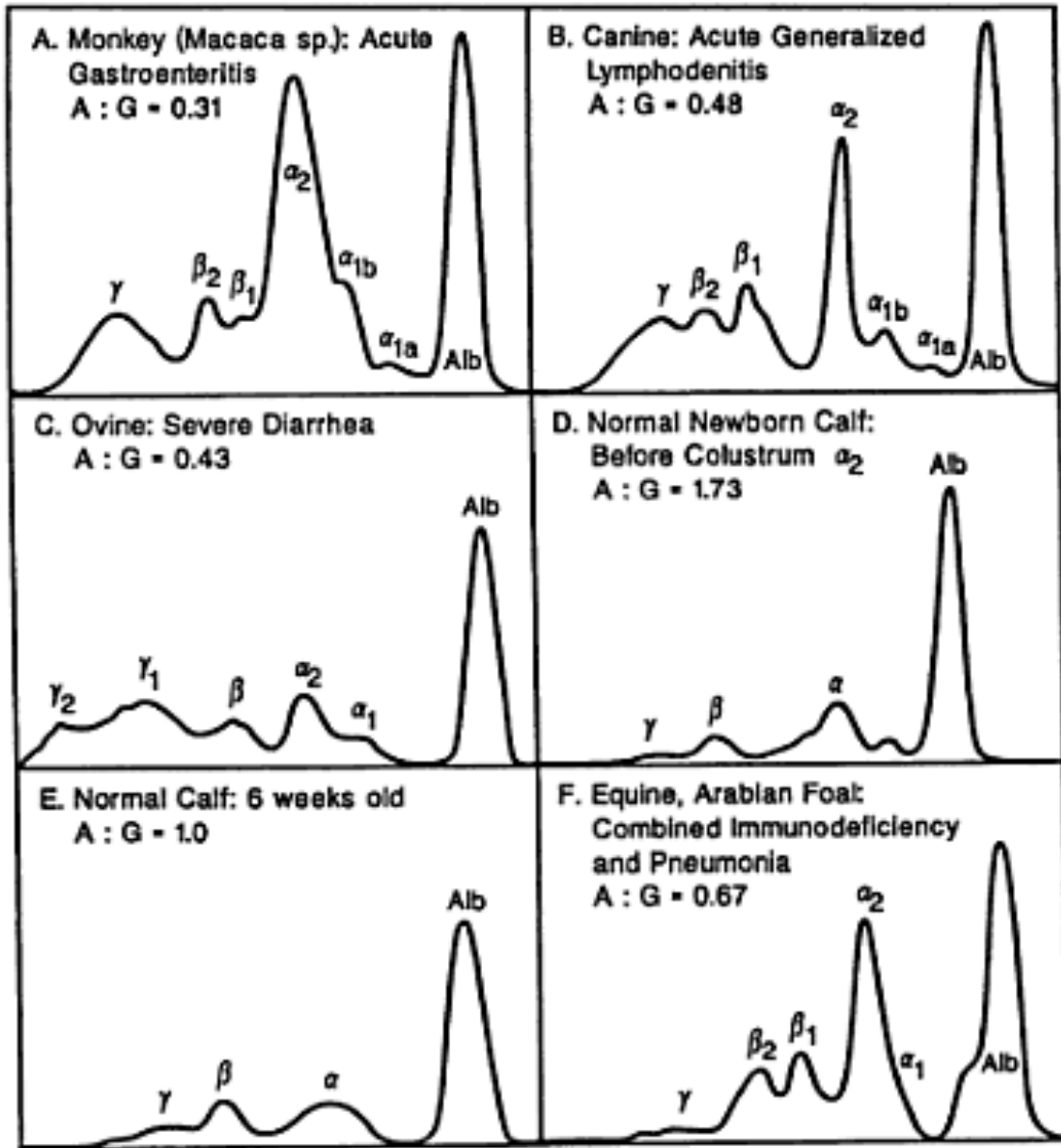
| Origines | Etiologie |
|---|--|
| Globulines diminuées (γ -globulines diminuées) | <ul style="list-style-type: none"> • Nouveau-né avant la prise du colostrum • Immunodéficience du poulain arabe • Agammaglobulinémie acquise ou héréditaire |

c. Exemples de profils électrophorétiques normaux

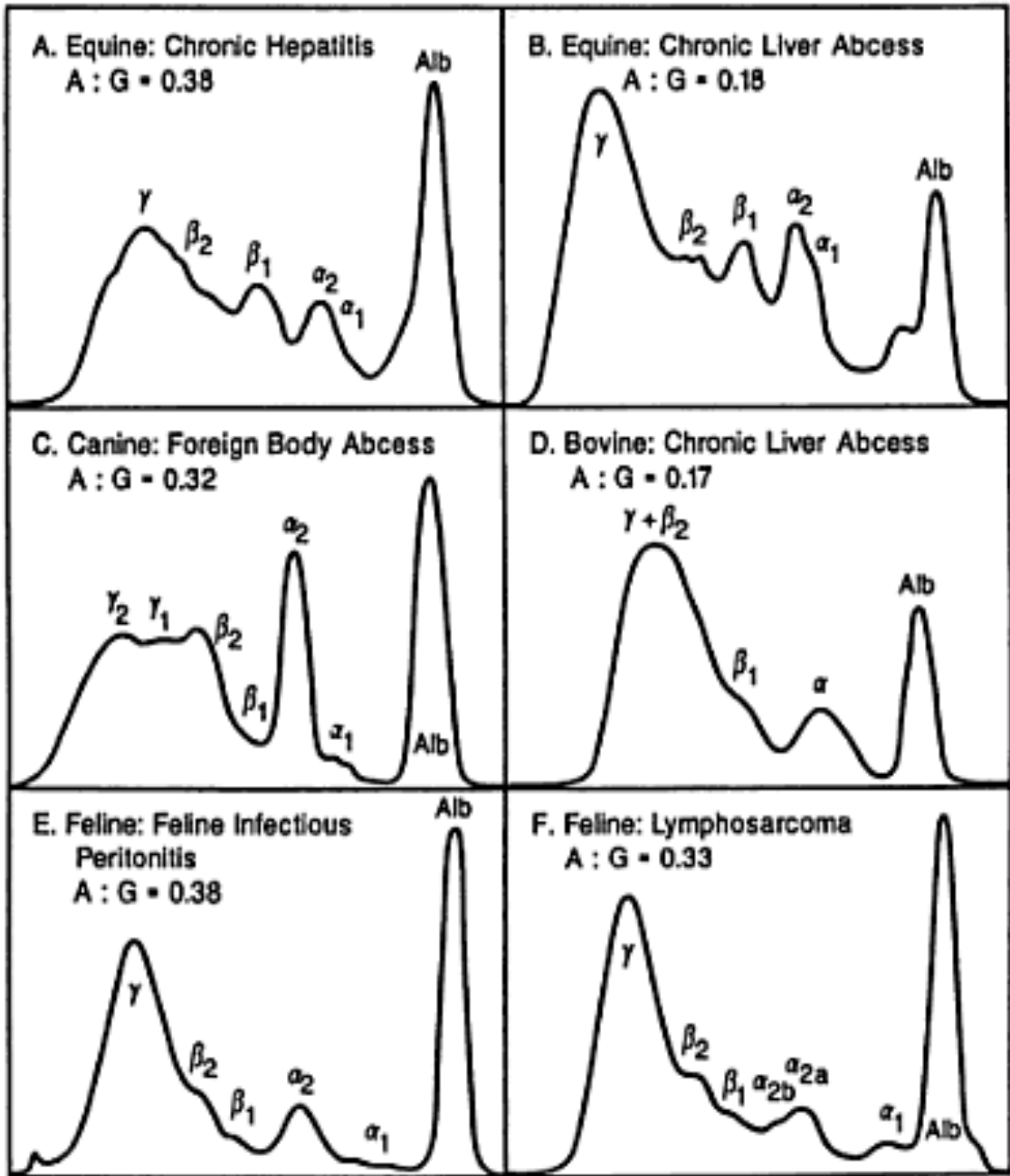


Electrophorégrammes normaux sur Acétate de Cellulose des protéines sériques de certains animaux adultes. Les ratios albumine/globulines sont dans les valeurs de références normales pour ces animaux.

d. Exemples de profils électrophorétiques pathologiques



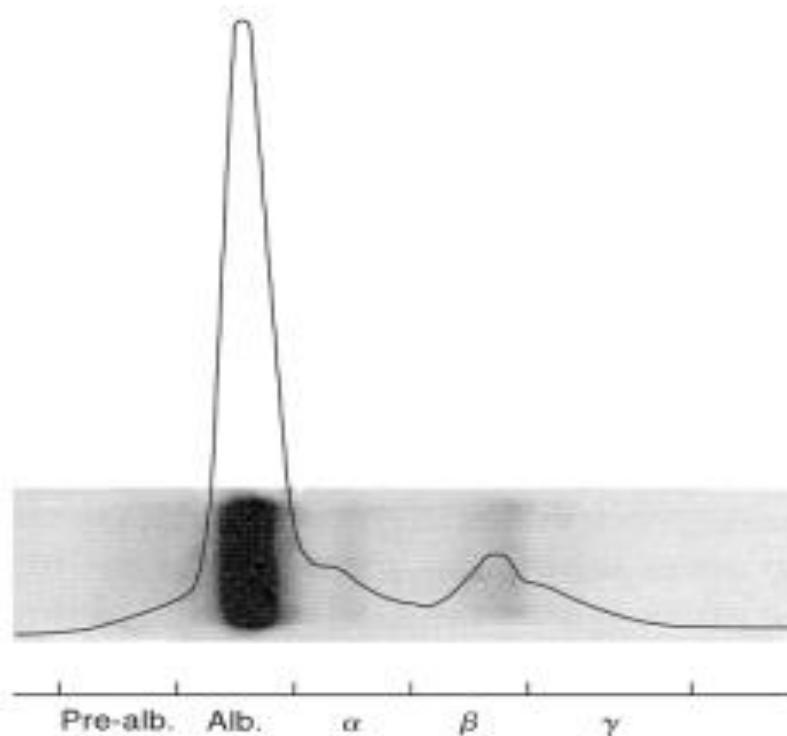
Electrophorégrammes sur Acétate de Cellulose des protéines sériques en cas de maladie inflammatoire aigue avec augmentation des protéines positives de l'inflammation (A,B,F), pertes gastro intestinales de l'albumine (C), nouveau-nés et jeunes veaux (D,E), et immunodéficience chez un poulain (F).



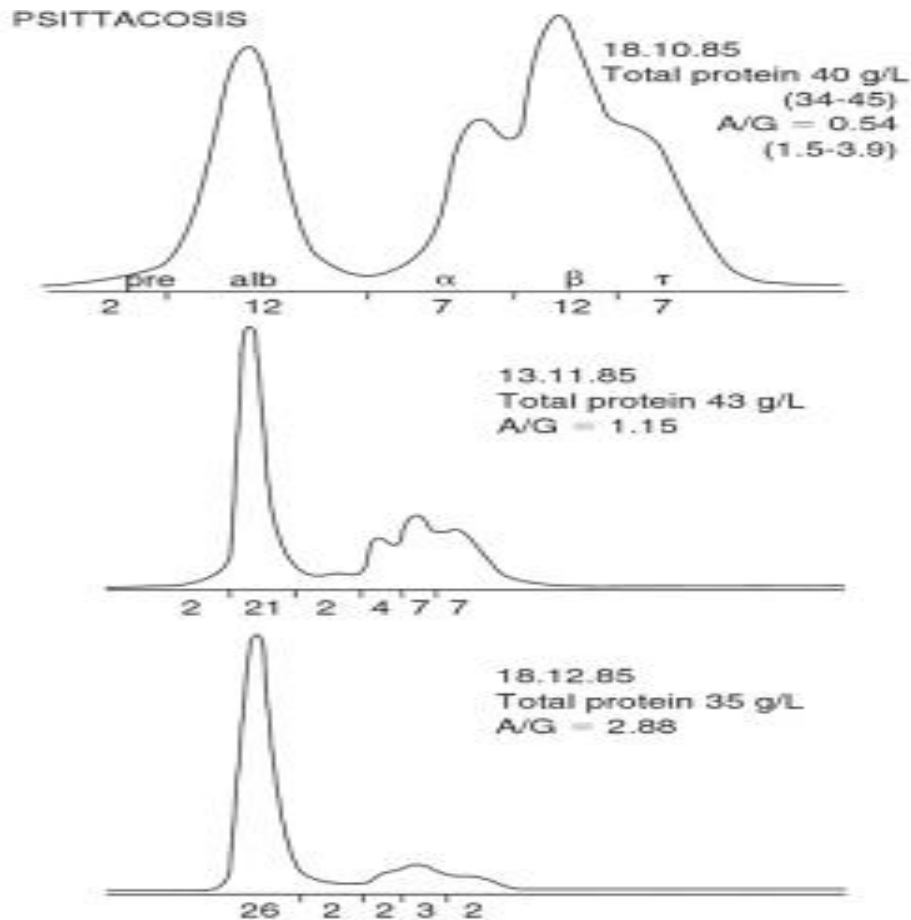
Electrophorégrammes sur Acétate de Cellulose des protéines sériques de certaines gammopathies monoclonales chez les animaux. Noter que les pics de globulines sont plus larges que les pics d'albumine.

e. 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.

2. 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.