

TP. 7 ACIDES NUCLÉIQUES

Structures. Propriétés

Introduction

Les acides nucléiques, constituants universels de vie, sont des molécules impliquées dans le stockage d'informations, la transmission et l'expression du message génétique. Certaines structures d'ARN (ribozymes) ont le rôle de catalyseur. Ce sont des molécules les plus importantes dans la cellule ; l'ADN fournit la banque de données et c'est le centre de coordination de la cellule. L'ARN mis en œuvre les ordres donnés par l'ADN nucléaire.

Les fonctions de l'ADN comprennent à la fois le maintien de la vie cellulaire dans les conditions environnementales changeantes du milieu extracellulaire et la transmission non modifiée de toutes les caractéristiques de la cellule mère à la cellule fille pendant la division cellulaire.

Du point de vue chimique, les acides nucléiques sont de brins polynucléotidiques de poids moléculaire haut, dans lequel les unités de base, les nucléotides, sont liés les uns aux autres par des liaisons 3',5'-phosphodiester.

Un **nucléotide** est composé d' :

- Une base azotée (purine ou pyrimidine);
- Un pentose (ribose ou désoxyribose);
- Une molécule d'acide phosphorique.

La molécule d'ADN est sous la forme de deux brins polynucléotidiques complémentaires, orientées anti-parallèle et connectées entre eux par des liaisons d'hydrogène entre les bases azotées complémentaires (adénine - thymine, guanine - cytosine). Les chaînes sont tordues à la droite autour d'un axe imaginaire, formant une structure en double hélice.

Applications pratiques

A. Composition d'acides nucléiques

Principe

Les acides nucléiques, ADN ou ARN, en milieu acide concentré, au chaud, hydrolysent en donnant les principaux composants: bases azotées, l'acide phosphorique et les pentoses. Ceux-ci peuvent être identifiés par des réactions spécifiques.

Réactifs

1. Acide perchlorique 0,5 N;
2. ADN ou d'ARN, préparations commerciales;
3. Ammoniaque 25%;
4. Acide nitrique concentré 65% (densité 1,40 g / ml);
5. Molybdate d'ammonium 5%;
6. NaOH 10%;
7. Réactif Fehling I: 70 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sont dissous et le volume est complété avec de l'eau distillée à 1 000 ml;
8. Réactif Fehling II: 150 g de sel de Seignette (tartrate double de potassium et de sodium) sont dissous dans environ 600 ml d'eau, on ajoute 300 ml de

- solution de NaOH 25% et le volume est complété avec de l'eau distillée à 1 000 ml;
9. Réactif Fehling de travail: est préparé selon les besoins par le mélange en rapport de volume de 1: 1, du réactif Fehling I avec le réactif Fehling II;
 10. nitrate d'argent 5%.

Procédure

1. Préparation de l'hydrolysate d'acide nucléique

Environ 50 mg d'acides nucléiques (ADN ou ARN), sont transférés dans un tube à laquelle on ajoute 5 ml d'acide perchlorique 0,5 N. Le tube d'échantillon est maintenu dans un bain d'eau bouillante pendant 30 minutes, puis est refroidis rapidement. Dans le cas où l'hydrolysate n'est pas clair, le contenu est transféré dans un tube à centrifuger et on centrifuge pendant 10 minutes à 5000 g. Le surnageant limpide ainsi obtenue est utilisé pour identifier les composants d'acides nucléiques.

2. Identification de l'acide phosphorique

1 ml de l'hydrolysate est introduit dans un tube à essai. On alcalinise avec 0,50 ml d'ammoniaque 25%, puis on l'acidifie avec 0,50 ml d'acide nitrique concentré. On ajoute à l'échantillon homogénéisé 1 ml de molybdate d'ammonium 5%. On introduit 5 minutes dans la bain d'eau bouillante. L'apparition d'un précipité jaune du phosphomolybdate d'ammonium indique la présence d'ions phosphate dans l'échantillon.

3. Identification des pentoses

1 ml de l'hydrolysate est mesuré dans un tube à essai. On ajoute 0,80 ml NaOH 10%, suivie par 2 ml réactif de travail de Fehling. Le tube est maintenu 5 minutes dans un bain d'eau bouillante. L'apparition de précipité rouge d'oxyde cuivreux indique la présence du composant glucidique.

4. Identification des bases azotées

Dans un tube à essai on introduit 0,50 ml d'ammoniac 10% lieu, on ajoute 2,0 ml de l'hydrolysate et 1,0 ml de solution de nitrate d'argent 5%. La présence de bases azotées est indiquée par la lente apparition (10 à 15 minutes) d'un précipité brun-blanc de composés argentiques de purines.

B. Absorption UV des acides nucléiques. Dénaturation des acides nucléiques

Principe

Tous les acides nucléiques, nucléosides et nucléotides absorbent intensément le rayonnement ultraviolet, propriété due à l'absorption donnée par les bases azotées. Le spectre UV d'un acide nucléique est la somme de spectres des bases azotées. L'absorption maximale se produit à $\lambda = 260$ nm, étant proportionnelle à la concentration de l'acide nucléique (Figure 1).

En général, une solution de 1 mg/ml d'acide nucléique sans une structure secondaire (à chaîne droite) présente $A_{260} = 25$, à pH neutre, pour l'épaisseur de la couche de solution d'un centimètre.

La structure secondaire réduit l'absorption de UV, étant donné que les bases azotées sont reliés entre eux par des liaisons d'hydrogène elles sont moins exposées. Ainsi, une solution de 1 mg / ml d'acide nucléique ayant la structure secondaire intégral (ADN natif ou ARNt) a $A_{260} = 20$ dans les mêmes conditions.

Par la dénaturation de l'ADN (pH fortement acide ou alcalin ou chauffage) la structure secondaire est perturbée, se produisant une croissance de l'absorption à 260 nm, un phénomène appelé l'effet hyperchrome. La renaturation de l'ADN (retour à pH neutre, refroidissement de la solution) pour restaurer la structure secondaire, diminue l'absorbance à 260 nm, un phénomène appelé l'effet hypochrome. La température à laquelle la moitié de l'ADN est dénaturé est appelée la **température de fusion de l'ADN T_m** (figure 2). La température de fusion est proportionnelle à l'énergie requise pour la rupture des liaisons d'hydrogène entre les bases azotées, liaisons qui stabilisent la structure secondaire. Par conséquent, la T_m augmente avec l'augmentation de la teneur en guanine-cytosine, qui forme trois liaisons d'hydrogène. La valeur moyenne de T_m est de 70-75°C

Réactifs et matériaux

1. Solution d'ADN 1 mg / ml. La solution a été diluée jusqu'à ce que le $A_{260} \approx 1,0$.

Procédure

Dessin du spectre d'absorption UV de la solution d'ADN

Le dessin du spectre d'absorption s'effectue selon l'appareil disponible. Si l'équipement est automatique le spectre est désigné en mode automatique. Dans le cas contraire, les valeurs d'absorption de rayonnement sont mesurées entre 200 et 300 nm, en notant les absorbances de 5-5 nm. On attire sur du papier millimétré le graphe de la dépendance d'absorbance fonction de la longueur d'onde.

La solution d'ADN est chauffée 5 minutes dans un bain d'eau bouillante. L'absorbance à 260 nm est déterminée, puis on refroidit rapidement la solution. On détermine la nouvelle A_{260} . On fait l'analyse des résultats.

Pour des préparations hautement purifiées, l'augmentation de l'absorbance peut être jusqu'à 40%.

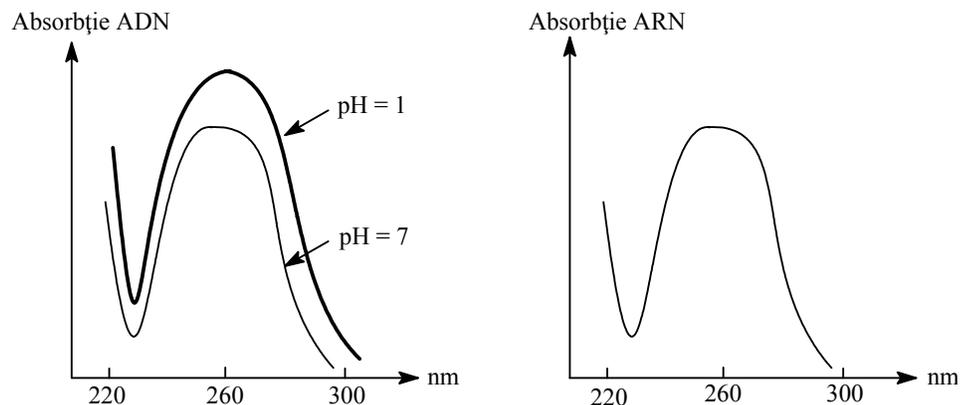


Figure 1. Caractéristiques spectrales de l'ADN et ARN

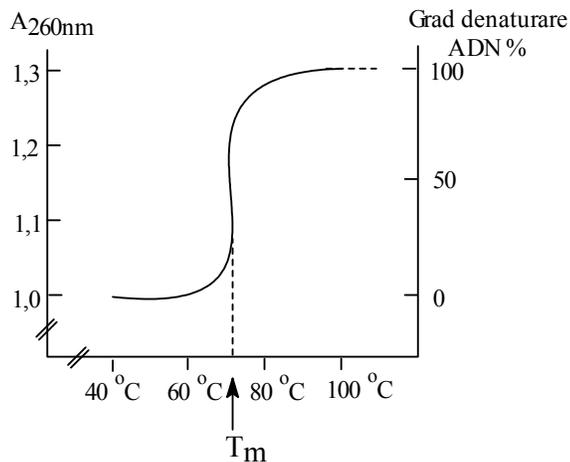


Figure 2. Courbe de fusion de l'ADN

La teneur en pour cent de la guanine (G) et cytosine (C) peut être calculée avec l'équation pour des valeurs de 30 à 70%:

$$\text{GC}\% = 2,44 (\text{T}_m - 69,3)$$

C. Détermination de la pureté et la quantité d'ADN par la méthode spectrophotométrique

Principe

Les acides nucléiques absorbent le rayonnement UV à 260 nm et les protéines à 280 nm. La valeur du rapport des densités optiques à 260 nm et 280 nm est une mesure de la pureté de la solution d'acide nucléique.

Réactifs

1. Solution TE: EDTA 1 mM dans du tampon Tris-HCl 10 mM, pH = 8,00;
2. ADN dissous dans du TE.

Procédure

1. La solution contenant l'ADN à déterminer est incubé pendant 3 minutes à 60°C, si elle a été conservée au frais.
2. La solution est centrifugée 20 sec à 1000 g, puis mis sur la glace.
3. Dans une cuvette spectrophotométrique, 1 cm d'épaisseur, est placé 2 ml de solution TE (témoin).
4. Dans un autre cuvette identique on introduit 1,99 ml solution TE et 10 µl solution d'ADN (de l'échantillon).
5. Les cuvettes sont placées dans le spectrophotomètre et l'absorbance de l'échantillon est lue à 260 nm et à 280 nm, par rapport au témoin.
6. Les deux lectures seront notées avec A₂₆₀ ou A₂₈₀.

Résultats et discussion

On calcule le ratio A_{260} / A_{280} . Les préparations pures ont la valeur de ratio de 1,8. Les valeurs significativement plus faibles indiquent une contamination par des protéines.

Le procédé spectrophotométrique peut quantifier l'ADN extrait à partir de différents échantillons biologiques. La détermination est basée sur le fait que la

valeur d'absorbance A_{260} de 1,00 correspond à une concentration d'environ 50 mg / ml.

Exemple: Un échantillon de l'ADN isolé a été dilué 20 fois pour atteindre la valeur de A_{260} de 0,8. La quantité d'ADN dans l'échantillon est calculée comme suit:

$$\mu\text{g ADN / ml} = \frac{0,80 \times 50}{1,00} \times 20$$

Méthodes de séparation. Électrophorèse

Introduction

Afin de séparer les acides nucléiques, en fonction du but, on peut utiliser diverses techniques de séparation: la centrifugation, la chromatographie, l'électrophorèse.

Pour la séparation d'acides nucléiques par **centrifugation** on utilise une ultracentrifugation en gradient de densité dans une solution de chlorure de césium. Dans ces conditions, les molécules d'ADN humain sont séparées en quatre groupes distincts sur la base de la densité, la principale, mieux représentés, et les trois autres bandes contenant l'ADN satellites et répétitifs. Cette méthode, bien abandonnée dans le cas de la séparation de l'ADN, offre la possibilité d'augmenter les quantités d'ARN de haute pureté et des échantillons biologiques, et est encore utilisée dans certains laboratoires, où la quantité et la pureté de l'ARN obtenu sont cruciales pour une analyse plus approfondie.

A partir des **procédés chromatographiques**, pour séparer des acides nucléiques, les techniques HPLC sont utilisées, plus exactement une variation de celui-ci appelé dHPLC (d-distorsion), la chromatographie par filtration sur gel et la chromatographie d'échange d'ions.

- **L'dHPLC** est un procédé de screening (criblage) pour détecter des mutations ponctuelles par la détection des hétéroduplexes qui se forment s'il existe une mutation, après la dénaturation et renaturation progressive des produits de PCR, en séparant les fragments qui montrent a mutation, de ce qui n'ont pas de mutations (normales).
- **La chromatographie par filtration sur gel** est utilisée pour la purification des produits de PCR, en les séparant à partir des amorces non consommé lors de la réaction d'amplification, des nucléotides, des divers ions existant dans la solution.
- **La chromatographie d'échange d'ions** est utilisée pour l'extraction rapide, en quantité suffisante et avec une bonne pureté de l'ADN et de l'ARN à partir d'échantillons biologiques. La méthode est basée sur le fait que aux différentes valeurs de pH, les molécules d'acides nucléiques sont retenus sur une membrane de silicium, puis sont éluées avec un tampon de pH différent, en créant répulsion électrostatique entre l'acide nucléique et la membrane. Pour les deux dernières méthodes chromatographiques décrites on utilise la centrifugation pour augmenter le temps d'éluion.

L'électrophorèse des acides nucléiques est une étape obligatoire dans toute protocole d'analyse d'acides nucléiques, en obtenant :

- la séparation de fragments d'ADN résultant de la digestion avec des enzymes de restriction;
- la vérification de l'amplification par PCR;
- l'identification et / ou la détermination semi-quantitative des fragments d'ADN résultant de l'amplification par PCR;

- la détection et la détermination semi-quantitative de l'ADN génomique obtenu après l'extraction de tissus.

Les analyses habituelles de l'ADN / ARN sont utilisés pour la détection de mutations dans différentes maladies, le diagnostic des maladies génétiques, des cancers, le diagnostic microbiologique, l'analyse de fragments nouvellement synthétisés d'ADN, l'analyse génomique, les tests de paternité et l'identification des individus, le profilage génétique des maladies, des tests de phylogénie etc. Toutes ces analyses comprennent nécessairement l'étape de l'électrophorèse.

Les acides nucléiques, en raison du nombre de résidus phosphate, présentent une forte charge négative, en migrant dans le champ électrique à l'anode.

En solution libre, à pH neutre ou alcalin, les acides nucléiques avec des poids moléculaires différents, montrent des rapport charge / masse très étroite et ne peuvent pas être séparés. Pour la séparation on utilise des matrices de gel (Polyacrylamide ou d'agarose) qui ont un l'effet de tamis moléculaire (en raison de la résistance à la migration de la matrice) permettant la séparation des molécules d'acide nucléique.

La mobilité d'un fragment d'ADN dans un gel est inversement proportionnelle a son poids moléculaire et est influencée par plusieurs facteurs ; par leur modulation on peut optimiser la séparation électrophorétique:

- **La concentration du gel:** le choix de la concentration du gel est fait en fonction de la masse des molécules à séparer. En principe, les gels d'agarose sont utilisés pour la séparation d'acides nucléiques à grande poids moléculaire (y compris l'ensemble des molécules d'ADN), tandis que la différenciation des molécules d'acide nucléique a poids moléculaire faible est fait dans des gels de polyacrylamide (à haute densité). La puissance de résolution augmente avec la concentration de gel: des concentrations plus élevées du gel ($\geq 10\%$) permettent la séparation de petites molécules, alors que des concentrations plus faibles ($\leq 10\%$) permettent la séparation de grosses molécules.
- **Tension appliquée:** Dans des conditions idéales, quand la température du gel est constante, la vitesse de migration est proportionnelle à la tension appliquée. Mais l'augmentation de la température réduit la viscosité du gel provoquant la distorsion de la migration. Pour cette raison, une bonne résolution pour des fragments de plus de 2 kb est obtenue en appliquant une tension de maximum 5 V / cm de gel (la valeur en cm est la distance entre les deux électrodes et n'est pas la longueur du gel).
- **Le tampon d'électrophorèse ;** le rôle d'un tampon d'électrophorèse est de fournir un pH et une force ionique constante aux valeurs optimales pour la séparation. Dans le cas de l'ADN double brin, les tampons les plus utilisés sont : TAE (Tris-acétate-EDTA), et TBE (Tris-borate-EDTA).
- **Effet de bromure d'éthidium:** la bromure d'éthidium est le colorant fluorescent le plus couramment utilisée pour mettre en évidence les bandes d'acides nucléiques séparées par électrophorèse. La liaison du bromure d'éthidium aux molécules d'ADN change leur poids et leur rigidité, ce qui réduit la mobilité électrophorétique. Il peut être ajouté directement au gel d'électrophorèse pendant la préparation de celle-ci ou en mélange avec des fragments d'ADN de l'échantillon à analyser.
- **Agents dénaturants:** on les utilise pour lutter contre le phénomène de l'agrégation et d'adsorption des molécules d'acide nucléique dans la matrice de gel, mais aussi pour éliminer les différences de conformation. Plus couramment

utilisés sont l'urée, le formamide (non utilisé pour des gels d'agarose!) et le formaldéhyde.

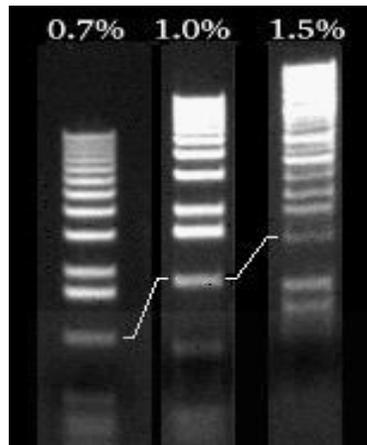


Figure 3. La séparation des fragments d'ADN dans des gels d'agarose de concentrations variables. La position des fragments de 1000 pb est indiquée dans chaque colonne.

Application pratique

L'électrophorèse des fragments d'ADN, obtenus à l'amplification (PCR), sur le gel d'agarose

Principe

Les fragments d'ADN migrent dans une matrice de gel d'agarose, en champ électrique, à un pH alcalin, en se séparant sous la forme de bandes électrophorétiques. Les fragments d'ADN ainsi séparés sont liés à la bromure d'éthidium contenu dans le gel, et les bandes fluorescentes sont visualisées en utilisant un appareil de trans-UV et sont photographiés.

Réactifs

1. agarose de pureté électrophorétique;
2. l'eau doublement distillée;
3. Le tampon stock TAE (Tris-acétate-EDTA), pH = 7,60: on dissout 242 g de Tris base et 18,61 g EDTA dans 500 ml d'eau deux fois distillée. On ajoute 57,1 ml d'acide acétique glacial et on vérifie le pH de la solution obtenue. Le pH est ajusté (si nécessaire) avec de l'acide acétique glacial ou avec du Tris base et la solution complétée à 1 litre avec de l'eau distillée deux fois;
4. tampon TAE de travail: on fait la dilution de la solution tampon stock avec de l'eau bidistillée 1/50;
5. bromure d'éthidium: solution aqueuses 10 mg / ml (! Attention, le réactif est toxique, éviter le contact avec la peau)
6. mélange de migration (on mélange l'échantillon d'ADN qui contient les indicateurs de migration bromophénol bleu et xilencyanol) : solution stock contenant 50% de glycérol; Bromo-phénol 0,25%; xylene cyanol 0,25% dans du tampon TAE de travail;
7. ADN échelle (ladder) (mélange de fragments d'ADN de taille connue - 50 pb, 100 pb, 150 pb, 200 pb, 250 pb, 300 pb, 350 pb, 400 pb, 450 pb, 500 pb);

8. échantillons d'ADN résultés à partir des d'amplification par PCR, avec des concentrations de 10 à 100 ng / μ l.

Appareil

- unité d'électrophorèse Bio-Rad Mini-Sub cellulaire GT ;
- source Bio-Rad DC Pac 300V;
- UV transluminale Fisher, avec $\lambda = 302$ nm pour les mesures de fluorescence;
- plaque de cuisson électrique;
- thermostat d'eau à 60°C;
- balance analytique;
- dispositif de formation des gels;
- pipettes automatiques de 0,5-10 μ l et 5-50 μ l;
- embouts de pipette;
- gants de latex;
- tubes Eppendorf 1.5ml;
- tige de verre;
- cylindre gradué 50 ml;
- bécher de 50 ml;
- verre de montre.

Procédure

Préparation du gel d'agarose:

- Installez un dispositif de formation de gel;
- Dans un bêche de 50 ml, pesez 0,1 grammes d'agarose;
- Ajoutez 20 ml TAE tampon de travail;
- Portez à ébullition sur la cuisinière, empêchant l'évaporation en plaçant le verre de montre sur la bouche du verre. Il fait ensuite bouillir jusqu'à ce que les particules d'agarose sont complètement dissous
- An utilisant un pince, insérez le verre dans le thermostat après l'enlèvement du verre de montre;
- Ajoutez directement 3 μ l solution de bromure d'éthidium dans la solution du verre. Remuez jusqu'à dissolution;
- Après 2-3 minutes, temps pendant lequel la solution a atteint environ 60°C, versez la solution dans le dispositif de formation du gel;
- Fixez le peigne dans le gel pour produire puits qui ou on mettront les échantillons;
- Laissez 20 minutes à température ambiante;
- Retirez soigneusement le peigne du gel;
- Retirez la casserole du gel formé.

Préparation des échantillons:

- Insérez dans des tubes Eppendorf 0,5 ml les échantillons d'ADN (10 μ l de chacun) et de 5 μ l mélange de migration;
- Dans le tube de témoin introduisez 10 μ l d'ADN marqueur 5 μ l mélange de migration

Application des échantillons et l'électrophorèse:

- Dans les réservoirs du dispositif d'électrophorèse insérez 300 ml de tampon TAE de travail;

- Attachez le plateau de gel dans l'unité de réservoir d'électrophorèse avec des puits orienté vers le cathode (le gel doit être recouvert couche de tampon d'une épaisseur de 6-8 mm);
- Appliquez 12-15 μl d'échantillons dans les puits du gel à l'aide d'une micropipette et différents pics pour chaque échantillon;
- Placez le couvercle sur l'appareil d'électrophorèse;
- Branchez l'appareil à une source d'alimentation;
- La source est connectée au réseau et est fixé à une tension constante de 75 V;
- Lancez la source;
- Laissez les échantillons de migrer 20-30 minutes, temps pendant lequel l'indicateur bleu de brome-phénol atteint le bord du gel, puis s'éteint la source d'alimentation.

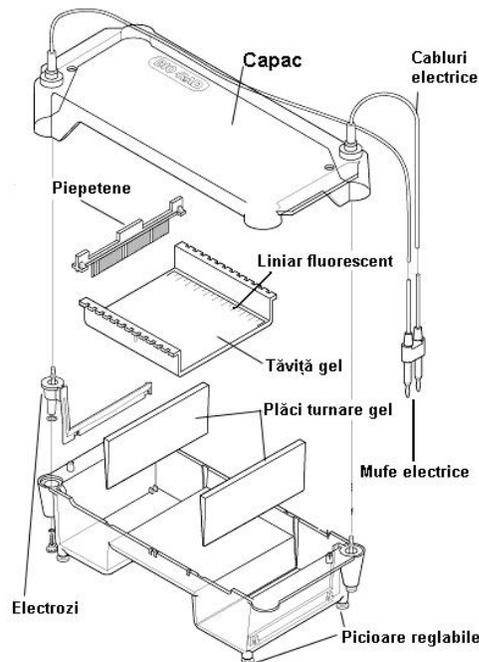


Figure 4. Composants de Bio-Rad Mini-Sub cellulaire GT

Visualisation des bandes

- Retirez le couvercle de l'appareil d'électrophorèse, retirez le plateau et placé sur un papier filtre pour enlever les murs de plateau de tampon;
- Placez le plateau sur le support transparent du transilluminateur et couvrez avec couvercle de protection;
- Lancez le transilluminateur et fixez la longueur d'onde de 302 nm;
- Les bandes dans les échantillons d'ADN sont comparées avec celles de fragments d'ADN marqueur;
- On confirme de cette façon la réalisation de l'amplification (dans les échantillons PCR) et on détermine approximativement la taille du fragment d'ADN séparé;
- Le gel peut être photographier en utilisant un appareil photo digital (a lequel on peut ajouter des filtres optiques) ou un système dédié pour l'acquisition d'images de gels d'électrophorèse, ex. le type Gel Doc (système de documentation de gel) (figure 5).

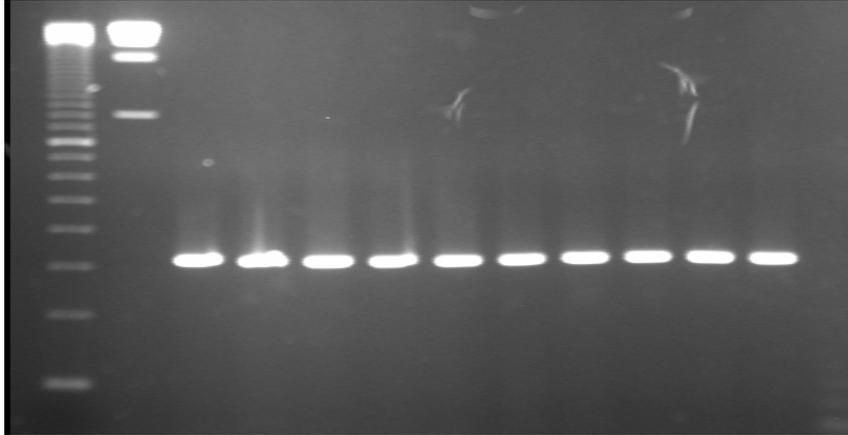


Figure 5. Images photographiques de l'électrophorèse d'échantillons d'ADN (amplification PCR) et un des échantillons marqueurs

TP 8 Méthodes immunologiques de détermination (MID)

A. Introduction

Les méthodes immunologiques de détermination sont des procédés de haute spécificité et sensibilité, qui sont basés sur la réaction entre l'antigène et l'anticorps. Ces méthodes ont été améliorées avec le développement des connaissances en immunologie ; elles sont utilisées dans la détermination quantitative de substances qui se trouvent dans de très faibles concentrations dans les produits biologiques et qui, par ailleurs, doivent être distinguées d'autres substances ayant une structure similaire (hormones, des antigènes viraux, des marqueurs tumeur, médicaments, etc.).

L'antigène (Ag)

Chaque substance chimique qui peut interagir avec les récepteurs spécialisés des cellules immunes est un antigène. Les récepteurs spécifiques pour les antigènes sont les immunoglobulines localisées sur la surface des lymphocytes B (BCR = B cell receptors) et les récepteurs pour les antigènes des lymphocytes T (TCR = T cell receptors)

L'immunogène

L'immunogène est une substance chimique qui peut induire une réponse immunitaire spécifique (production des anticorps) si l'immunogène est introduit dans l'organisme. Donc, chaque immunogène est un antigène, mais chaque antigène n'est pas un immunogène.

Les antigènes peuvent avoir une structure protéique, lipidique, glucidique et même des molécules anorganiques (métaux lourdes).

Les récepteurs d'antigène ont une structure chimique par laquelle ils peuvent reconnaître et interagir spécifiquement seulement avec des structures plus petites, 5-6 acides aminés ou 6-8 monosaccharides.

Pour être immunogène (déterminer une production d'anticorps) une substance doit avoir une masse moléculaire suffisante:

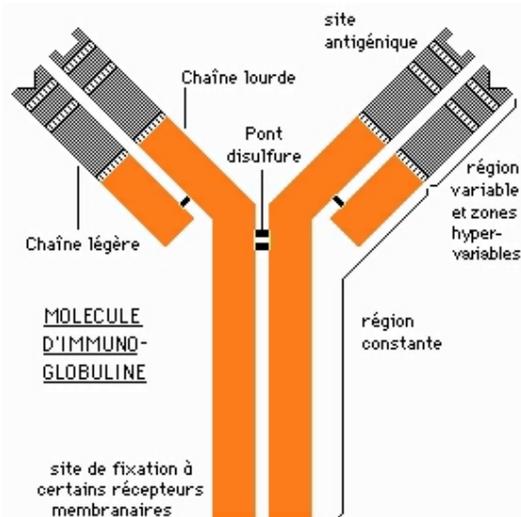
- $M_M < 1000 \text{ Da} \Rightarrow$ la substance n'est pas immunogène
- $M_M < 10000 \text{ Da} \Rightarrow$ la substance est un immunogène faible ou n'est pas immunogène
- $M_M > 10000 \text{ Da} \Rightarrow$ la substance (nous parlons des macromolécules à cette masse) est un bon immunogène

Haptène = une substance incapable par elle-même de promouvoir une réaction immunitaire, mais capable de réagir avec des anticorps préformés. Par couplage avec une molécule transporteur (carrier) l'haptène peut induire une réponse immunitaire.

Les anticorps (Ac).

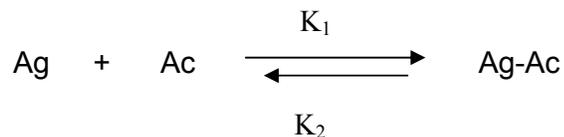
Les anticorps sont des substances protéiques (glycoprotéines, parce que il y'a une partie oligoglucidique dans leur structure) produites par les lymphocytes B qui sont transformées en plasmocytes – des clones cellulaires, lymphocytaires – qui restent dans le sang pour beaucoup d'années (l'immunité gagnée après certaines maladies).

Les anticorps sont des immunoglobulines: IgA, IgB, IgE, IgG et IgM. Les immunoglobulines sont classifiées (après les chaînes lourdes: α , δ , ϵ , γ , μ) en 5 types: Ig A, E, G, D, M. Il y'a aussi deux types des chaînes légères: κ et λ . Les immunoglobulines sont visibles sur l'électrophorèse dans le fragment des γ - globulines



Représentation schématique d'un anticorps

La réaction entre Ag et Ac



La réaction est réversible, l'équilibre est atteint lorsque la quantité de complexe immun formée est égale à la quantité de complexe immun dissocié par l'unité de temps. La liaison entre l'antigène et l'anticorps est limitée, parce que l'énergie de liaison est comprise entre 34-65 kJ / mol, similaire à l'énergie du mouvement thermique. La stabilité des complexes immuns est obtenue en faisant seulement à l'intermédiaire d'un nombre suffisant d'interactions hydrophobes.

La réaction antigène-anticorps est influencée par le pH, la force ionique, la température de l'environnement. Pour cette raison, pendant leur utilisation dans des procédures de diagnostic on doit strictement maintenir les conditions de fonctionnement optimales de la réponse immunitaire.

La réaction entre l'antigène et anticorps est utilisée dans les méthodes et les techniques de dosage immunologique - immunochimique.

Les immunoessais

Les dosages immunologiques sont un ensemble de méthodes analytiques quantitatives, qui sont basés sur la réaction spécifique entre l'antigène et l'anticorps.

Du point de vue du principe qui les sous-tend, les immunoessais sont de deux types: méthodes et immunodétermination par compétition immunitaire et méthodes immunométriques par deux sites. Quel que soit le principe de base, les immunoessais exigent l'existence d'un marqueur.

a) Le marqueur

Le marqueur est une entité (atome, ion, molécule, etc.) qui se lie chimiquement soit à la molécule d'anticorps ou à une molécule d'antigène. Le marqueur a la capacité d'émettre un certain signal, en quantité mesurable. Les marqueurs actuellement utilisés sont de trois sortes: radioactif, enzymatique et

luminescent. Les symboles d'antigènes marqués ou d'anticorps marqués sont : Ag* ou Ac*.

- **Marqueurs radioactifs** : sont des isotopes instables de différents éléments chimiques ayant la propriété d'émettre un rayonnement au cours de leur désintégration (α , β ou γ) mesuré avec un détecteur de rayonnement. Actuellement, les isotopes les plus couramment utilisés sont: l'iode 125 (^{125}I) avec émissions γ , et le tritium (^3H) avec émission β doux. Les avantages de ces marqueurs est que le marquage se fait facilement, et le signal spécifique est facilement détectée avec un équipement relativement simple. L'inconvénient est lié au risque de travailler avec l'isotope radioactif (pour le personnel et l'environnement), ainsi que la possibilité d'immunoréactivité altérée par oxydation (pour iode 125). Les méthodes utilisant des marqueurs radioactifs sont appelés radio-immunologique.
- **Marqueurs enzymatiques** - sont des enzymes qui agissent sur un substrat spécifique (chromogène), et selon la réaction chimique, l'absorption du rayonnement du milieu réactionnel est modifiée, ou on résulte un composé qui émet un rayonnement dont l'intensité est déterminée par spectrophotométrie d'émission. Exemples: la peroxydase, la phosphatase alcaline, la glucose oxydase, la glucose-6-P-déshydrogénase, la D-galactosidase. Les méthodes sont appelées dosage immuno-enzymatique (ELISA)
- **Marqueurs luminescents** (luminophores) - sont des substances qui émettent un signal lumineux mesurable (émission de rayonnement), secondairement d'un apport d'énergie (lumineuse, chimique). Suite à l'absorption d'énergie par luminophores, les électrons passent du niveau d'énergie fondamentale à un niveau supérieur, excité, et leur des-excitation se produit avec l'émission de rayonnement (UV, VIS). Les méthodes sont appelées imunoluminescentes (CLIA, BLIA). Selon le type d'énergie absorbée, le processus est le suivant:
 - ❖ **chimiluminescence** (énergie absorbée est consécutives a une réactions chimiques) - Exemples de luminophores: luminol, l'isoluminol, etc. Un type particulier de luminescence nécessitent la présence d'enzymes, la bioluminescence, et le marqueur est le système luciférine - luciférase. Méthode est appelé CLIA. Le rayonnement émis est détecté par des luminometres.
 - ❖ **photoluminescence** – l'énergie lumineuse est absorbée et les luminophores sont appelés:
 - **Fluorescentes** (ex.: chelates de lanthanides: europium), le rayonnement étant détectés par fluorescence.
 - **Phosphorescent** (ex: Érythrosine isothiocyanate), le rayonnement est détecté avec phosphorimetres. La méthode est BLIA.

Types d'immuno-déterminations

A. Méthode basée sur la compétition immune

Cette méthode a été décrite pour la première en 1959 par R. Yalow et RA Berson et a révolutionné les techniques pour la détermination des hormones et d'autres substances présentes dans des concentrations très faibles dans des fluides biologiques (antigènes viraux, des marqueurs tumoraux, des médicaments, etc.).

La compétition immune est la compétition qui se produit entre un antigène (Ag) et le même antigène marqué (Ag*) pour remplir le site de liaison de l'anticorps (Ac) pour former des complexes immuns (Ag-Ac et Ag*-Ac).



Cette technique exige de répondre à certaines conditions préalables:

- Ag et Ag* doivent être immunologiquement identiques (le marquage ne doit pas altérer l'épitope reconnu par l'anticorps);
- la quantité de Ag* doit être fixe et connu;
- le mélange de Ag et Ag* doit être fixe et au-delà de la quantité d'anticorps (d'où un nom pour cette méthode: méthode au déficit d'anticorps);
- de fournir des conditions optimales de température, pH, force ionique, etc. requises par la réaction immune.

Après avoir effectué la réaction immune et l'équilibre est établi, on intervient avec une méthode (qui, cependant, ne pas modifie cet équilibre) de séparation des fractions Ag et Ag* qui n'ont pas réagi (fraction libre F et F*) de la fraction liée (B et B*). Enfin, on mesure quantitativement le signal provenant F* et B* (éventuellement le signal total: T* = F* + B*). Entre les fractions marquées et non marquées existe la relation:

$$B / F = B^* / F^*$$

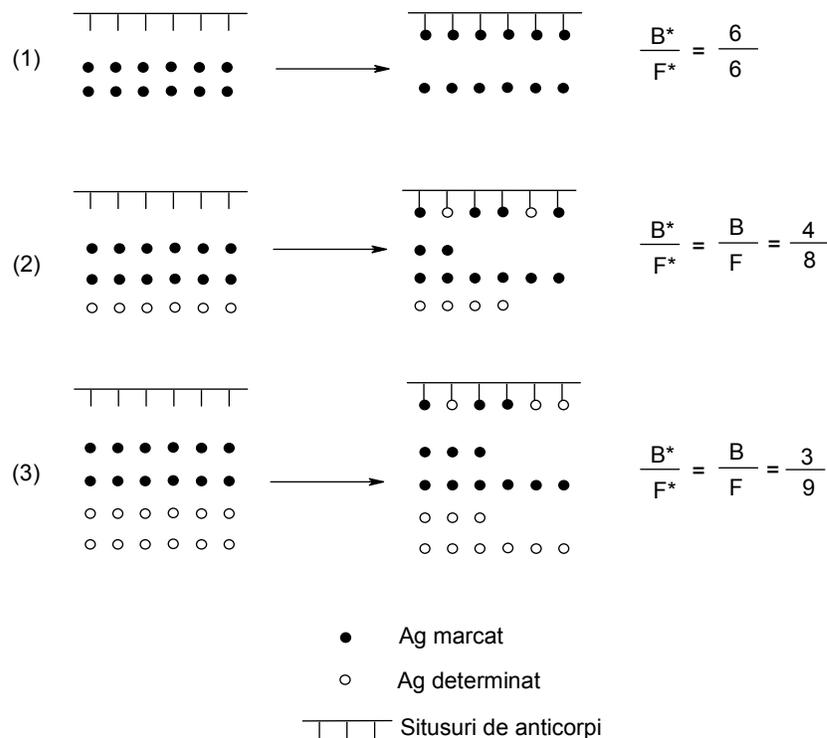


Figure . Méthode basée sur compétition immune

- (1) réaction sans antigène (non marqué, à déterminer)
(2) et (3) réaction en présence de quantités variables d'antigène non marquée et l'apparition de la compétition

La détermination des quantités inconnues de Ag est fait par rapport à une courbe standard établi sur la base de mesure de l'activité des étalons contenant des concentrations croissantes de Ag*. La courbe standard obtenue aura une allure descendante, l'activité mesurée étant inversement proportionnelle à la concentration d'Ag.

L'avantage d'immuno déterminations par compétition est qu'elles peuvent être appliquées à n'importe quel antigène, même si il a un épitope unique, à condition qu'ils répondent à deux objectifs:

1. La constante d'affinité d'Ac pour l'Ag doit être assez élevée pour que la limite de détection soit aussi bas;
2. Le nombre de sites de liaison (situés sur Ac) doit être constante dans des tubes de réaction pour que la précision obtenue soit élevée.

Les inconvénients de ce procédé sont les suivants:

- l'apparition d'interférences avec d'autres molécules qui possèdent un épitope identique à celui de Ag (fragments, métabolites, molécules apparentées);
- difficile d'assurer la cohérence du nombre de sites de liaison dans les tubes de réaction, en particulier si le mélange de Ag et Ag* est en excès en comparaison avec Ac.

B. Méthode immunométrique avec 2 sites

L'utilisation de deux anticorps monoclonaux - un monté sur un support solide (Ac) et dirigé contre un épitope de l'antigène et le 2-eme anticorp marqué (Ac*), dirigé contre un autre épitope sur le même antigène, les deux anticorps étant en excès de la Ag. Il se forme Ac-Ag-Ac* - d'où le nom de la méthode : le procédé avec 2 anticorps ou méthode "sandwich".

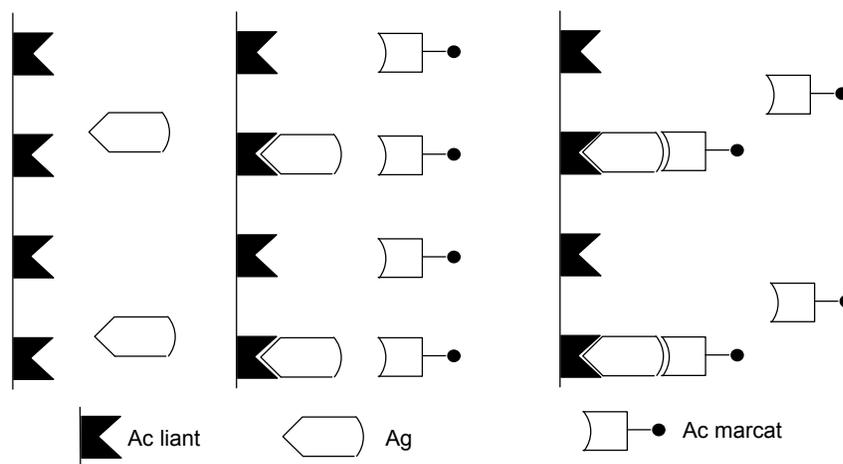


Figure. Méthode immunométrique a 2 sites

Une courbe standard est utilisée aussi dans ce cas, obtenue avec des standards d'antigène de concentration connue.

L'utilisation de deux anticorps monoclonaux dirigés contre des epitopes différents sur le même antigène conduit à la croissance de la spécificité de la méthode, ce qui est important dans le cas de molécules structurellement apparentées (hormones glycoprotéiques: TSH, FSH, LH, hCG). Le procédé a une limite de détection beaucoup plus faible par rapport au méthode immune de compétition.

Méthode ELISA

La méthode immuno-enzymatique ELISA (de l'anglais enzyme-linked immunosorbent assay, littéralement « dosage d'immunoabsorption par enzyme liée », c'est-à-dire dosage immuno-enzymatique sur support solide) est un examen de laboratoire, principalement utilisée en immunologie pour détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon.

Ce test entre dans le cadre plus général des EIA (enzyme immunoassays), dans lequel le dosage est couplé à une réaction catalysée par une enzyme qui libère un composant coloré suivi par une spectroscopie, par opposition aux RIA (radio immunoassays) dans lesquels l'anticorps est marqué par un radioélément et dont le dosage mesure un nombre de désintégrations par secondes.

L'ELISA est une technique biochimique utilisant un ou deux anticorps. L'un de ceux-ci est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire, responsable du nom de la technique, peut aussi causer l'émission d'un signal par un substrat chromogène ou fluorogène.

L'ELISA pouvant être utilisée tant pour évaluer la présence d'un antigène que celle d'un anticorps dans un échantillon, c'est un outil efficace à la fois pour déterminer des concentrations sériques d'anticorps (comme pour le test HIV ou le virus du Nil), que pour détecter la présence d'un antigène. Il a également trouvé des applications dans l'industrie alimentaire, pour détecter des allergènes alimentaires, comme le lait, les cacahuètes, les noix et les œufs. C'est un test simple, facile d'emploi et peu coûteux. Il est limité par la disponibilité en anticorps spécifique.

ELISA indirecte

Les étapes de l'ELISA dite indirecte, la plus couramment utilisée, pour déterminer la concentration en anticorps du sérum sont :

- l'application d'un échantillon d'un antigène connu sur une surface, le plus souvent celle d'un puits d'une plaque de microtitration. L'antigène est fixé à la surface, de façon à le rendre immobile.
- le recouvrement des puits (ou toute autre surface) par les échantillons de sérum à tester (ou tout autre solution à tester), dont la concentration en anticorps est, par définition, inconnue, et habituellement diluée dans le sérum d'une autre espèce. L'utilisation de sérum non-humain empêche la liaison à l'antigène par des anticorps non-spécifiques contenus dans le sang du patient.
- le rinçage de la plaque, de façon à retirer les anticorps non-liés. Après rinçage, seuls les complexes antigène-anticorps demeurent attachés à la surface du puits.
- l'ajout aux puits des anticorps secondaires qui se lieront à l'anticorps primaire, (il s'agit dans ce cas d'une antiglobuline). Ces anticorps secondaires sont couplés à l'enzyme modificateur de substrat qui permet de suivre l'évolution de la réaction.
- le second rinçage de la plaque, de sorte à éliminer les anticorps non liés.
- l'application d'un substrat qui, s'il est converti par l'enzyme, émet un signal chromogénique ou fluorescent.
- la quantification du résultat, à la vue ou, le plus souvent, par spectrophotométrie ou tout autre appareil d'optique.

L'enzyme agit comme amplificateur : quand bien même peu d'anticorps conjugués à l'enzyme seraient attachés, l'enzyme catalyserait la formation de nombreux signaux, ce qui rend ce test très sensible, mais augmente également le nombre de faux positifs. Il faut donc, comme d'habitude, prévoir des puits «contrôle».

L'ELISA peut être réalisé à visée quantitative ou qualitative :

- un résultat qualitatif indiquera la présence ou l'absence d'un antigène dans l'échantillon. Les valeurs seuil sont déterminées par l'analyste et peuvent être basées sur la statistique. Deux ou trois écarts-types sont généralement utilisés pour distinguer l'échantillon positif du négatif.

- dans l'utilisation quantitative de l'ELISA, la densité optique ou les unités de fluorescence de l'échantillon sont interpolées sur une courbe d'étalonnage, en général une dilution sérielle de la cible.

On utilise l'ELISA direct pour le dosage de protéines variées. Quelques exemples tirés d'application en pharmacologie médicale : hormones thyroïdiennes, concentration en médicaments (pour évaluer l'observance et/ou adapter la posologie), etc. Dans le domaine de la recherche, les tests ne sont limités que par l'imagination du chercheur.

ELISA en sandwich

L'ELISA en sandwich est une variante moins commune (en clinique) de cette technique, utilisée afin de détecter un échantillon d'antigène dans le sérum ou tout autre échantillon. Cette technique est par contre d'un usage très courant en recherche.

Le procédé se déroule, dans ses grandes lignes, comme suit :

1. Une surface est préparée et une quantité connue d'anticorps dit *de capture* y est liée.
2. L'échantillon contenant l'antigène est appliqué à la plaque.
3. La plaque est rincée, de façon à éliminer l'antigène non-lié.
4. Les anticorps conjugués à l'enzyme sont ajoutés.
5. La plaque est rincée une deuxième fois.
6. Le substrat convertible par l'enzyme en signal fluorescent est ajouté.
7. Le résultat est analysé « à l'œil » ou dans un spectrophotomètre spécialement conçu pour accepter directement les plaques de 96 puits.

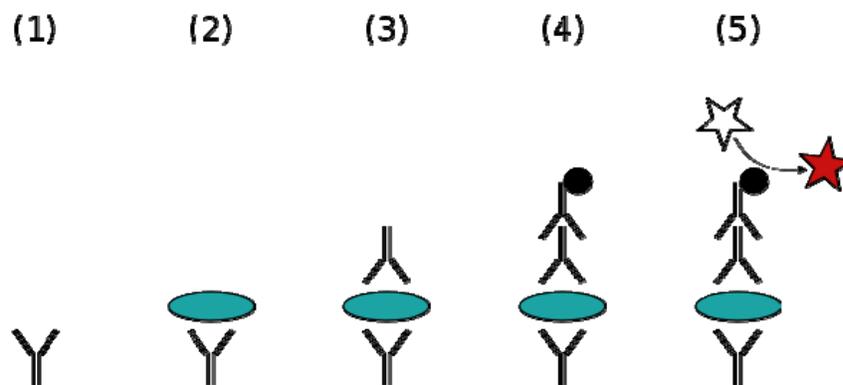


Figure. ELISA en sandwich.

- 1) La plaque est recouverte avec un anticorps de capture ;
- (2) l'échantillon est ajouté, et tout antigène présent se lie à l'anticorps de capture ;
- (3) l'anticorps de détection est ajouté, et se lie à l'antigène ;
- (4) L'anticorps secondaire lié à l'enzyme est ajouté, et se lie à l'anticorps de détection ;
- (5) Le substrat est ajouté et est converti par l'enzyme en une forme détectable (colorée ou fluorescente).

Toutefois, ainsi qu'illustré, il existe le plus souvent une étape supplémentaire, l'addition d'anticorps *de détection*, afin d'éviter de créer des anticorps conjugués à l'enzyme *pour chaque antigène*. L'utilisation d'une enzyme couplée reconnaissant la fraction Fc des autres anticorps permet de l'utiliser dans une variété de situations et de réduire le coût de la procédure.

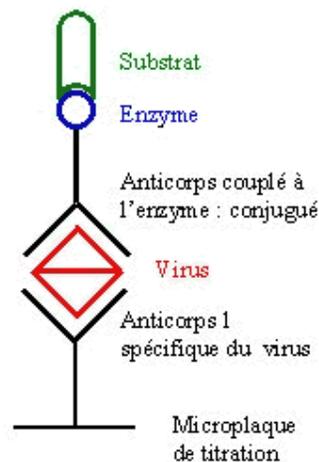
ELISA par compétition

Une troisième utilisation de l'ELISA se fait par compétition de liaison. Elle permet le dosage d'un antigène :

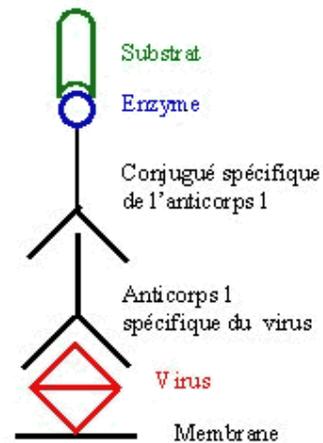
1. Une plaque est préparée sur laquelle sont fixés des anticorps (en défaut).
2. Un mélange d'antigènes marqués et des antigènes à doser (non marqués) est déposé sur la plaque.
3. La plaque est rincée, de sorte que les antigènes non liés aux anticorps sont éliminés.

La compétition joue donc entre les antigènes marqués (en quantité connue) et non marqués (en quantité à déterminer) pour leur liaison aux anticorps, qui sont en défaut. Ainsi plus les antigènes à doser sont nombreux, plus leur proportion parmi les antigènes retenus par les anticorps est grande, et plus le signal sera faible. Inversement, si la concentration initiale de l'antigène est faible, le signal sera fort.

TEST ELISA



TEST IMMUNO-EMPREINTE



Application des méthodes d'analyse immunologiques (RIA, ELISA):

- Analyse d'hormones, vitamines, métabolites, marqueurs diagnostiques : ACTH, FSH, T3, T4, glucagon, insuline, testostérone, vitamine B12, prostaglandines, glucocorticoïdes, etc.
- Suivi de la thérapie médicamenteuse: barbituriques, morphine, digoxine, etc.
- Procédures de diagnostic pour détecter les infections: VIH, hépatite A, B, C, etc.

Les investigations sur les glandes endocrines vise la présence de signes cliniques d'hyper- ou hypofonction de ces glandes.

Pour évaluer la fonction endocrine est effectué un ou plusieurs des déterminations suivantes:

- Le taux d'hormone de sérum;
- L'excrétion urinaire de l'hormone ou l'élimination des produits;
- La vitesse de sécrétion de l'hormone en circulation;
- La réserve d'hormone et la régulation hormonale, toutes les deux par essais dynamiques;
- Le taux de récepteurs hormonaux;
- Effets sélectifs de l'hormone sur les tissus cibles.

TP 9 MÉTHODES D'ANALYSE DES HORMONES

Détermination des taux plasmatiques d'hormones

Les niveaux plasmatiques d'hormones stéroïdiques se situent entre 1 nmole/l et 1 micromole/l, et les valeurs des hormones peptidiques et protéiques entre 1 pmole / l et 1 nmol / l. Ces concentrations sont très faibles et pour ceux peptidiques et protéiques pour leur détermination dans la «jungle» des protéines du sang nécessite l'utilisation de techniques sensibles et spécifiques pour la haute performance.

L'investigation biochimique du système endocrinien vise à:

- Pour les hormones avec un niveau plasmatique constant pendant la journée (la thyroxine et triiodothyronine), la détermination dans un échantillon isolé du sang fournit suffisamment de confiance.

- Pour les hormones avec une sécrétion pulsatile (LH, testostérone) sont nécessaires de nombreux échantillons prélevés à des moments aléatoires ou on fait une détermination le mélange du sang obtenu à partir de plusieurs échantillons prélevés à des intervalles de 20 à 30 minutes.

- Les hormones avec un rythme circadien (par exemple cortisol) l'interprétation des valeurs sont basées sur le moment où l'échantillon de sang a été prélevé. Pour les femmes, pendant la période de fertilité, les concentrations plasmatiques de gonadotrophines, la progestérone et l'estradiol seront interprétées selon les phases du cycle menstruel et les déterminations de plasma sont nécessaires sur plusieurs jours.

- Pour les hormones qui exigent un transporteur plasmatique (stéroïdes, H. de la thyroïde), les concentrations plasmatiques libres reflètent le mieux la fonction endocrinienne, mais généralement on détermine l'hormone plasmatique totale (libre et lié). Quand il y a des fluctuations de la protéine de transport, il y a la nécessité de déterminer le niveau de protéine porteuse et l'hormone totale.

- pour la population «saine», le taux plasmatiques des hormones est très large. Dans de telles situations, il est préférable de déterminer une paire d'hormones (testostérone et LH, la thyroxine et TSH). Par exemple, si la testostérone est à la limite inférieure de la normale et est accompagnée par une augmentation de LH il s'agit d'une insuffisance testiculaire; si LH est normal, la fonction testiculaire est considéré comme normal.

Mesure des niveaux urinaires des hormones et de leurs métabolites

Pour la sécrétion des hormones (par exemple la fluctuation cortisol) déterminations urinaires ont des avantages sur les échantillons de sang obtenus des valeurs isolées. Détermination est faite dans l'urine de 24 heures et la fonction de cortex surrénalien définit mieux que isolée valeur de cortisol plasmatique.

Les inconvénients de la détermination de l'urine est:

- L'excrétion urinaire de la fonction rénale dépend de la raison est appelée créatinine urinaire;

- Il y a des hormones qui sont éliminés dans la bile (T3, T4);

- Les valeurs urinaires peuvent être modifiés par les médicaments;

- Il ya hormones origines tissulaires différentes mais avec un métabolite urinaire commune (androgènes surrénales urinaires 17 cetosteroizii viennent et gonadique et donc établir leur niveau a peu de valeur dans l'évaluation de la production d'androgènes testiculaires).

La sécrétion d'hormone et des vitesses de production

Mesure de la sécrétion de vitesse actuelle à résoudre les problèmes qui se posent de déterminations du plasma et l'urine. Hormone radioactive est administrée, et la mesure de la dilution de l'hormone en raison de la présence de l'hormone endogène dans une certaine période de temps.

Déterminations évaluation de réserve dynamique et la régulation hormonale

Pour l'interprétation des valeurs limites sont des tests de suppression stimulation ou l'hormone hormonal.

La mesure des récepteurs hormonaux et des anticorps

La mesure de récepteur d'hormone est utile dans le diagnostic d'une maladie hormono-résistant (en raison de rachitisme résistant à la vitamine D, l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie associés à la résistance à l'insuline, les récepteurs des œstrogènes du sein).

Laboratoires spécialisés utilisant profonde qui est ensuite séquences pour fournir des informations spécifiques sur la structure des protéines mutantes.

Dans certaines situations, il peut mesurer les niveaux d'hormones d'anticorps (par exemple, des anticorps à l'hormone thyroïdienne qui provoque l'hypothyroïdie).

Effets de tissu

Test idéal est de mesurer l'effet de l'hormone sur le tissu cible.

Les méthodes modernes pour la détermination des hormones

Les méthodes pour déterminer l'hormone peuvent être classés comme: des méthodes biologiques, physico-chimique, les méthodes de détermination des méthodes compétitives de dosage immunométrique contraignantes.

Les méthodes biologiques et physico-chimiques sont de vieilles méthodes, laborieux et coûteux et ont été remplacés par des méthodes modernes.

Les méthodes modernes de détermination sont: méthodes basées sur le principe de la concurrence immunitaire (RIA, FIA, LIA, EIE) et des méthodes immunométriques (IRMA, IFMA, MLI, IEMA).

Application pratique

A. Investigation hormonale de la thyroïde

I. Rappels anatomopathologiques

La thyroïde est une glande endocrine située dans la région cervicale médiane basse, formée de deux lobes reliés par un isthme, pesant entre 15 et 30 g.

Elle est organisée en follicules d'un diamètre moyen de l'ordre de 200 micromètres (50 à 500). Les follicules sont formés par un épithélium simple de cellules folliculaires (thyrocytes) délimitant une cavité - l'espace folliculaire - contenant la substance colloïde. Les thyrocytes, responsables de la synthèse des hormones thyroïdiennes, représentent plus de 99 % des cellules de la glande.

Il s'agit de cellules bipolaires (pôle basal et pôle apical) à double fonctionnement : exocrine vers la cavité folliculaire et endocrine vers la circulation sanguine.

La thyroïde comporte par ailleurs des cellules claires ou para folliculaires responsables de la synthèse de thyrocalcitonine.

Structure des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes possèdent une même structure organique : la thyronine, formée par deux noyaux aromatiques reliés par un pont éther. Les hormones se différencient entre elles par le nombre et la place variables des atomes d'iode qu'elles portent.

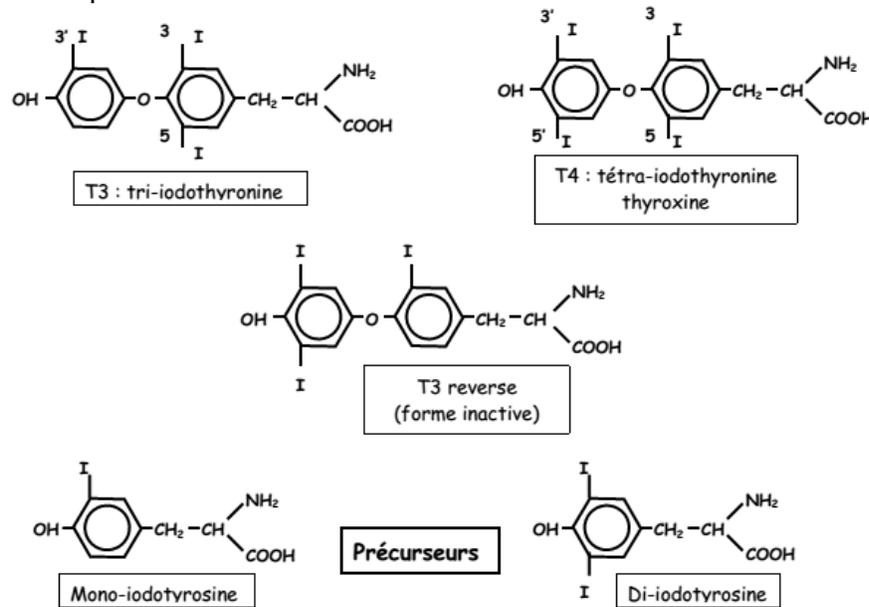


Figure 1 : structure des hormones thyroïdiennes et de leurs précurseurs

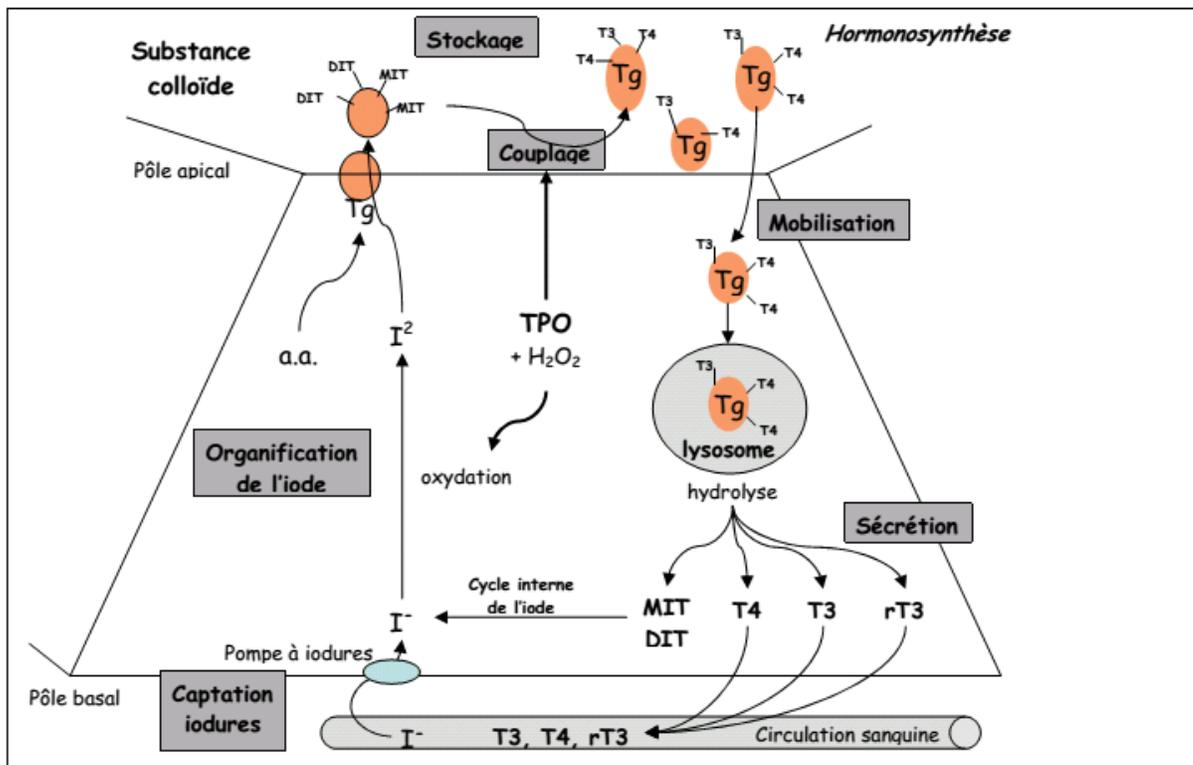


Figure 2 : les étapes de la synthèse hormonale thyroïdienne

L'iode est un oligo-élément relativement rare, dont les réserves sont faibles dans l'organisme (10 à 20 mg dans la thyroïde).

Les besoins varient selon l'âge : de l'ordre de 100 microgrammes par jour chez l'enfant, 100 à 150 µg /j chez l'adolescent et l'adulte et de 100 à 300 µg /j durant la grossesse et l'allaitement. Ils devraient être couverts par les apports alimentaires (poissons, crustacés, algues et sels iodés). Depuis 1952, le sel de cuisine est supplémenté en iode (10 à 20 mg par kilo) mais les sels industriels ne les ont pas. Plusieurs études montrent que les besoins sont insuffisamment couverts en particulier au cours de la grossesse ce qui justifie une supplémentation.

L'iode peut également être récupéré à partir des mécanismes de désiodation périphérique et intra-thyroïdienne (cycle interne de l'iode).

La première étape est donc celle de la capture d'iodures circulants à l'aide d'une pompe spécifique, selon un mécanisme actif, ATP-dépendant (avec co-transport sodique), saturable (étape limitante), et imparfaitement sélective (passage possible de perchlorate, de brome, de pertechnectate, qui marqué au technetium 99 est utilisé pour faire des scintigraphies thyroïdiennes....).

L'organification (oxydation) de l'iode nécessite la présence d'une enzyme spécifique liée à la membrane, la thyroperoxydase (TPO), dont l'activité optimale requiert la présence d'H₂O₂. L'iode ainsi oxydé peut se lier aux résidus tyrosyl de la thyroglobuline (Tg), volumineuse glycoprotéine (660 kD), donnant naissance aux précurseurs des hormones thyroïdiennes : mono-iodo-tyrosine (MIT) et des di-iodo-tyrosine (DIT). L'iodation de la Tg se fait au pôle apical, dans la substance colloïde.

La thyroperoxydase intervient également dans le couplage des précurseurs. La thyroglobuline porteuse d'hormones thyroïdiennes est alors stockée dans la cavité colloïde (réserves thyroïdiennes en hormones pour environ deux mois, permettant de pallier aux variations des apports), la récupération se faisant par pinocytose en fonction des besoins périphériques. La sécrétion des hormones thyroïdiennes se fait après hydrolyse lysosomiale.

III. Distribution et métabolisme des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes sont hydrophobes et se lient donc à des protéines de transport :

- non spécifique : albumine (pour une petite partie),
- spécifiques : TBG - Thyroxin Binding Globulin (pour environ 60 à 75 %) et TBPA – Thyroxin Binding PreAlbumin.

Il est important de rappeler que seule la fraction libre, même très minoritaire (0,01 à 0,03 % de la T4 et 0,1 à 0,4 % de la T3) est active.

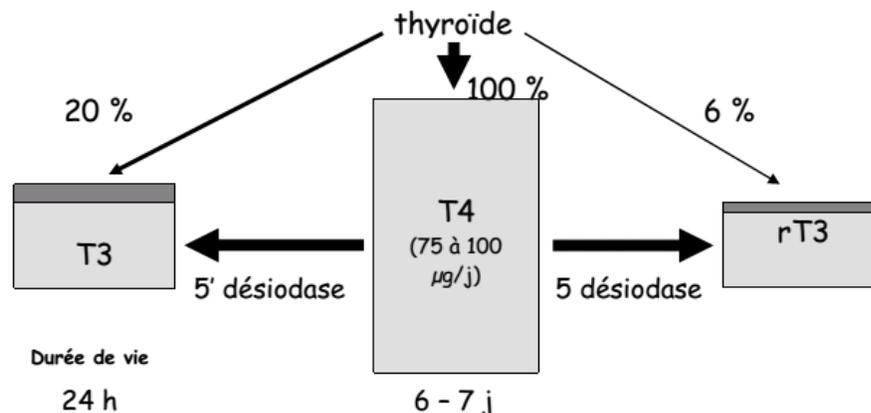


Figure 3 : origine et de durée de vie des hormones thyroïdiennes

La totalité de la T4 circulante provient de la production thyroïdienne, tandis que la plus grande partie de la T3 est issue de la conversion périphérique de T4 en T3 (figure 3).

La désiodation périphérique est le fait par des enzymes :

- la 5' désiodase qui permet la conversion de T4 en T3 et dont il existe plusieurs types. La 5' désiodase de type 1, retrouvée dans le foie, le rein, la thyroïde et de nombreux autres tissus périphériques, est fortement modulée par l'état nutritionnel.
- la 5' désiodase de type 2 est présente dans le système nerveux central, l'hypophyse et la thyroïde. Son activité est majorée en cas d'hypothyroïdie de façon à couvrir les besoins du nerveux central en hormones actives.
- la 5 désiodase transforme la T4 en T3 reverse, inactive.

La dégradation des HT se fait au niveau du foie et du rein par diverses voies : conjugaison (puis excrétion biliaire), désamination et décarboxylation de la chaîne latérale alanine, désiodation périphérique, ...

IV. Régulation de la fonction thyroïdienne

Le principal système de régulation est représenté par l'axe thyroïdienne. Il est complété par un système d'autorégulation thyroïdienne. Par ailleurs, le statut nutritionnel influence également la fonction thyroïdienne et en particulier le catabolisme des hormones.

L'axe thyroïdienne est résumé dans la figure 4. La TSH agit à différents niveaux :

- elle contrôle et stimule les différentes étapes de l'hormono-synthèse : capture de l'iode, iodation de la thyroglobuline, pinocytose, hydrolyse de la thyroglobuline et sécrétion hormonale ;
- elle entretient le phénotype des thyrocytes en régulant l'expression et la synthèse de thyroglobuline, des pompes à iodures et de la thyroperoxydase ;
- enfin, la TSH est un facteur de croissance pour la thyroïde.

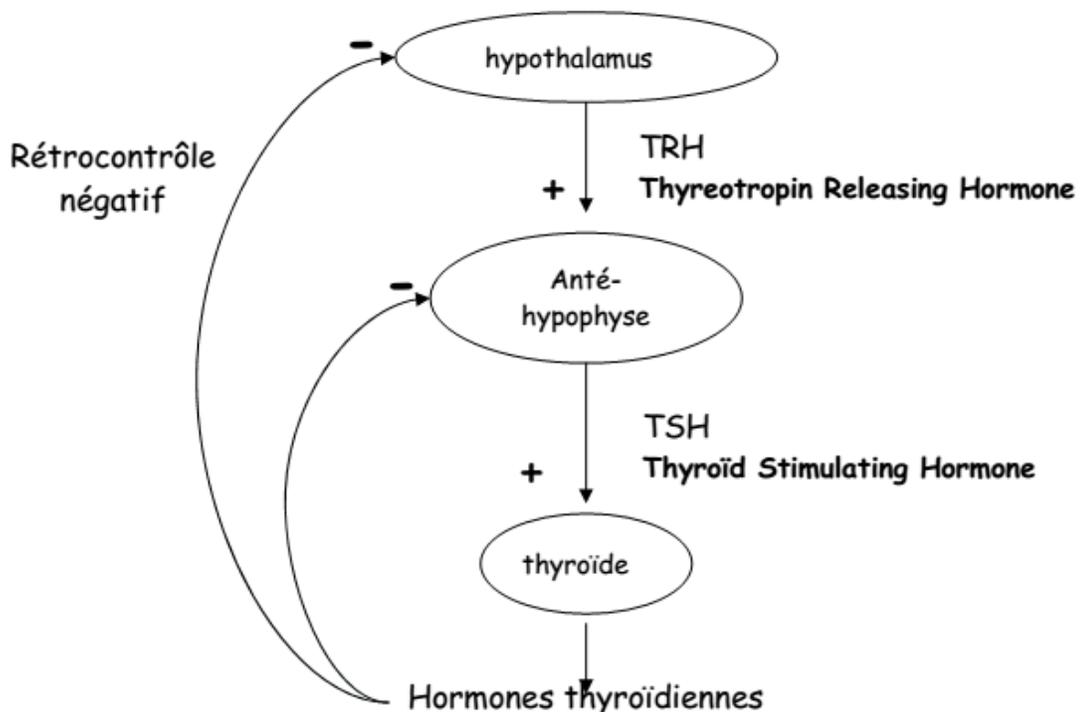


Figure 4 : L'axe thyroïdienne

L'autorégulation thyroïdienne correspond à des mécanismes transitoires permettant :

- un blocage de l'iodation et de la sécrétion en cas d'excès d'iode (effet Wolff-Chaikoff)
- une plus grande sensibilité des thyrocytes à l'action de la TSH en cas de carence en iode.
- Enfin, la captation d'iode est d'autant plus forte et plus prolongée que la glande est pauvre en iode et inversement

L'état nutritionnel conditionne le niveau de désiodation périphérique. En cas de jeûne, de dénutrition ou d'hypercatabolisme, la 5' désiodase est inhibée avec diminution des taux sanguins de T3 et augmentation de ceux de T3 reverse.

V. Mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes

Après passage transmembranaire, (et éventuellement conversion de T4 en T3), les hormones thyroïdiennes vont agir à différents niveaux :

- sites d'actions nucléaires

La T3 se lie à un récepteur cytosolique nucléotrope ; le complexe entre dans le noyau et participe à la régulation de l'expression génique ;

- sites d'actions extra nucléaires

La T3 exerce des actions membranaires avec un effet facilitateur du métabolisme cellulaire (potentialisation des récepteurs adrénergiques et des pompes ioniques, facilitation du passage de substrat énergétiques tels que le glucose et les acides aminés).

Elle exerce également des effets au niveau de la mitochondrie avec augmentation de la calorigénèse et de la VO₂.

VI. Effets biologiques des hormones thyroïdiennes

A. Effets sur la croissance et le développement

Les hormones thyroïdiennes sont indispensables à la croissance et au développement, en particulier pour le système nerveux central et pour l'os.

A.1. Croissance et développement du système nerveux central

Sur le système nerveux central, leur rôle est primordial en particulier durant les premiers mois de vie. Elle participe aux mécanismes de maturation et de mise en place des connexions neuronales ainsi qu'à la myélinisation. Une carence durant cette période s'accompagne d'un retard mental pouvant être sévère (crétinisme). L'excès d'hormones thyroïdiennes est également délétère, la différenciation étant accélérée au détriment de la prolifération neuronale.

Chez l'adulte, les hormones thyroïdiennes participent également au fonctionnement du système nerveux central, hypothyroïdie pouvant s'accompagner d'un ralentissement et de somnolence, l'hyperthyroïdie étant caractérisée par une excitabilité et une irritabilité.

A.2. Croissance et développement du squelette

Pendant la période fœtale, les hormones thyroïdiennes ne sont pas nécessaires à la croissance mais à la différenciation et à la maturation osseuse, leur absence s'accompagnant d'un retard d'apparition des centres d'ossification épiphysaires.

Durant la période postnatale, les HT deviennent indispensables à la croissance et continuent de contrôler la maturation et la différenciation osseuses. Elles agissent en synergie avec l'hormone de croissance (GH). Cette dernière

favorise la chondrogénèse et la croissance du cartilage, tandis que les hormones thyroïdiennes permettent la maturation et une ossification du cartilage. En outre, elles favorisent la sécrétion de GH et potentialise les effets de l'IGF-1.

L'hypothyroïdie durant l'enfance aboutit à un nanisme dysharmonieux.

Chez l'adulte, les hormones thyroïdiennes sont également impliquées dans les phénomènes d'ostéosynthèse et de résorption osseuse, l'hyperthyroïdie s'accompagnant d'un risque d'ostéoporose.

B. Effets métaboliques

B.1. Métabolisme basal

Les hormones thyroïdiennes augmentent la thermogénèse obligatoire et la VO_2 . Ainsi, l'hypothyroïdie peut s'accompagner de frilosité tandis que l'hyperthyroïdie est caractérisée par une thermophobie.

B.2. Métabolisme glucidique

Les hormones thyroïdiennes sont hyperglycémiantes (elles majorent l'absorption intestinale de glucides et favorisent la production étiatique de glucose).

B.3. Métabolisme lipidique

Les effets des hormones thyroïdiennes sur le métabolisme lipidique sont complexes avec une augmentation de la synthèse de cholestérol mais également de sa dégradation hépatique, une plus grande expression des récepteurs pour le LDL cholestérol, une augmentation de la lipogénèse et de l'oxydation des acides gras libres.

Au final, elles exercent un effet hypocholestérolémiant. Aussi, devant toute hypercholestérolémie, il convient de rechercher des signes d'hypothyroïdie.

VII. Bilan biologique et immunologique de la fonction thyroïdienne

Les dosages présentent actuellement de très bonnes sensibilités et spécificités. Malgré leur grande fiabilité, il existe toujours des causes d'interférences ou d'artéfacts. Il faut donc rester critique devant les résultats. Le dialogue clinicien laboratoire est essentiel.

1. La TSH

La thyrotropine (TSH) est produite par les cellules thyrotropes de l'antéhypophyse. Celles-ci sont extrêmement sensibles au rétrocontrôle par les hormones thyroïdiennes au point que les taux de TSH sont corrélés à ceux de T4 circulante selon une courbe exponentielle : une réduction de moitié de la T4 libre multiplie par 100 la concentration de TSH. Cette relation et ce phénomène d'amplification expliquent pourquoi, en situation d'équilibre, T4 libre et TSH représentent le même paramètre.

Leur dosage conjoint est donc ordinairement redondant. La TSH est beaucoup plus informative que la T4 libre.

Une imprégnation légèrement insuffisante par les hormones thyroïdiennes est déjà détectée par une augmentation de la TSH alors que la concentration de T4 libre se situe encore dans les limites de la normale (hypothyroïdie fruste ou « sub-clinique »).

La TSH constitue par conséquent le paramètre le plus précieux pour l'appréciation de la fonction thyroïdienne. C'est « le » paramètre à demander en première intention. Les valeurs de référence admises, en Europe, toutes techniques confondues, sont de 0,4 à 4 mUI/L.

2. Les hormones thyroïdiennes : T3 et T4 totales, T3 et T4 libres

La thyroxine (T4) est produite en totalité par la glande thyroïde. Sa concentration est un excellent reflet de la production thyroïdienne. La T4 circule, dans le sang, sous formes libre (0,02 %) et liée aux protéines vectrices (albumine, transthyrétine et TBG).

La triiodothyronine (T3) est l'hormone la plus active. T3 et T3 libres sont le reflet de la production périphérique et leur valeur diagnostique dans l'évaluation de la fonction thyroïdienne est limitée.

Les dosages des formes libres ont supplanté ceux des formes totales. Ces dosages actuellement automatisés peuvent présenter des problèmes méthodologiques dans certaines situations cliniques particulières comme la grossesse et l'insuffisance rénale.

LE SEUL DOSAGE DE TSH EST SUFFISANT

- Pour affirmer l'euthyroïdie en présence d'un goitre simple, d'un nodule thyroïdien isolé,
- Pour adapter le traitement par la LT4 des hypothyroïdies d'origine primitivement thyroïdienne,
- Pour dépister les dysfonctions thyroïdiennes chez le nouveau-né, lors de la prise de certaines médications (amiodarone, carbonate de lithium, interféron, anti-angiogénique tous les 6 mois), après irathérapie (tous les ans), chez les sujets porteurs d'anticorps antithyroïdiens.
- Les recommandations américaines proposent un dosage de TSH tous les 5 ans à partir de 35 ans et plus fréquemment chez les sujets à risque de dysfonction thyroïdienne.

LES ANTICORPS ANTITHYROÏDIENS

Les anticorps antithyroperoxydase (Ac anti TPO):

Ce sont des IgG dont les taux sont corrélés à l'abondance de l'infiltrat lymphocytaire thyroïdien. Les dosages sont actuellement très sensibles et spécifiques. La concordance entre les trousse est bonne (>90 %) bien que des problèmes de standardisation persistent. La prévalence des Ac anti TPO, dans la population générale sans dysfonction thyroïdienne, est de 12 %.

Les anticorps antithyroglobuline (Ac anti Tg) :

L'immunisation se fait conjointement contre la TPO et la Tg. les Ac anti TPO apparaissent plus vite et/ou sont mieux détectés que les Ac anti Tg. Donc, dans l'évaluation de l'auto-immunité thyroïdienne, la recherche des Ac anti Tg ne doit pas être systématique en première intention. Elle ne sera réalisée qu'en cas de forte suspicion clinique et/ou échographique et devant une recherche d'Ac anti TPO négative. Seuls 3 % de la population présentent des Ac anti Tg sans anti TPO détectables (étude américaine NHANES III).

Les anticorps anti-récepteur de la TSH (Ac anti RTSH) :

Ils se lient aux récepteurs de la TSH. La majorité de ces anticorps se comportent comme des Ac stimulants et constituent un marqueur diagnostique et pronostique de la maladie de Basedow. Exceptionnellement, ils ont une activité bloquante responsable d'hypothyroïdie avec hypotrophie de la glande. Jusqu'ici détectés par des techniques d'inhibition de liaison de la TSH radiomarquée à des récepteurs humains ou porcins, de nouvelles méthodes automatisées ou non, avec utilisation d'Ac monoclonal hautement spécifique sont apparues. L'évaluation clinique de ces réactifs est bonne mais la stabilité parfois insuffisante.

INTERÊT CLINIQUE DES DOSAGES D'ANTICORPS ANTITHYROÏDIENS

Ac anti TPO :

- Place dans la décision thérapeutique limitée,
- Prédicatifs de dysfonctions thyroïdiennes lors de grossesse et de prise de certaines médicaments (amiodarone, lithium, interleukines, anti-angiogéniques)

Ac anti Tg :

- Validation des dosages de thyroglobuline,
- Suivi des patients avec cancers différenciés thyroïdiens (ATg+),
- Recherche d'une auto-immunité thyroïdienne si Ac anti TPO négatifs et forte suspicion clinique et/ou échographique,

Ac anti RTSH :

- Diagnostic étiologique d'une hyperthyroïdie,
- Évaluation de la rémission avant arrêt du traitement médical des maladies de Basedow,
- Orbitopathie basedowienne,
- Grossesse et maladie de Basedow : prédiction de dysfonction néonatale.

Exploration et surveillance des maladies thyroïdiennes

	Exploration initiale	Enquête étiologique	Suivi
Goitre simple	TSH	-	-
Nodule isolé	TSH, (CT*)	-	-
Hypothyroïdies	TSH, (T4L)	Ac anti TPO, (iodurie)	TSH
Hyperthyroïdies	TSH, (T3 T4 libres)	Ac anti TPO, Ac anti RTSH, (iodurie, Tg, HCG)	T4L, TSH, Ac anti RTSH
Thyroïdites	TSH, VS, CRP	Ac anti TPO, (sérodiagnostics viraux)	TSH, CRP
Cancers différenciés de la thyroïde	TSH	-	TSH, Ac anti Tg, Tg
Cancer médullaire	TSH, CT	-	TSH, CT, ACE

*CT : calcitonine

TP 10 L'examen biochimique d'urine. Examen sommaire d'urine

L'urine est un liquide biologique, produit d'excrétion rénale, avec une composition complexe: eau, substances organiques, substances minérales.

L'examen d'urine:

- **examen complet** contient des déterminations physiques, biochimiques, bactériologiques et est fait sur l'urine de 24 heures ou sur échantillons d'urine prélevés stérilement.
- **examen sommaire** contient un examen biochimique et un examen microscopique sur le sédiment urinaire. **L'examen biochimique** contient un examen physique et un examen chimique.

1. Examen biochimique de l'urine. Tests rapides

A. Analyses qualitatives

L'analyse d'urines est très importante ; elle est souvent réalisée, tout du moins en partie, dans le cabinet du médecin ou de l'infirmière à l'hôpital, ou encore dans des centres médicaux (PMI, centre de dépistage, médecine du travail...). Cette analyse se fait au moyen de bandelettes réactives à usage unique et disponibles dans le commerce, la plus connue (et complète) étant le Multistix®.

L'urine fraîche est recueillie dans un récipient sec et propre; la bandelette est trempée brièvement dans l'urine en veillant à ce que toutes les zones imbibées de réactifs soient immergées ; la bandelette est retirée en prenant soin d'éliminer l'excès d'urine en la pressant contre le bord du récipient ; elle est ensuite maintenue à l'horizontal pendant 1 ou 2 minutes (selon la bandelette), puis on compare la coloration des zones réactives à celle de la palette fournie avec les bandelettes. Toutes les bandelettes sont sensibles au glucose, aux protéines et à l'hémoglobine (sang). Certaines, en plus, sont sensibles à la bilirubine, à l'urobilinogène, aux corps cétoniques, aux nitrites, à la myoglobine, aux leucocytes, ou encore permettent une mesure du pH et de la densité urinaires. La zone imbibée de réactif change de couleur si le composant est présent dans l'urine; l'intensité de cette couleur est proportionnelle à la concentration du composant (mesure semi-quantitative exprimée en nombre de croix).

1. Glucose

L'urine normale ne contient pas de glucose et elle est insipide (non sucrée) ; la présence de glucose indique que la charge de glucose filtrée dépasse la capacité de réabsorption des tubules rénaux. Cette **glycosurie** est le plus souvent pathologique puisqu'elle reflète une hyperglycémie (« diabète sucré » ou « diabète mellitus », patient diabétique avec des urines sucrées).

Cette recherche à la bandelette est le test de dépistage du diabète le plus simple et le plus répandu bien qu'il ne soit pas sensible, en effet la glycémie doit être supérieure à 8 mmol/L (144 mg/dL) pour dépasser le seuil de réabsorption rénale du glucose. Elle n'est pas spécifique, car en cas d'abaissement du seuil rénal de réabsorption du glucose, une glycosurie apparaît même pour des glycémies normales (moins de 6 mmol/L = 108 mg/dL) ; c'est le cas au cours de la grossesse et dans les glycosuries rénales congénitales qui sont relativement fréquentes et bénignes (« diabète rénal », les urines ont un goût sucré mais le patient n'est pas malade).

Par ailleurs, une glycosurie postprandiale peut survenir suite à l'élévation temporaire de la glycémie; c'est une glycosurie alimentaire qui n'a rien à voir avec le diabète.

Le plus souvent, on confirme la glycosurie pathologique, liée au diabète, par un dosage quantitatif au laboratoire, où elle peut dépasser 20 mmoles (3,6 g)/24 h.

2. Protéines

L'urine normale contient très peu de protéines, moins de 50 mg/24 h. Une augmentation de la **protéinurie** peut traduire une excrétion anormale de protéines par le rein, par l'appareil urinaire (en cas d'infection essentiellement) ou tout simplement peut refléter la présence de sang dans les urines, c'est pourquoi on associe toujours les recherches de protéines et de sang. Même si elle est bien d'origine rénale, la protéinurie peut être due à une atteinte glomérulaire ou tubulaire ; elle devra être étudiée plus précisément, et en particulier après séparation par électrophorèse ou par le dosage de protéines ou d'enzymes tubulaires.

Le plus souvent, on confirme la protéinurie par un dosage quantitatif au laboratoire ; la protéinurie pathologique peut dépasser 40 g/24 h.

3. Bilirubine et urobilinogène

La bilirubine provient du catabolisme de l'hème (protoporphyrine IX) de l'hémoglobine. Dans le plasma sanguin, elle existe sous une forme conjuguée (à l'acide glucuronique, réaction effectuée dans les cellules hépatiques) et une forme non conjuguée. Cette dernière, peu soluble, est liée à l'albumine; ainsi, seule la forme conjuguée hydrosoluble peut passer le filtre glomérulaire et se retrouver dans les urines.

Cette **bilirubinurie** est toujours pathologique; en effet la bilirubine conjuguée est normalement excrétée par l'arbre biliaire dans l'intestin, où elle est dégradée par les bactéries en urobilinogène et stercobilinogène. Un peu de bilirubine et quasiment tout le urobilinogène sont réabsorbés dans la circulation porte ; ils sont captés par le foie et ré-excrétés dans la bile, commençant un cycle entéro-hépatique. La plus grande partie de l'urobilinogène est éliminée dans les selles (urobilinogène fécal), mais on en retrouve dans la circulation sanguine et normalement dans les urines. Une obstruction sur l'arbre biliaire interrompt ce cycle entéro-hépatique se traduisant par une augmentation de la bilirubine dans le plasma, qui devient ictérique, et dont une partie se déverse dans les urines.

Une quantité augmentée d'urobilinogène peut aussi se retrouver dans les urines. Ces augmentations urinaires ne sont pas spécifiques d'une atteinte hépatique, car on les retrouve aussi dans l'hémolyse à cause d'une libération massive d'hémoglobine qui va être dégradée en ces produits. Par ailleurs, ces augmentations ne signifient pas une anomalie rénale.

4. Corps cétoniques

Les corps cétoniques (β -hydroxy-butyrate et acéto-acétate essentiellement) sont les produits de la dégradation des acides gras; leur augmentation dans le plasma indique généralement que l'organisme utilise les graisses (triacylglycérols) pour se procurer de l'énergie plutôt que de les stocker, comme dans une période de jeûne prolongée, ou quand le foie n'est plus capable d'utiliser les sucres (« crise de foie » après alcoolisation par exemple). C'est aussi le cas dans le diabète mal contrôlé, et en particulier dans le diabète de type I, dit insulino-dépendant, par défaut d'utilisation du glucose (acidocétose du diabétique). Les corps cétoniques augmentent dans le sang (cétonémie) et les urines (**cétonurie**).

La recherche de corps cétoniques dans les urines est un test de dépistage du diabète, conjointement avec la recherche de glucose. Si la glycosurie peut augmenter dans le diabète rénal, les corps cétoniques sanguins et urinaires ne le sont pas.

Interprétation:

- Bien que le diabète sucré soit la cause la plus fréquente de *glycosurie*, celle-ci est également mise en évidence chez les patients présentant un abaissement du seuil rénal du glucose. Il peut s'agir d'une anomalie isolée et bénigne (glycosurie rénale), d'un état transitoire au cours de la grossesse, ou d'un signe clinique de pathologie congénitale ou acquise de la fonction tubulaire proximale rénale.
- L'existence d'une *cétonurie* associée à une *glycosurie* importante traduit une carence aiguë en insuline et nécessite un traitement d'urgence.
- La présence d'une *cétonurie* sans glycosurie est le témoin d'une cétose de jeûne (régime hypocalorique, hypoglycémique, vomissements répétés).
- Chez le diabétique traité par insuline, il faut toujours interpréter la présence de corps cétoniques en fonction de la glycémie et de la glycosurie.

5. pH et densité urinaires

L'urine est normalement acide (pH = 5-6) montrant une forte concentration en ions hydrogène (rappel : $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$). On mesure le pH urinaire devant une acidose métabolique inexpliquée (ATR possible) ou si l'on suspecte la prise de drogues acidifiantes.

La mesure de la densité n'est qu'un reflet de la concentration des urines ; si la densité augmente, c'est que les urines sont concentrées (valeurs normales : 1,015 – 1,025 g/ml). Cette mesure semi-quantitative confirme en général l'examen visuel de la couleur des urines, couleur foncée si les urines sont concentrées. Là encore, ce n'est qu'un test de dépistage ; il faudra mieux évaluer la capacité du rein à concentrer les urines par la mesure de l'osmolalité urinaire, voire par la détermination de la clairance osmolaire ou celle de l'eau libre (test de restriction hydrique, test au DDAVP - essai pour l'estimation de la capacité de concentration rénale chez les nourrissons et les enfants - test for estimation of renal concentrating capacity in infants and children).

6. Sang dans les urines

La présence de sang dans les urines (**hématurie**) peut être due à de nombreuses causes, dont la contamination par les règles, une infection des voies urinaires, ou encore une tumeur sur le tractus urinaire (rein, vessie, prostate...). Les bandelettes réactives détectent l'hémoglobine et la myoglobine ; si on ne retrouve pas d'hématies dans le culot de sédimentation (ou mieux de centrifugation), il s'agira plutôt d'une **hémoglobinurie** ou d'une **myoglobinurie**.

Ce sont des protéinuries pré-rénales car elles correspondent à l'apparition d'hémoglobine dans le plasma (hémoglobinémie des hémolyses intravasculaires par exemple) ou de myoglobine (myoglobinémie des atteintes musculaires), ces deux protéines passant librement le filtre glomérulaire. En revanche, si des hématies apparaissent dans l'urine, et si on a exclu les causes de contamination par des saignements dans l'arbre uréthro-vésical, on a le signe d'une atteinte rénale avec altération des glomérules rénaux.

Cette hématurie pathologique est microscopique si on ne la voit pas à l'œil nu, ou macroscopique si elle colore les urines ; elle est alors plus grave et on a intérêt à compter les hématies urinaires (hématurie quantitative ou compte d'Addis). Le plus

souvent, on compte aussi les leucocytes ; c'est l'examen cytologique des urines. Il est accompagné d'un examen bactériologique avec examen direct et mise en culture des urines (examen cyto-bactériologique des urines, ou ECBU) et éventuellement réalisation d'un antibiogramme. Il faudra alors faire attention au recueil des urines qui doit être réalisé dans les plus strictes conditions d'asepsie.

7. Nitrites et leucocytes

La présence de leucocytes (globules blancs) dans les urines suggère une infection des voies urinaires, souvent accompagnée d'un syndrome inflammatoire.

De même, la réduction des nitrates alimentaires (présents dans l'urine) en nitrites suggère la présence dans l'urine de bactéries contenant une nitrate-réductase. Ces positivités incitent à demander rapidement un ECBU (examen cyto-bactériologique d'urine).

8. Etude du sédiment urinaire et des cristaux rénaux

L'examen du culot urinaire au microscope (systématique lors d'un ECBU) montre habituellement des cylindres, des rouleaux et des cristaux ; les derniers sont le plus souvent d'origine minérale, les autres sont d'origine protéique (moulages des tubules rénaux). On y trouve aussi des cellules de l'arbre uréthro-vésical en renouvellement. Tout ceci peut paraître normal ou au contraire déceler des cristaux rénaux pathologiques ou de suspecter la présence de cellules cancéreuses, de levures, de bactéries... L'analyse des cristaux rénaux (responsables de lithiases rénales ou non) sera envisagée précisément dans un prochain dossier scientifique consacré au rein.

B. Analyses quantitatives

1. Ionogramme urinaire

Le dosage des ions urinaires participe de deux façons à l'exploration rénale, d'une part par leurs valeurs cumulées ils représentent partiellement l'osmolalité urinaire ($\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Cl}^-$), et d'autre part par leurs valeurs relatives, en établissant le rapport Na^+/K^+ urinaire, ils montrent l'efficacité de l'aldostérone sur la réabsorption du Na^+ .

Les valeurs normales vont de 80 à 150 mmoles/24 h pour la **natriurie** (Na^+ urinaire) et 40 à 80 mmoles/24 h pour la **kaliurie** (K^+ urinaire), avec un rapport Na^+/K^+ compris entre 1,8 et 2,2. La natriurèse de 24 h renseigne sur la quantité de sel consommée dans la journée ; par exemple, 10 g de sel consommé par jour donnera 170 mmoles de sodium dans les urines de 24 h.

Les ions chlorures (Cl^- urinaire) accompagnent essentiellement les ions Na^+ (NaCl); les valeurs normales de la **chlorurie** sont comprises entre 100 et 200 mmoles/24 h. Si le sodium urinaire est très haut avec un volume de diurèse faible, le rein concentre l'urine (l'osmolalité est élevée) par défaut d'élimination d'eau ; cette situation est fréquente dans l'insuffisance rénale fonctionnelle (syndrome oligo-anurique) généralement accompagnée d'un rapport Na^+/K^+ inférieur à 1 montrant l'hyper-aldostéronisme secondaire. Il permet d'éliminer une partie du potassium qui s'accumule dans le sang (hyperkaliémie de l'insuffisance rénale). L'hyper-hydratation globale avec anurie est caractéristique de l'insuffisance rénale aiguë qui doit être traitée d'urgence par épuration extrarénale.

À l'inverse, dans l'insuffisance chronique (en particulier au stade IV), le rein a perdu sa capacité à réguler le bilan de l'eau et des sels. La diurèse est généralement conservée avec une fuite hydro-sodée venant diluer les urines ; on peut retrouver

une polyurie avec miction nocturne (nycturie) ; la déshydratation d'abord intracellulaire devient globale. Le sodium urinaire est normal ou augmenté avec un rapport Na^+/K^+ très au-dessus de 2 ; le sodium plasmatique peut être diminué (hyponatrémie).

L'hypokaliurie est de mise signant l'hypo-aldostéronisme ; les ions Cl^- suivent le sodium, sauf dans certaines acidoses tubulaires avec diminution d'excrétion de ces ions. Dans la plupart des maladies rénales chroniques (glomérulopathies dont celle liée au diabète, néphropathies vasculaires...), il faut limiter les apports en sel alimentaire (moins de 6 g par jour en cas d'hypertension artérielle). À l'inverse, dans certaines néphropathies comme la polykystose et les néphropathies tubulo-interstitielles, il faut maintenir des apports sodés suffisants [1, 2].

2. Azoturie

Elle représente l'ensemble des composés azotés retrouvés dans l'urine, donc de l'urée, de la créatinine, de l'acide urique, des acides aminés et des polypeptides/protéines.

Normalement, les *acides aminés* sont réabsorbés par les tubules proximaux par des transporteurs spécifiques. Leur présence dans l'urine signifie soit un défaut de réabsorption par dépassement de la capacité tubulaire globale dans les lésions tubulaires acquises, soit un déficit sur une voie spécifique comme dans la cystinurie congénitale.

De nombreuses *protéines* peuvent maintenant être dosées dans les urines (albumine, cystatine C et NGAL urinaires, KIM-1...) ; ce sont des bio-marqueurs de dysfonction rénale permettant le dépistage et le suivi de la maladie rénale dès le premier stade d'IR.

Ces anomalies quantitatives témoignent soit d'une atteinte glomérulaire soit d'une atteinte tubulaire. Ces marqueurs protéiques ont également été identifiés comme bio-marqueurs de l'IR aiguë.

Partie pratique

Test rapide par bandelette réactive urinaire

Le test se compose d'une bandelette présentant des zones réactives de chimie sèche permettant de rechercher dans l'urine la présence qualitative et/ou semi-quantitative de différents paramètres tels que les leucocytes, les nitrites, le pH, les protéines, le glucose, les corps cétoniques, l'urobilinogène, la bilirubine, les érythrocytes (ou le sang) et le poids spécifique (densité).

1. Préparation

a) Echantillon d'urine

- toilette génitale
- récolte au milieu du jet dans un récipient propre (aucune trace de détergent) et identifié au nom du patient
- pas de centrifugation
- après la miction, traiter l'urine au plus vite (dans les 2 heures)
- si conservation au frigo, attendre la remise à température ambiante (~ 30 minutes)

b) Bandelettes

- ne jamais réutiliser ou couper les bandelettes
- ne pas utiliser de bandelettes périmées (la date de péremption est indiquée sur l'emballage)

c) Emballage des bandelettes

- conservation au sec (< 30°C) et dans l'emballage d'origine (température de stockage, voir emballage)
- immédiatement après usage, refermer avec le bouchon pour protéger de l'humidité et de la lumière

2. Analyse

- Homogénéiser (mélanger) correctement l'urine en tournant lentement, à plusieurs reprises, le gobelet.
- Immerger la bandelette 1 seconde (au maximum) dans l'urine en humectant entièrement toutes les zones réactives. Ne jamais verser l'urine avec une pipette sur la bandelette.
- Egoutter rapidement en passant la tranche de la bandelette sur un papier absorbant afin de supprimer l'excédent d'urine.
- Enclencher le chronomètre.

3. Lecture et interprétation

Bandelette, avant utilisation



La lecture peut se faire visuellement en comparant la bandelette avec la gamme colorimétrique indiquée sur l'emballage ou à l'aide d'un instrument spécifique.

- Après 1 minute, lire les résultats pour les nitrites, le pH, les protéines, le glucose, les corps cétoniques, l'urobilinogène, la bilirubine et le sang.
- Après 2 minutes, lire le résultat pour les leucocytes.

Noter les résultats avec les unités correspondantes sur le rapport d'analyse.

L'interprétation des réactions chimiques est très sensible et peut engendrer des «faux positifs».

En particulier des médicaments, un apport alimentaire important en nitrites ou fortement coloré (betterave rouge), des quantités importantes de vitamine C et des traces d'antiseptiques ou de chloréxidine peuvent engendrer des résultats faussement positifs.

Bandelette, exemple de résultats



4. Erreurs à éviter : inversion d'échantillons de patients, analyse d'urines non fraîches, récipient sale, mauvaise homogénéisation de l'échantillon, bandelettes périmées, lecture avec un mauvais éclairage, temps de lecture non respecté, Erreur de transcription

5. Interprétation des résultats

2300 AG16515B 10/01 EXP: 2008-04 LOT: 6K05C
Manufactured in UK



Multistix® 10 SG
Reagent Strips
for Urinalysis

Glucose
Bilirubin
Ketone (Acetoacetic Acid)
Specific Gravity
Blood
pH
Protein
Urobilinogen
Nitrite
Leucocytes

Article No.: 3787816
For *In Vitro* Diagnostic Use

100 Strips

TESTS AND READING TIME. READ PRODUCT INSERT BEFORE USE.

TEST	READING TIME	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000
LEUCOCYTES	2 minutes	NEG.	1-5	6-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100	101-150	151-200	201-250	251-300	301-350	351-400	401-450	451-500	501-550	551-600	601-650	651-700	701-750	751-800	801-850	851-900	901-950	951-1000	1001-1500	1501-2000	2001-2500	2501-3000	3001-3500	3501-4000	4001-4500	4501-5000	5001-5500	5501-6000	6001-6500	6501-7000	7001-7500	7501-8000	8001-8500	8501-9000	9001-9500	9501-10000	10001-15000	15001-20000	20001-25000	25001-30000	30001-35000	35001-40000	40001-45000	45001-50000	50001-55000	55001-60000	60001-65000	65001-70000	70001-75000	75001-80000	80001-85000	85001-90000	90001-95000	95001-100000	100001-150000	150001-200000	200001-250000	250001-300000	300001-350000	350001-400000	400001-450000	450001-500000	500001-550000	550001-600000	600001-650000	650001-700000	700001-750000	750001-800000	800001-850000	850001-900000	900001-950000	950001-1000000	1000001-1500000	1500001-2000000	2000001-2500000	2500001-3000000	3000001-3500000	3500001-4000000	4000001-4500000	4500001-5000000	5000001-5500000	5500001-6000000	6000001-6500000	6500001-7000000	7000001-7500000	7500001-8000000	8000001-8500000	8500001-9000000	9000001-9500000	9500001-10000000	10000001-15000000	15000001-20000000	20000001-25000000	25000001-30000000	30000001-35000000	35000001-40000000	40000001-45000000	45000001-50000000	50000001-55000000	55000001-60000000	60000001-65000000	65000001-70000000	70000001-75000000	75000001-80000000	80000001-85000000	85000001-90000000	90000001-95000000	95000001-100000000	100000001-150000000	150000001-200000000	200000001-250000000	250000001-300000000	300000001-350000000	350000001-400000000	400000001-450000000	450000001-500000000	500000001-550000000	550000001-600000000	600000001-650000000	650000001-700000000	700000001-750000000	750000001-800000000	800000001-850000000	850000001-900000000	900000001-950000000	950000001-1000000000	1000000001-1500000000	1500000001-2000000000	2000000001-2500000000	2500000001-3000000000	3000000001-3500000000	3500000001-4000000000	4000000001-4500000000	4500000001-5000000000	5000000001-5500000000	5500000001-6000000000	6000000001-6500000000	6500000001-7000000000	7000000001-7500000000	7500000001-8000000000	8000000001-8500000000	8500000001-9000000000	9000000001-9500000000	9500000001-10000000000	10000000001-15000000000	15000000001-20000000000	20																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										

PARAMETRE	PRINCIPE DE LA METHODE	VALEUR SEUIL	PATHOLOGIE
Leucocytes	Mise en évidence de l'activité des estérases dans les leucocytes granulaires	10 leucocytes / μ L	Infections
Nitrites	Mise en évidence des nitrites obtenus par l'activité des nitrate-réductases de certains germes	0,3 mg/L (7 μ mol/L)	Infections à Entérobactéries
pH	Mise en évidence du pH par la présence de plusieurs indicateurs chromogènes	5,0	Calculs rénaux
Protéines	Mise en évidence de l'albumine grâce au virage de couleur d'un indicateur de pH	60 mg/L (albumine)	Dysfonctionnement rénal
Glucose	Mise en évidence du glucose par la méthode glucose-oxydase / peroxydase	0,4 g/L (2,2 mmol/L)	Diabète
Corps cétoniques	Mise en évidence des corps cétoniques (acide acétylacétique et acétone) par le principe de la réaction colorimétrique de Légal	0,05 g/L (0,5 mmol/L)	Diabète
Urobilinogène	Mise en évidence de l'urobilinogène grâce à un sel de diazonium qui forme un dérivé azoïque rouge	4 mg/L (7 μ mol/L)	Maladies du foie et des voies biliaires
Bilirubine	Mise en évidence de la bilirubine grâce à un sel de diazonium qui forme un dérivé azoïque coloré	84 mg/L (14 μ mol/L)	Maladies du foie et des voies biliaires
Sang (2 échelles : 1 pour érythrocytes, 1 pour hémoglobine)	Mise en évidence de l'hémoglobine et de la myoglobine par l'activité de la peroxydase et le virage d'un indicateur	érythrocytes > 5 Ery/ μ L hémoglobine, érythrocytes lysés, myoglobine > 10 Ery/ μ L	Calculs rénaux, tumeurs
Poids spécifique	Mesure de la densité par détection de la concentration des ions de l'urine	1,000 kg/L	Dysfonctionnement rénal

Testes classiques d'urine

L'examen physique

Le volume

Le volume d'urine produite en 24 heures = **diurèse**.

La diurèse normale:

- pour les hommes: 1200 – 1800 ml (1500 ml)
 - pour les femmes: 1000 – 1400 ml (1200 ml)
- $\frac{3}{4}$ de l'urine totale sont excrétées pendant le jour et seulement $\frac{1}{4}$ pendant la nuit.

La diurèse en clinostatisme est plus grande que dans orthostatisme.

En conditions physiologiques le volume urinaire/24 heures dépend de l'ingestion des liquides, alimentation et température, poids corporel, facteurs émotionnels. L'ingestion de café, thé et boissons alcooliques (bière) à un effet diurétique.

Variations pathologiques du volume urinaire:

- a. **Polyurie** = émission d'un volume urinaire plus grande que 2 litres/24 heures

- ❖ **Polyurie physiologique:** froid, émotions, ingestion exagérée des liquides.
 - ❖ **Polyurie pathologique:** diabète sucré, diabète insipide (déficiency d'hormone antidiurétique, ADH), glomérulonéphrites, administration des diurétiques.
- b. **Oligurie** = diminution de la quantité d'urine émise (moins d'un litre/24 heures)
- ❖ **Oligurie physiologique:** ingestion réduite des liquides, perte exagérée d'eau par transpiration
 - ❖ **Oligurie pathologique:** déshydratation due à vomissements, diarrhée et hémorragies, glomérulonéphrites chroniques, insuffisance rénale chronique, insuffisance cardiaque.
- c. **Anurie** = arrêt de la sécrétion urinaire (il y'a pourtant une émission très réduite d'urine – 150 ml/24 heures).
- L'anurie ce n'est pas un état physiologique (insuffisance rénale).

L'aspect d'urine

A l'émission l'urine normale est claire, transparente.

Couleur d'urine

- jaune
- Urine noire – dans alcaptonurie

Odeur – odeur d'amandes amères

Densité urinaire

Densité normale d'urine: 1,015 – 1,025 g/cm³ (**normostenurie**).

La détermination de la densité urinaire est fait avec l'urodensimètre.

Variations pathologiques:

- a. **Hipersthenurie:** d > 1,025 g/cm³ – diabète sucré, transpirations abondantes
- b. **Hypostenurie:** d < 1,015 g/cm³ – diabète insipide, ingestion exagéré d'eau
- c. **Isostenurie:** d = 1,002 g/cm³ – insuffisance rénale chronique

pH urinaire

Valeurs normaux: 5,8 – 7,4

L'urine normale à un pH un peu acide.

Pour une alimentation carnée l'urine est acide, pH = 5,2 – 5,3.

Pour une alimentation végétarienne l'urine est alcaline, pH = 7,0 – 7,4.

L'examen chimique

1. La détermination des protéines

L'urine normale contient une quantité très réduite de protéines qui ne peut pas être décelé par les réactions habituelles. La présence des protéines dans l'urine à une signification pathologique = **protéinurie**.

La réaction avec acide sulfosalicylique

Réactifs

Acide sulfosalicylique 20%

Mode opératoire

Dans un tube à essai mesurez 2 ml d'urine est ensuite ajouter 5 – 7 gouttes d'acide sulfosalicylique. Agitez et observez le contenu du tube sur un fond noir, vis-à-vis d'un autre tube avec d'urine sans acide sulfosalicylique.

Interprétation:

- a. L'urine reste claire – il n'y a pas des protéines dans l'urine – le résultat est négatif (-)
- b. L'urine montre:
 - une opalescence réduite => traces des protéines (\pm)
 - une opalescence évidente => résultat positif (+)
 - une opalescence intense (mais l'urine reste transparente) => Résultat positif (++)
 - précipité réduit => résultat intense positif (+++)
 - précipité granulaire => résultat intense positif (++++)

Certains médicaments qui sont excrétés dans l'urine peuvent donner avec l'acide sulfosalicylique une opalescence plus ou moins intense.

2. La détermination des glucides

On excrète normalement 350 – 500 mg glucose dans l'urine pendant 24 heures, mais a cette concentration le glucose ne peut pas être déterminé par les réactifs habituels.

A. La méthode Böttger – Nylander

Réactifs:

Réactif Nylander:

- | | |
|--|------------------|
| 1. Hydroxyde de sodium | 100 g |
| 2. Sel Seignette (tartrate de sodium et potassium) | 40 g |
| 3. Sous – nitrate de bismuth $\text{Bi}(\text{OH})_2\text{NO}_3$ | 20 g |
| 4. Eau distillée | jusqu'à 1000 ml. |

Mode opératoire

Dans un tube à essai introduisez 2 ml d'urine et ajoutez 0,2 ml réactif Nylander. Portez au bain – marie bouillant pendant 7 minutes.

En présence du glucose un précipité noir de bismuth métallique apparaît, libéré par la réduction.

Si la réaction est négative il n'y a pas des substances réductrices dans l'urine.

Si la réaction est positive il y a des substances réductrices dans l'urine, mais on doit faire une réaction avec un sel de cuivre (r. Bénédicte) pour la différenciation des glucides d'autres substances réductrices.

La réaction n'est pas spécifique seulement pour le pouvoir réducteur des glucides mais elle est positive aussi pour albumines, acide aminés avec du soufre (cystéine, cystine) quand on obtient du sulfure de bismuth qui à une couleur noire comme le bismuth métallique.

B. La méthode Bénédicte

Réactifs:

1. Réactif de Bénédicte:
 - citrate de sodium 173 g

Le reactif a une bonne conservation s'il est maintenu dans un flacon de verre brun, à l'obscurité.

2. Ammoniaque concentrée.

Mode opératoire

Dans un tube à essais introduisez 2 ml urine et 2 – 4 gouttes réactif Legal – Imbert et agitez bien. Sur la paroi du tube suintez quelques gouttes d'ammoniaque et laissez, sans agiter, au repos pour 15 minutes. Si il y a des corps cétoniques dans l'urine, un anneau violet va apparaître entre les deux phases (ammoniaque et urine).

L'urine normale ne donne pas une coloration violette.

4. Les pigments urinaires

Les pigments urinaires normaux sont : urobilinogène et urobiline.

La détermination d'urobilinogène urinaire avec le réactif d'Éhrlich

Dans l'urine normale il y'a d'urobilinogène en quantité très réduite mais décelable au chaud.

L'urobilinogène urinaire manque ou est augmenté dans des situations pathologiques.

Principe

En milieu acide, par une réaction de condensation, l'urobilinogène donne avec p-diméthyl-aminobenzaldéhyde un dérivé qui a une coloration rouge.

Réactifs

1. Réactif Ehrlich: 2 g p-diméthylaminobenzaldéhyde sont dissolu en 100 ml HCl 20%.

Mode opératoire

Dans un tube à essais introduisez 2 ml urine et 2 – 3 gouttes réactif Ehrlich. Si on n'obtient pas une coloration rouge immédiatement, réchauffez dans le bain d'eau bouillante ou sur la flamme.

Interprétation:

1. Urobilinogène normal: la coloration rouge apparaîtra seulement après réchauffement.
2. Urobilinogène augmenté: la coloration rouge apparaîtra sans réchauffement.
3. Urobilinogène absente: la coloration rouge n'apparaîtra pas.

La concentration d'urobilinogène - est augmenté dans:

- l'ictère hépato – cellulaire
- l'ictère hémolytique
- tumeurs malignes

L'urobilinogène manque dans les ictères mécaniques.

5. Pigments sanguins (l'hémoglobine libre et l'hémoglobine érythrocytaire)

La méthode Adler

Principe

L'hémoglobine décompose l'eau oxygénée (H_2O_2) avec la libération d'oxygène atomique, qui oxyde la benzidine à un dérivé quinoidynique qui, par condensation avec une autre molécule de benzidine, produit le bleu de benzidine.

Réactifs

1. Benzidine pure
2. Acide acétique glacial
3. Eau oxygénée 3g/100 ml (12 ml perhydrol/100 ml)

Mode opératoire

Dans un tube à essai introduisez quelques cristaux de benzidine et 5 – 10 gouttes d'acide acétique glacial. Agitez jusqu'à la dissolution complète de la benzidine. Ensuite ajoutez 1 – 2 ml urine et quelques gouttes d'eau oxygénée. Agitez bien.

En présence des pigments sanguins une coloration verte va apparaître qui ensuite tourne en bleu.

6. Les acides biliaires (sels biliaires)

Principe

La méthode la plus utilisée pour la détection des sels biliaires dans l'urine est basée sur la réaction de Hay. La présence de sels biliaires abaisse la tension superficielle de l'urine (ou plus exactement la tension interfaciale urine/soufre) et rend le soufre mouillable.

Mais cette méthode n'est pas spécifique: l'éther, l'alcool, le chloroforme, le thymol, différents pigments hématiques, les peptones et surtout les détergents tensioactifs peuvent donner de fausses réactions positives.

Réactifs

1. Fleur de soufre tamisée

Mode opératoire

Dans un flacon Erlenmeyer introduisez 10 – 15 ml d'urine. Faites tomber une pincée de fleur de soufre en surface. Donnez une ou deux légères secousses avec une baguette en verre. Après quelques minutes on peut observer la réaction.

Interprétation:

1. Si la fleur de soufre reste à la surface: absence certaine de sels biliaires.
2. Si la fleur de soufre tombe plus ou moins rapidement sous forme d'une pluie fine: présence possible de sels biliaires. La vitesse de la chute de fleur de soufre est plus élevée si la concentration des sels biliaires est plus élevée.

Interprétation clinique:

- L'augmentation de la concentration des acides biliaires est rencontrée dans l'ictère par obstruction et l'ictère hépatocellulaire.

TP 11 DÉTERMINATION D'IONS DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES

Les substances minérales (électrolytes) ont un rôle important dans le maintien de l'intégrité morpho-fonctionnelle du corps, sont des substances qui ne peut pas être synthétiser ou dégrader dans le corps. Les électrolytes plasmatiques sont dissous dans l'état ionique, avec un équilibre entre anions et cations. Dans le corps, dans des conditions physiologiques, la quantité d'éléments minéraux est relativement constante, même si leur contribution varie. En ce sens, la fonction d'excrétion joue un rôle important dans le maintien de la concentration d'électrolytes dans l'environnement interne. Toute condition médicale grave de l'organisme est accompagnée par des troubles électrolytiques ; pour les cliniciens, connaître les valeurs d'ions est d'une importance particulière pour le diagnostic et le traitement.

1. **Les cations** quantitativement les plus importants dans le sang sont le sodium (Na^+), potassium (K^+), calcium (Ca^{2+}), magnésium (Mg^{2+}), et, à moindre mesure, le fer (Fe^{2+}), le cuivre (Cu^{2+}), le zinc (Zn^{2+}).
2. **Les anions** quantitativement plus importante de sang sont la chlorure (Cl^-), le bicarbonate (HCO_3^-), le phosphate (HPO_4^{2-}) et, à un degré moindre, le sulfate (SO_4^{2-}).

Calcium, magnésium, phosphore, potassium, sodium et chlore représentent 60-80% du contenu inorganique du corps. D'autres éléments, cuivre, zinc, fer, manganèse, cobalt, etc., utilisé par le corps en petites quantités, sont appelés **oligo-éléments**.

Les unités utilisées dans la pratique médicale pour exprimer la quantité d'électrolyte sont mg/dl, osmol/litre (milliosmol /litre) et milliéquivalents/litre. Osmol/litre est le rapport entre la quantité de substance (en grammes par litre) et la masse atomique de la substance.

$$\text{Osm/l} = \frac{\text{g/l}}{\text{masse atomique}} ; \quad \text{mOsm/l} = \frac{\text{mg/l}}{\text{masse atomique}} ;$$

$$\text{mEq/l} = \text{mOsm/l} \times \text{valence} = \frac{\text{mg/l}}{\text{masse atomique}} \times \text{valence}$$

Dans le cas d'ions monovalents, la quantité en mEq/l est égale à celle exprimée en mOsm/l.

Les concentrations moyennes normales, exprimées en mEq/l, de cations et anions majeurs dans le sérum sont données par l'ionogramme Gamble:

La répartition des électrolytes entre l'espace extracellulaire et intracellulaire est différente que si:

- Sodium = cation principal extracellulaire
- Chlore = anion principal extracellulaire
- Potassium = cation principal intracellulaire
- Phosphate = anion principal intracellulaire, avec les protéines

La composition électrolytique de l'espace intravasculaire et interstitiel diffère très peu (le paroi vasculaire est perméable aux électrolytes). La différence entre les deux zones est significatif en termes de contenu en protéines, elles sont plus élevées dans l'espace intravasculaire et sont responsables du maintien de la pression colloïde-osmotique augmenté dans le système vasculaire.

La composition en électrolytes (mEq/l)
des liquides biologiques principales

Cations	Anions
Na ⁺ = 141	Cl ⁻ = 102
K ⁺ = 5	HCO ₃ ⁻ = 27
Ca ²⁺ = 5	HPO ₄ ²⁻ = 2
Mg ²⁺ = 2	SO ₄ ²⁻ = 1
	Acides organiques = 5
Total = 153 mEq/l	Protéines = 16
	Total = 153 mEq/l

Noter que la somme des cations est égale au somme des anions.

A. Cations

a. Sodium (Na⁺): valeurs normales = 135 - 145 mEq/l

C'est le cation principal extracellulaire,

- Il participe à la régulation de la pression osmotique, du volume plasmatique (concentration est plus élevé que d'autres cations) et de l'équilibre acido-basique (système tampon le plus important est l'acide bicarbonate / bicarbonate = 20/1).
- Il participe à la régulation des fonctions du système nerveux et l'activité musculaire.
- Il participe au maintien d'une différence de potentiel des deux côtés de la membrane cellulaire, ayant un rôle dans la transmission de l'influx nerveux.
- Il a un rôle d'activation d'enzymes (alpha-amylase et la bêta-galactosidase).
- Il a un rôle dans le transport transmembranaire (ATPase Na⁺ / K⁺ dépendante).
- Élimination de sodium est par voie rénale, sueur, intestinale; les hormones minéralocorticoïdes (aldostérone) règlent son élimination.

Pathologiquement, on connaît hyponatrémie et hypernatrémie, en fonction de la distribution de sodium dans différents compartiments.

L'hyponatrémie: en cas d'une diarrhée sévère, de la transpiration massives, brûlures graves, la néphrite chronique, l'administration de diurétiques, une insuffisance surrénale, le diabète sucré avec acidose, après interventions chirurgicales, l'insuffisance rénale.

L'hypernatrémie: en cas d'une sténose du pylore, l'hyperaldostéronisme, corticostéroïdes thérapie, une fièvre prolongée.

b. Potassium (K⁺): valeurs normales = 3.8 à 5.4 mEq / l

C'est le cation principal intracellulaire.

- Il participe au maintien de la différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, avec un rôle dans la conduction nerveuse (augmentation de la concentration de potassium intracellulaire est accompagné d'excitabilité accrue du muscle).
- Au cours de la contraction des muscles potassium passe extracellulaire et sodium intracellulaire.

- Il a le rôle d'activer certaines enzymes (pyruvate kinase, carbamylphosphate synthase).
- Il est impliqué dans le transport transmembranaire (ATPase Na^+ / K^+ dépendante).

L'hypokaliémie: est accompagné par des troubles neuromusculaires et cardiaques et est rencontrée dans les syndromes chirurgicaux (occlusion intestinale haute, sténose du pylore), alcalose, l'administration de diurétiques mercuriels, la dialyse péritonéale, le coma diabétique, coma hypoglycémique, hypercorticisme surrénalien, la maladie de Cushing, maladie tubulaire rénale.

L'hyperkaliémie: est rencontré dans les destructions cellulaires (syndromes hémolytiques, le syndrome d'écrasement, choc toxique-septique, les brûlures étendues) et l'insuffisance rénale chronique.

c. Calcium (Ca^{2+}): valeurs normales = 4.5 à 5.5 mEq / l (9-11 mg / dl)

Dans le plasma il se trouve principalement sous deux formes: calcium libre (diffusible ou ionisés) - 60%; et sous la forme de protéinate de calcium (calcium non-diffusible) - 40%.

- Le calcium varie selon l'état d'équilibre acido-basique (il augmente dans l'acidose et diminue dans l'alcalose).
- Il participe au processus de la coagulation sanguine.
- Il est impliqué dans la régulation de la perméabilité membranaire pour le Na^+ et K^+ (concentrations augmentées de Ca^{2+} diminuent la perméabilité cellulaire pour Na^+ et les concentrations faibles l'augmente).
- Il est impliqué dans la contraction musculaire (patients avec une concentration faible de Ca^{2+} présentent des fasciculations musculaires à cause de la baisse de Ca^{2+} dans les jonctions nerveuses).
- Les ions de calcium sont impliqués dans la régulation de l'excitabilité (à pH alcalin, les protéines libèrent H^+ , leurs fonctions négatives augmentent, calcium est fixé sur la protéine, en diminuent sa concentration dans le sang et en augmentent l'excitabilité neuromusculaire ; à pH acide les protéines fixent H^+ , les ions de Ca sont libérés de la protéine, la concentration plasmatique augmente et diminue l'excitabilité neuromusculaire).
- Calcium est fixé dans l'os sous la forme d'apatite hydroxylique et carbonique (99% du calcium corporel est fixé dans les os et les dents) avec un rôle dans le maintien de la calcémie.

L'hypocalcémie: se produit dans l'hypoparathyroïdie (tétanie, rachitisme), l'hyperthyroïdie, l'IRC (insuffisance rénale), augmentation de la thyreocalcitonine.

L'hypercalcémie: se produit dans la destruction massive de l'os, l'hyperparathyroïdie, l'hypervitaminose D.

d. Magnésium (Mg^{2+}): valeurs normales = 1.9 à 2.5 mg/dl (0.77 à 1.01 mmol/l)

Il est un cation principalement intracellulaire.

- Il est activateur enzymatique (kinase, phosphatase).
- Il intervient dans la biosynthèse des acides nucléiques.
- Il est un constituant des os et des dents.
- En collaboration avec Ca^{2+} , Na^+ et K^+ il est impliqué dans la régulation de l'excitabilité neuromusculaire.
- Il est un indicateur de la fonction rénale: il est filtré glomérulaire et résorbé tubulaire. En cas d'une fonction rénale altérée, la réabsorption tubulaire augmente et, de façon implicite, les niveaux sanguins de magnésium.

L'hypomagnésémie: apparaît dans les vomissements, la diarrhée, la cirrhose, coma diabétique, rachitisme infantile.

L'hypermagnésémie: apparaît dans l'IRA (insuffisance rénale aigu), l'IRC (insuffisance rénale chronique), l'hyperthyroïdie, la maladie d'Addison.

e. Fer (Fe^{2+} / Fe^{3+}): valeurs normales = 50 à 180 μg / dl (8.9 à 32.2 μmol / l)

- Il contribue à la synthèse de l'hémoglobine et systèmes enzymatiques d'oxydoréduction. Il est un constituant de l'hémoglobine, myoglobine, catalase, peroxydase.
- Il est stocké sous forme de ferritine
- Il est transporté dans le sang d'un beta globuline – transferrine

L'hyposidérémie: anémie ferriprive, l'anémie posthaemorrhagique, les infections aiguës.

L'hypermagnésémie: hémochromatose idiopathique, l'anémie macroblastique, hypoplasique, hémolytique.

B. Anions

a. Phosphate: valeurs normales du P = 3 à 4,5 mg / dl (0,97 à 1,45 mmol / l)

Il est, avec les protéines, l'anion principal intracellulaire. Il est trouvé en association avec des protéines sériques (phosphoprotéine, nucléoprotéines), des composés solubles dans l'acide (phosphore inorganique, les esters d'hydrates de carbone, créatine phosphate, acides triphosphates, phosphoenolpyruvate) et dans les phospholipides (lécithine, céphaline, sphingomyéline).

- Il joue un rôle dans la formation osseuse.
- Il joue un rôle dans le stockage et le transfert de l'énergie dans le corps.
- Il joue un rôle dans le métabolisme des glucides, des lipides, le maintien de l'équilibre acido-basique.

L'hypophosphatémie: se produit dans le rachitisme, maladie coéliqua, l'hyperparathyroïdie.

L'hyperphosphatémie: se produit dans l'hypoparathyroïdie, IRC, hypervitaminose D.

b. Chlorure (Cl^-): valeurs normales = 98 à 110 mEq / l

- C'est l'anion principal dans l'espace extracellulaire, une composante du suc gastrique.
- Il est impliqué dans l'équilibre électrolytique et des liquides.
-

L'hyperchlorémie: se produise dans l'acidose métabolique.

L'hypochlorémie: se produise dans l'alcalose métabolique.

Les méthodes de référence pour la détermination d'ions dans les liquides biologiques sont:

- la méthode flamméphotométrique
- les méthodes électrométriques avec d'électrodes ion – sélectives
- la spectroscopie d'absorption atomique
- les méthodes basé sur les réactions de coloration

Les méthodes enzymatiques – plus simple, plus rapide (que les méthodes chimique) et avec une utilisation minime de matériel biologique.

Les méthodes de base pour la détermination des ions dans les liquides biologiques sont la méthode photométrique de flamme, des procédés électrométriques avec électrode sélective d'ions, des procédés de spectroscopie d'absorption atomique, méthodes sur la base de réactions colorées et, plus récemment, des méthodes enzymatiques, ce qui compte tenu de la simplicité, la rapidité, la sélectivité et consommation minimale de matériel biologique, tendent de plus en plus à remplacer les méthodes chimiques.

La méthode photométrique de flamme

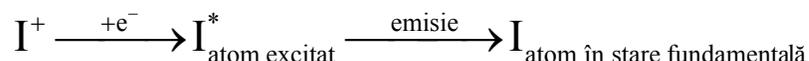
Les spectres d'émission

L'excitation d'une phase gazeuse d'un certain atome par l'intermédiaire d'une source d'énergie (flamme, un arc électrique, une étincelle électrique) donne lieu à un spectre d'émission avec un nombre limité de lignes spectrales, caractérisées individuellement par une longueur d'onde.

Le spectre d'émission d'éléments excités dans la flamme peut être enregistré par des cellules photoélectriques, le rayonnement d'émission est proportionnel à la concentration. Chaque élément a un rayonnement spécifique, appelée bande d'émission spectrale. Les bandes d'émission des atomes et des ions sont relativement proches. En général, les atomes ont une bande principale d'émission et plusieurs bandes secondaires. Les bandes individuelles de différents éléments peuvent se chevaucher, comme le sodium et le calcium à environ 590 nm.

La photométrie de flamme est basée sur l'excitation des atomes métalliques dans la température de la flamme et de réémission ultérieure de l'énergie sous forme de raies spectrales.

La photométrie de flamme a le plus de possibilités pour les ions de métaux alcalins et alcalino-terreux, en s'appuyant sur l'interaction entre ces ions et la flamme d'un brûleur de butane ou acétylène. Les ions précités ont un caractère électropositif forte. En interaction avec la flamme riche en électrons, les ions sont réduits à des atomes dans l'état excité. De retour à leur état fondamental, ils émettent de rayonnement de résonance avec la fréquence caractéristique de l'atome en question.



Le rayonnement est passé à travers des filtres d'interférence, qui sélectionnent les composantes spectrales d'ions caractéristiques suivis. L'intensité de la composante spectrale est mesurée avec un détecteur et le signal électrique est affiché sur un instrument de mesure. Pour la détermination des ions de lithium, sodium et potassium est suffisante la flamme de butane, tandis que le calcium et le magnésium nécessitent la flamme d'acétylène (a une température plus élevée).

Une détermination quantitative des éléments dans la solution d'échantillon peut être effectuée par utilisation de la méthode de courbe d'étalonnage, la méthode de solutions de limitation, le procédé d'additifs, etc. Les solutions à analyser et les solutions standard (solutions étalon) doivent avoir, si possible, les mêmes propriétés physiques et les conditions de pulvérisation doivent être identiques.

La méthode d'absorption atomique

La spectroscopie d'absorption atomique (SAA) est une procédure utilisée pour la détermination quantitative des éléments chimiques à l'aide de l'absorption de rayonnement d'atomes libres étant dans l'état gazeuse.

SAA peut être utilisée pour déterminer plus de 70 éléments trouvés en solution ou directement dans des échantillons solides.

La technique utilise la spectrométrie d'absorption pour la détermination quantitative d'un analyte dans un échantillon. Elle nécessite des étalons de cet analyte de concentration connue et on établit la relation entre l'absorption et la concentration mesurée sur la base de la loi de Beer-Lambert.

Les électrons des atomes sont dans un nébuliseur et sont passés sur orbitales plus élevés (état excité) pour une très courte période de temps (nanosecondes) après l'absorption d'une quantité bien définie d'énergie (rayonnement à une longueur d'onde spécifique). Cette quantité d'énergie est spécifique à une transition d'électron particulier dans un élément particulier. En général, chaque longueur d'onde correspond à un élément particulier et son seul. On mesure le flux de rayonnement de l'atomiseur en l'absence de la probe, respectivement en présence de la probe, en utilisant un détecteur. Le rapport des deux valeurs d'absorbance est converti en concentration d'analyte, ou sa masse, en utilisant la loi de Beer-Labert.

La méthode électrométrique avec des électrodes sélectives d'ions

Cette méthode est basée sur la production et la mesure des tensions qui dépendent de la concentration de l'ion à déterminer. Le principe est similaire à celui pour la détermination du pH. Les électrodes sélectives pour différents ions fonctionnent que l'électrode de verre.

Le potentiel d'électrode est déterminé par la relation de Nernst:

$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln a_x$$

où: E_0 = potentiel standard (non dépendante de la concentration d'ions)

R = constante des gaz

T = température absolue

z = charge d'ion

F = le numéro de Faraday

a_x = activité d'ions a déterminer: $a_x = f_{\pm} [X]$

f_{\pm} = coefficient d'activité moyenne de la solution (pour les solutions diluées

≈ 1)

$$pX = - \ln aX$$

Une électrode sélective d'ions est formée d'une membrane ayant la propriété d'échange d'ion et qui est en équilibre avec une solution électrolytique spécifique pour un type particulier d'ions. Pour membrane on utilise la verre ou des échangeurs d'ions organiques liquides (gels) qui sont noyés dans une membrane synthétique ou en verre poreux.

L'activité (concentration), dans une solution d'ions a mesurer, dans laquelle l'électrode est insérée, détermine un potentiel dont la taille est proportionnelle à l'activité (concentration) d'ions.

Il existe des électrodes pour les ions de sodium, potassium, calcium, chlorure, etc.

Pour tout type de dispositif est effectuée l'étalonnage préalable.

En fait, pour la détermination des ions par la méthode électrométrique est nécessaire est un système constitué d'une électrode de mesure ion-sélective et une

de référence, à la fois immergé dans la solution à doser. La différence de potentiel résultant entre les deux électrodes est exprimée en tant que valeur p X, ou mEq / l.

Les méthodes chimiques et enzymatiques

Les méthodes chimiques sont rarement fondées sur des techniques de titrage et pratiquement, sont principalement basées sur les réactions formant des composés colorés.

Les dernières méthodes de détermination des ions dans les fluides biologiques sont des méthodes enzymatiques.

Les méthodes enzymatiques pour la détermination des ions dans des fluides biologiques ont un certain nombre d'avantages:

- Sont adaptables pour les mesures en manuel ou automatique;
- Peuvent être utilisées pour les déterminations dans des échantillons de sérum, urine, la sueur et de tissus;
- Peuvent aussi être utilisées pour les fluides non biologiques;
- Les réactifs utilisés sont stables (en particulier ceux qui sont conservés sous forme solide).

En principe, les ions peuvent être déterminés dans des fluides biologiques par deux types de méthodes:

- des procédés où le ion est le substrat de réaction ou une substance participant à la réaction, et dans ce cas la quantité du produit final est soumise par lui;
- des procédés où les ions agissent comme effecteurs enzymatiques (stimulateurs ou inhibiteurs) et leur détermination est faite par la détermination de la stimulation ou l'inhibition du processus catalytique enzymatique impliqué.

Application pratique

I. La détermination du calcium dans des liquides biologiques

Introduction

Calcium (Ca^{2+}) est le ion bivalent prédominant extracellulaire. Dans le plasma il y'a :

- Du calcium ionisé (Ca^{2+})
- Du calcium lié à protéines plasmatiques
- Du calcium complexé avec d'acide citrique.

Les méthodes de détermination du calcium dans les liquides biologiques peut être classifiées en:

- méthodes de précipitation
- méthodes complexométriques
- spectrophotométrie d'absorption atomique.

Les méthodes de référence pour la détermination du calcium sont:

- les méthodes flamme photométriques
- les méthodes électrométriques avec d'électrodes ion – sélectives
- la spectroscopie d'absorption atomique surtout la spectroscopie de masse

Dans les laboratoires cliniques le calcium est déterminé souvent par méthodes colorimétriques:

- la méthode colorimétrique avec crésol phtaléine
- la micro méthode photométrique avec glyoxal-bis(2-hydroxyanyl) (GBHA)

A. Méthode directe avec ortho-crésolphtaléine

Principe

À pH basique, le ion de calcium sérique forme avec o-crésolphtaléine un complexe coloré. Pour que les ions magnésium ne perturbent pas la réaction, on ajoute en tant qu'agent chélatant 8-hydroxyquinoléine.

Réactifs (kit Biocon)

1. Réactif 1 (tampon): Tampon AMP (2-amino-2-méthyl-1-propanol) 350 mmol / l, pH 10,7
2. Réactif 2 (chromogène) contenant complexone o-cresolphtaleine 0,16 mmol / l, 8-hydroxyquinoléine 6,90 mmol / l d'acide chlorhydrique 0,06 mmol / l, 2% de détergent
3. Réactif 4 (standard): contenant Ca^{2+} 10 mg% (2,5 mmol / l)

Mode opératoire

La détermination du calcium peut être fait par cette méthode soit à l'échelle semimicro ou mode micro. Les quantités utilisées sont indiquées entre parenthèses pour la microméthode. Dans trois tubes on pipette les composants:

Réactifs, μl	Probe	Standard	Témoin
Réactif 1	500	500	500
Réactif 2	500	500	500
Eau distillée	-	-	25
Standard	-	25	-
Sérum	25	-	-

Remuez bien et laissez reposer pendant 5 minutes à température ambiante. Mesurez les absorbances de l'échantillon et du standard en équilibrant le spectrophotomètre avec le témoin à 578 nm.

Le calcium peut être déterminé dans les urines de 24 heures. Étant donné que les ions ont tendance à précipiter dans l'urine alcaline, il est nécessaire l'acidification préalable de l'urine.

On mesure la quantité d'urine et on prend 10 ml qui sont acidifiés avec 5 gouttes d'HCl concentré jusqu'à un pH de ≈ 1 . L'urine acidifiée est chauffée à 60°C pendant 15 minutes. La technique utilisée est la même que pour le sérum. Lorsque les échantillons d'urine contiennent trop de calcium, celles-ci sont diluées avec de l'eau distillée.

Calcul

$$\text{mg Ca}^{2+}/100 \text{ ml ser} = \frac{A_p}{A_s} \times 10$$

Valeurs normales

- nouveau nées: 8,0 – 13,0 mg/100 ml sérum
- enfants: 10,0 – 12,0 mg/100 ml sérum
- adultes: 9 – 11 mg/100 ml sérum
- Ca^{2+} urinaire: 50 – 150 mg/24h

Limites de la méthode

La linéarité de la méthode est respectée pour des valeurs d'ions calcium allant jusqu'à 15 mg Ca^{2+} / 100 ml de sérum.

La bilirubine dans des quantités supérieures à 20 mg / 100 ml et de phosphate de plus 40 mg / 100 ml, interfèrent avec le calcium, qui entraîne des erreurs. Les ions magnésium au-dessus de normaux dans le sang n'influence pas le résultat final.

Les anticoagulants qui peuvent être des agents chélateurs ne doivent jamais être utilisés dans cette méthode.

B. La micro-méthode photométrique avec GBHA

Principe

Le glyoxal-bis(2-hydroxyanyl) (GBHA), en milieu méthanolique alcaline, donne avec les ions de calcium un complexe avec une coloration spécifique. L'absorption de ce composé, mesurée dans l'intervalle 530 – 550 nm, s'augmente proportionnellement avec la concentration du calcium sérique.

Réactifs

1. Méthanol p.a 100 ml
2. Solution méthanolique de GBHA 0,075% (on dissout 75 mg GBHA p.a dans 100 ml méthanol. La solution est stable seulement 10 jours à +4°C dans le réfrigérateur (préparez seulement la quantité nécessaire pour travail).
3. Hydroxyde de sodium 0,25 N,
4. Solution étalon de calcium (10 mg Ca²⁺/100 ml)

La préparation du matériel biologique pour analyser

Les probes de sérum claires et non – hémolysé peut être analysées sans deprotéinisation et dilution si nous avons des pipettes pour 20 µl (microprobes). Si nous n'avons pas des micropipettes ou le sérum n'est pas clair, on va faire une dilution ou une deprotéinisation.

Mode opératoire

Dans 3 tubes à essais 120/12 introduisez:

Réactifs	P (probe)	E (étalon)	T (témoin)
Eau distillée	-	-	0,50
Microprobe (sérum dilué)	0,50	-	-
Etalon 10 (dilué)	-	0,50	-
GBHA méthanolique 0,075%	1,00	1,00	1,00
Agiter bien pour uniformiser le mélange et ensuite ajouter très vite:			
Hydroxyde de sodium 0,25 N	0,50	0,50	0,50

Agitez très bien les tubes. Laissez au repos à la température du laboratoire.

Après 5 minutes (dans l'intervalle 5 – 15 minutes) mesurez l'absorbance du probe et de l'étalon contre le témoin à $\lambda = 540$ nm (530 – 550 nm), en cuvette de 1 cm.

Calcul

$$mg Ca^{2+} / 100 ml serum = \frac{E_P}{E_E} \times 10$$

Valeurs normales

mg Ca²⁺ = 8,4 – 10 mg Ca²⁺/100 ml

Variations pathologiques

Augmentation:

- Nette (toujours supérieure à 12 mg/ 100 ml) dans la maladie de Recklinghausen
- Modérée dans:
 - le myélome multiple;
 - tout processus ostéolytique actif qu'il soit d'origine tumorale ou infectieuse (ostéomyélite);
 - hypervitaminose D

Diminution:

- Hyperparathyroïdie
- Rachitisme grave et hypovitaminose D
- Néphrites
- États tétaniques

Observation

Les seringues utilisées pour le prélèvement du sang, ainsi que la verrerie servant au dosage, seront convenablement lavées à l'eau acidulée par l'acide chlorhydrique, puis très soigneusement rincées à l'eau distillée et bidistillée. Le non – observation de cette précaution risque d'entraîner des erreurs importantes.

II. La détermination du chlorure sérique

Introduction

Les méthodes vieilles pour la détermination quantitative du chlore sont basées sur la formation des sels insolubles d'argent ou de mercure. Les méthodes actuelles utilisées dans les laboratoires cliniques sont:

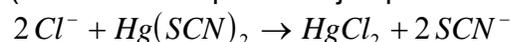
- les méthodes colorimétriques, titrage colorimétrique
- les méthodes électrométriques avec des électrodes ion – sélectives

À l'avenir, les méthodes enzymatiques seront les méthodes de référence pour la détermination du chlore dans liquides biologiques.

Microméthode photométrique avec thiocyanate de mercure et azotate ferrique

Principe

En milieu acide, les ions chlore et le thiocyanate de mercure (II) forme les ions thiocyanate qui réagissent avec l'acide azotique et les ions du fer (III) pour donner une coloration rouge. La coloration est proportionnelle avec la concentration d'ions chlore (la linéarité est préservé jusqu'à 150 mmol/l).



Réactifs

1. Solution étalon des ions chlore, 100 mmoles/l (on dissout 5,85 g NaCl en eau distillée, et on ajoute d'eau distillée jusqu'à 1000 ml).
2. Thiocyanate mercurique 2 mmoles/l
3. Réactif de coloration (Fe(NO₃)₃ 30 mmoles/l + HNO₃ 40 mmoles/l)

Mode opératoire

Dans 3 tubes à essais introduisez:

Réactifs (ml)	P	E	T
Sérum (dilution 1:10)	0,1 0	-	-
Solution étalon (dilution 1:10)	-	0,10	-
Eau distillée	-	-	0,10
Thiocyanate mercurique Hg (SCN) ₂	3,7 5	3,75	3,75
Réactif de coloration	0,2 5	0,25	0,25

Agitez bien. Laissez au repos 5 minutes.

Lisez l'absorption du probe et du étalon contre le témoin, à $\lambda = 490 \text{ nm}$.

Calcul

$$\text{mmol Cl}^- / 1000 \text{ ml serum} = \frac{E_P}{E_E} \times 100$$

Valeurs normales

Sérum: 97 – 108 mmoles Cl⁻/1000 ml sérum

Urine: 120 – 240 mmoles Cl⁻/24 heures

Variations pathologiques

Diminué dans:

- grandes déperditions salines
- coup de chaleur
- sténose du pylore, occlusion intestinale, vomissements de toutes origines
- diarrhées profuses
- insuffisance surrénale chronique (maladie d'Addison) ou aigue
- régime sans sel avec insuffisance rénale importante

Augmenté dans certaines acidoses plasmatiques d'origine rénale (=acidose hyperchlorémique)

III. La détermination du Fe par procédé avec bathophénantroline

Introduction

Le fer est présent dans l'alimentation comme Fe²⁺ dans les produits animaux et Fe³⁺ dans les produits végétaux. Pour être absorbés, les ions Fe³⁺ doivent être réduits en Fe²⁺ par une feroréductase présente dans la bordure en brosse intestinale (nécessite vitamine C). Fe²⁺ est absorbé dans le duodénum et le jéjunum supérieure. Environ 1 mg de fer est assimilé par le corps tous les jours.

Le fer absorbé est transporté dans le plasma lié à une protéine spécifique, la transferrine, chaque molécule de transferrine peut lier deux ions Fe²⁺. La transferrine est synthétisée dans le foie, le taux de synthèse varie inversement avec les réserves en fer du corps. La saturation normale de la transferrine est de 30-40%. Le fer est stocké dans le foie et les macrophages du système réticuloendothélial sous forme de ferritine et l'hémosidérine. Bien que la ferritine est une ferroprotéine intracellulaire (formé d'un noyau interne composé de ions de Fe³⁺ et d'un revêtement extérieur protéique), de petites quantités sont libérés dans la circulation, la ferritine sérique est en relation proportionnelle directe avec les réserves en fer. L'hémosidérine est un complexe insoluble dérivé de la ferritine. Lorsque les réserves en fer sont augmentées, la quantité d'hémosidérine formée augmente, conduisant à une sidérose.

Les déterminations de fer sont nécessaires pour le diagnostic et le suivi de l'anémie microcytaire (en raison de troubles du métabolisme de fer, la carence en fer et les hémoglobinopathies), anémie macrocytaire (en raison de carence en vitamine B12, la carence en folates) et les anémies normocytaires, comme l'anémie de cause rénale (déficit d'érythropoïétine), l'anémie hémolytique, hémoglobinopathie, maladie de la moelle osseuse, les blessures toxiques de la moelle osseuse, l'hémochromatose.

Principe

Fe³⁺ est libéré de complexes de ferritine sous l'action d'agents tensioactifs à un pH faible. Une fois libéré, il est réduite à Fe²⁺ et réagit avec bathophénantroline, en résultant un complexe coloré photométrable.

Réactifs (catalogue Analyticon – Fluitest IRON B)

- Réactif 1** (réactif bathophénantroline): contenant tampon acétate 0.2 mol/l, pH = 4.7; hydroxylamine 0.06 mol / l; bathophénantroline 0.2 mmol / l.
- Réactif 2** (réactif blanc): contenant tampon acétate 0.2 mol / l, pH = 4.7; hydroxylamine 0.06 mol / l;
- Réactif 4** (standard de fer) contenant fer 166 µg/100 ml.

Mode opératoire

Pipetez dans trois tubes à hémolyse comme dans le tableau:

Réactifs (µl)	P	E	T
Réactif 1	600	600	-
Réactif 2	-	-	600
Eau distillée	-	-	100
Echantillon (sérum)	100	-	-
Réactif 4 (Standard Fe)	-	100	-

Agitez vigoureusement les tubes, puis laissez reposer pendant 30 minutes à la température ambiante pour le développement de la réaction de couleur. Déterminez les absorbances des échantillons (Ee) et standard (Es) contre le témoin à 546 nm.

Calcul

$$\mu\text{g Fe}/100 \text{ ml} = [\text{Ee} / \text{Es}] \times 166$$

Valeurs normales

Femmes: 37 à 145 µg / dl

Hommes: 59 à 158 µg / dl

Les nouveau-nés: 150 à 220 µg / dl

Signification clinique

La carence en fer conduit à l'anémie. Les causes de l'anémie ferriprive sont:

- Régime carencé en fer
- Troubles de l'absorption intestinale du fer
- Les pertes gastro-intestinaux dues aux infections parasitaires, maladies inflammatoires de l'intestin, les tumeurs malignes intestinales entraînant un saignement occulte
- Les pertes dans le système génito-urinaire
- Les pertes menstruelles

- Une augmentation des besoins: grossesses répétés, les enfants en grandissement.

L'anémie de l'inflammation chronique est une forme particulière de l'anémie ferriprive en raison de blocus des réserves de fer du système réticuloendothélial.

Augmentation du fer sérique apparaît dans:

- **L'hémochromatose**, maladie congénitale causée par une mutation (C282Y) du gène HFE, un état dans lequel l'érythropoïèse est normale, mais le fer se dépose dans les cellules parenchymateuses du foie, du cœur, des testicules, des poumons, etc., avec altération de la fonction de ces organes.
- **Augmentation du catabolisme des érythrocytes**, avec l'accumulation de fer dans les macrophages du système réticuloendothélial.

IV. La détermination du magnésium dans les liquides biologiques

Introduction

La détermination du magnésium peut être accomplie par un certain nombre de méthodes, y compris des techniques complexométrique de précipitation, flamme photométriques, électrométrique avec électrode ionique sélective.

Méthode colorimétrique utilisant le jaune de titane - normalisé

Principe

Les ions de magnésium forment avec le colorant "jaune de titane" (thiazol Gelb) dans un milieu alcalin, une couleur rouge brique. Pour éviter la floculation, un stabilisant (alcool polyvinylique) est ajouté. L'intensité de la couleur, déterminée par photométrie, est proportionnelle à la concentration.

Réactifs

1. Solution "jaune de titane" 0,05% : 0,05 g jaune de titane sont dissolvés dans 100 ml d'eau distillée. La solution peut être conservée une semaine à + 4°C.
2. Solution d'hydroxyde de sodium 7,5%
3. Solution d'alcool polyvinylique 0,1%
4. Solution standard stock de magnésium - 8,358 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ sont dissolvés dans 100 ml d'eau distillée.
5. Solution standard de travail: la solution stock est diluée 1/200 avec de l'eau distillée (la solution contient $5 \mu g Mg^{2+}/ml$ solution).

Mode opératoire

Pipetez dans quatre tubes comme dans le tableau suivant:

Réactifs, ml	Probe	Standard 1	Standard 2	Témoin
Sérum	0,20	-	-	-
Solution standard de travail	-	1,00	2,00	-
Eau distillée	2,80	2,00	1,00	3,00
Alcool polyvinylique	0,50	0,50	0,50	0,50
Solution "jaune de titane"	0,50	0,50	0,50	0,50
Solution hydroxyde de sodium	1,00	1,00	1,00	1,00

Mélangez le contenu de tubes, laissez reposer 5 minutes et mesurez les démenagements de rayonnement de l'échantillon et de standards contre le témoin à 540 nm.

Calcul

$$\text{mg Mg}^{2+}/100 \text{ ml ser} = \frac{A_P}{A_{S_1}} \times 2,5 = \frac{A_P}{A_{S_2}} \times 5$$

La méthode n'est pas suffisamment spécifique et a le désavantage de l'instabilité de la couleur obtenue.

Valeurs normales

sérum: 1,9 – 2,5 mg Mg²⁺/100 ml

liquide cérébro-spinal: 2,5 – 3,5 mg Mg²⁺/100 ml

urine: 1 – 10 mg Mg²⁺/100 ml; 50 – 150 mg Mg²⁺/24 h

Les changements pathologiques

Hypomagnesemias: vomissements, diarrhée, insuffisance hépatique (cirrhose), coma diabétique, tétanie, rachitisme infantile, des troubles psychiatriques (épilepsie), pancréatite aiguë.

Hypermagnesemia: l'hyperthyroïdie, la maladie d'Addison insuffisance rénale aiguë et chronique.

Dosage du phosphore sérique

Introduction

Le principe de base pour la détermination du phosphore inorganique dans le sérum est la réduction du phosphomolybdate d'ammonium en bleu de molybdène avec de l'acide ascorbique en tant qu'agent réducteur, ou le chlorure stanneux, l'hydroquinone, l'acide 1,2,4-aminonaphtolsulfonique.

Pour la détermination du phosphore dans le sérum est nécessaire avant la déprotéinisation avec de l'acide trichloroacétique. Le phosphore peut être déterminé sans déprotéinisation utilisant un tampon carbonate - sulfite qui maintient les protéines dans la solution.

Réactifs

1. Solution d'acide trichloroacétique 20% : 20 g acide trichloroacétique sont dissolvés dans 80 g d'eau distillée.
2. Solution de molybdate d'ammonium : 25 g molybdate d'ammonium sont dissolvés en 300 ml d'eau distillée, on ajoute 75 ml acide sulfurique concentré et on ajoute de l'eau distillée jusqu'à 500 ml.
3. Solution d'hydroquinone 1% : 1 g hydroquinone est dissolvé dans une petite quantité d'eau distillée, on ajoute une goutte d'acide sulfurique concentré est de l'eau distillée jusqu'à 100 ml.
4. Solution de sulfite de sodium (Na₂SO₃·7H₂O) 20% (se prépare frais) : 20 g Na₂SO₃·7H₂O sont dissolvés en 80 g d'eau distillée.
5. Solution standard stock de phosphate : 0,4394 g phosphate disodique sont dissolvés en 100 ml d'eau distillée et on ajoute de l'eau distillée jusqu'à 1000 ml.
6. Solution standard de travail : on dilue 1 ml de solution stock avec 9 ml d'eau distillée. Cette solution contient 10 µg P/ ml.

Mode opératoire

A. Déprotéinisation

Introduisez 1 ml de sérum dans un tube de centrifugeuse et ajoutez 2 ml d'eau distillée et 2 ml d'acide trichloroacétique (goutte à goutte). Remuez bien et laissez reposer 10 minutes, puis centrifugez.

B. Réaction de couleur

Dans des tubes à essai, pipettez selon le tableau suivant:

Réactifs, ml	Probe	Standard	Témoin
Surnageant	2,5	-	-
Solution standard de travail	-	1,50	-
Eau distillée	-	1,00	2,50
Solution molybdate	0,50	0,50	0,50
Laissez reposer minutes. Puis ajoutez:			
Solution sulfite	0,50	0,50	0,50
Solution hydroquinone	0,50	0,50	0,50
Eau distillée	1,00	1,00	1,00

Remuez, laissez reposer 30 minutes puis lisez l'absorbance de la probe et du standard, en équilibrant le spectrophotomètre avec le témoin, à 610 nm.

Calcul

$$\text{mg P / 100 ml ser} = \frac{A_P}{A_S} \times 0,03 \times 100$$

Valeurs normales

Adultes: 3–4,5 mg P/100 ml sérum

Enfants: 4-7 mg P/100 ml sérum

Les changements pathologiques

Hypophosphatémie : rachitisme, syndrome Burnett, maladie coeliaque, ostéite fibrokystique Recklinghausen (hyperparathyroïdie), diabète phosphatidique rénale.

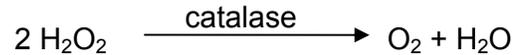
Hyperphosphatémie : hypoparathyroïdie, insuffisance rénale chronique, hypervitaminose D, coma diabétique.

TP 12. I. Détermination de l'activité de catalase dans le sang –

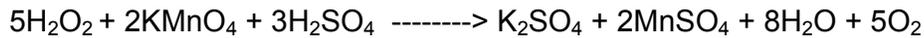
Méthode Bach-Zubcova

Principe

La catalase du sang catalyse la décomposition de l'eau oxygénée avec la libération de l'oxygène moléculaire:



L'activité catalasique se détermine par le dosage de l'eau oxygénée avant et après la réaction avec du permanganate de potassium dans un milieu acide.



La différence en eau oxygénée, décomposée dans un intervalle bien défini de temps, est utilisée pour le calcul de l'activité enzymatique.

Réactifs

1. Solution d'eau oxygénée 1% : 3,3 ml perhydrol 30% sont dilués à 100 ml avec de l'eau distillée.
2. Solution d'acide sulfurique 10% : 56,6 ml H₂SO₄ 96% (d = 1,84 g/ml) sont ajoutés lentement avec agitation et refroidissement à 895,8 g d'eau distillée.
3. Solution de permanganate de potassium 0,1N : 3,16 g KMnO₄ sont dissolus dans 1000 ml d'eau distillée)
4. Alcool amylique

Mode opératoire

Introduisez 0,1 ml sang fraîchement récolté dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajoutez 10 ml d'eau distillée et remuez pour produire la hémolyse ; complétez jusqu'au marquage avec de l'eau distillée. On obtient une dilution du sang de 1:1000.

Introduisez dans quatre flacons Erlenmeyer comme suit:

Réactifs, ml	Probe 1	Probe 2	Témoin 1	Témoin 2
Eau distillée	10	10	10	10
Sang hémolysé dil. 1:1000	1	1	1	1
Faites bouillir les flacons témoins 1 et 2 pendant 5 minutes dans le bain d'eau pour dénaturer la catalase, puis laissez refroidir. Ajoutez :				
Solution d'eau oxygénée 1%	2	2	2	2
Remuez bien toutes les flacons et laissez reposer pour exactement 30 minutes à la température du chambre. Ajoutez :				
acide sulfurique 10%	5	5	5	5
alcool amylique, gouttes	2-3	2-3	2-3	2-3

Remuez les flacons puis titrez avec la solution de permanganate de potassium jusqu'à une couleur rose stable. Calculez la moyenne des deux probes (V_p) et respectivement des témoins (V_m).

Calcul

$$\text{Chiffre de catalase} = (V_m - V_p) \times 1,7$$

1,7 représente l'équivalent gramme de l'eau oxygénée. 1 ml permanganate de potassium 0,1N correspond à 1,7 mg eau oxygénée.

Valeurs normales

Chiffre de catalase = 14 – 18

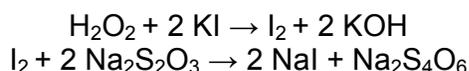
II. Détermination de l'activité de catalase de pomme de terre

Principe

Catalase est une enzyme qui catalyse la réaction de décomposition du peroxyde d'hydrogène:



On prépare un extrait de pomme de terre qui contient de la catalase active. L'extrait va décomposer une partie de peroxyde d'hydrogène ajoutée à une quantité connue. Le peroxyde d'hydrogène en excès va être traité avec KI, étant formée I₂. L'iode est titré avec du thiosulfate de sodium.



L'activité catalase est calculée par l'estimation de la proportion du peroxyde d'hydrogène décomposé.

Réactifs

1. Extrait de pomme de terre
2. CaCO₃ poussière
3. Solution H₂O₂ 0,5N fraîchement préparé (30 ml de solution 30% sont introduits dans un flacon jaugé et sont dilués jusqu'à 500 ml avec de l'eau distillée)
4. Solution H₂SO₄ diluée (5 ml solution d'acide sulfurique concentré avec de l'eau distillée)
5. Solution KI 10%
6. Solution amidon 1%
7. Solution molybdate d'ammonium 1%
8. Solution Na₂S₂O₃ 0,05 M (7,905 g Na₂S₂O₃ sont dissous dans d'eau distillée et sont dilués jusqu'à 100 ml avec de l'eau distillée)

Mode opératoire

A. Préparation de l'extrait

10 grammes de pommes de terre pelées et coupées en petits morceaux sont triturés avec 5 grammes de CaCO₃, sont passés ensuite quantitativement dans une fiole jaugée de 50 ml et dilués jusqu'à la marque. Remuez bien, laissez reposer pendant une heure. L'homogénat est centrifugé pendant 10 minutes à 5000 tours par minute. L'extrait obtenu contient de la catalase.

B. Détermination de l'activité de la catalase

Pipettez dans 250 ml Erlenmeyer comme suit:

Réactifs, ml	Probe	Témoin
Exact de pomme de terre	5	
H ₂ O distillée	1	6
H ₂ O ₂ 0,5N	5	5
Laissez reposer 15 minutes		
H ₂ SO ₄ dilué	5	5
KI 10%	5	5
molybdate d'ammonium 1%	1 -2	1 -2
drops		
amidon 1%	0,25	0,25
Titrez avec le thiosulfate de sodium jusqu'à la disparition complète de la couleur bleu		
ml Na ₂ S ₂ O ₃ utilisés au titrage	V _P	V _T

Calcul

Avec le volume titré de thiosulfate, calculez la quantité de peroxyde d'hydrogène non décomposé. Ensuite, calculez la quantité de peroxyde d'hydrogène décomposé, sachant la quantité initiale de peroxyde d'hydrogène prise pour le travail. On remarque la décomposition d'une quantité de H₂O₂ dans l'échantillon, par rapport au témoin.

On note:

V_P - Le volume total du thiosulfate de sodium utilisée pour le titrage de la probe.

V_T - Le volume total du thiosulfate de sodium utilisé dans le titrage du témoin

V - Volume de thiosulfate correspondant à calculer la quantité de peroxyde d'hydrogène décomposé par la catalase

$$V = V_M - V_P$$

1. Calculez le numéro de molles de thiosulfate de sodium, trouvés dans le volume V:

1000 mL solution Na₂S₂O₃0,5 molles Na₂S₂O₃

V mL solution Na₂S₂O₃x molles Na₂S₂O₃

$$x = V \times 0,0005 \text{ molles Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$$

2. Calculez le numéro de molles de H₂O₂ décomposée par l'action de la catalase contenue dans le volume d'extrait de pomme de terre utilisé pour la probe (10 mL):

1 molle H₂O₂.....2 molles Na₂S₂O₃

y molles H₂O₂.....V x 0,0005 molles Na₂S₂O₃

$$y = V \times 0,00025 \text{ molles H}_2\text{O}_2$$

3. Calculez le numéro de molles de H₂O₂ décomposée par l'action de la catalase contenue dans le volume total d'extrait de pomme de terre (50 mL):

10 mL extrait de pomme de terre.....V x 0,00025 molles H₂O₂

50 mL extrait de pomme de terre.....z molles H₂O₂

$$z = V \times 0,00125 \text{ molles H}_2\text{O}_2$$

4. Calculez l'activité de la catalase (µmolles H₂O₂ / g pomme / min) dans la réaction de décomposition de l'eau oxygénée:

Réactifs

1. Huile ou la graisse analysée
2. Un mélange d'acide acétique : chloroforme dans le rapport volumique 3 : 2
3. Solution KI 10%: 10 g KI sont dissous et portés à 100 ml avec de l'eau distillée dans un flacon jaugé.
4. Solution $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,1 N: 15,811 g de thiosulfate de sodium sont dissous et amenés à 100 ml avec de l'eau distillée dans un flacon jaugé.
5. Solution d'amidon, 1% : 1 g d'amidon est mélangé avec un peu d'eau distillée. On ajoute environ 70 ml d'eau et on porte à ébullition jusqu'à dissolution complète – clarification du liquide. On refroidie et amène à 100 ml avec d'eau distillée dans un flacon jaugé.

Mode opératoire

Dans un ballon de titrage pesez 5 g d'huile et 10 ml mélange d'acide acétique / chloroforme. Le mélange est agité pour assurer la dissolution de la matière grasse dans le chloroforme.

Ajoutez 0,5 ml de solution de KI de 10% et remuez, ensuite laissez au repos pendant 2-3 minutes.

Ajoutez env. 50 ml d'eau distillée et quelques gouttes de solution d'amidon.

Titrez l'iode libéré avec la solution de thiosulfate 0,1 N jusqu'à ce que disparaisse la coloration bleue à la fois dans la phase aqueuse et le chloroforme.

Notez le volume utilisé pour le titrage (V).

Calcul

Index de peroxydation = $[V \times 0,1 \times 1000]/5$ (milli équivalentes / kg)

B. Détermination des peroxydes lipidiques dans le sang (Méthode UMFT- Bucarest)

Dans les milieux biologiques, une série de composés souffrent de réactions d'oxydation par un mécanisme peroxydique. Dans les lipides, les résidus d'acides gras polyinsaturés (acide linoléique, linoléique, arachidonique, etc.) sont sujettes à la peroxydation, qui affecte ces structures trouvées dans les membranes cellulaires et sous-cellulaires, les lipoprotéines plasmatiques, etc.

Etant un processus complexes et les peroxydes formés étant très instables, avec un temps de vie très court, il est très difficile de déterminer la teneur en peroxyde. Dans la pratique de laboratoire on détermine les composés résultant de la peroxydation, à la fois dans le sérum, le plasma et l'urine, par diverses méthodes colorimétriques, chimiluminescence, immunométrique, spectrométrie de masse. Très accessible, mais pas très précise, il est la détermination colorimétrique du dialdéhyde malonique issu de la peroxydation des acides gras insaturés.

Principe

La malondialdéhyde forme avec de l'acide thiobarbiturique un composé coloré, spectrophotométrable.

Réactifs

1. Solution acide trichloroacétique (TCA) 50%: 50 g TCA sont dissous dans 50 ml d'eau distillée
2. Solution acide trichloroacétique (TCA) 20%: 20 g TCA sont dissous dans 80 ml d'eau distillée
3. Solution acide thiobarbiturique: 0,67 g sont dissous dans 100 ml TCA 20%

4. n-Butanol
5. Sang récolté sur héparine ou citrate de sodium.

Mode opératoire

Dans un tube de centrifugation, pipetez 2 ml de sang. Ajoutez 2 ml d'eau distillée et agitez vigoureusement.

Congelez et décongelez deux fois pour assurer une lyse complète des cellules.

Ajoutez 2 ml TCA à 50%. Agitez avec une baguette de verre pendant 15 minutes et centrifugez au 6000 rpm.

En outre, dans deux tubes à essai, pipetez les composants comme suit:

Reactifs, ml	Probe	Témoin
surnageant	2,0	-
TCA 20%	-	2,0
Acide thiobarbiturique	2,0	2,0

Couvrez les tubes avec un entonnoir en verre et maintenez les 20 minutes dans un bain d'eau bouillante.

Refroidissez les tubes à essai, ensuite ajoutez 4 ml de n-butanol et remuez les tubes 1 minute en utilisant un vortex.

Laissez reposer pour la séparation des phases.

Lisez l'absorbance (A) de la phase organique de la probe à 530 nm par rapport au témoin.

Calcul

Le coefficient d'extinction molaire du composé coloré formé de la malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique est $1,54 \times 10^5$ molles / l.

$$\text{MDA} = A \times 39 \text{ nmolles/ml}$$

Valeurs normales: 3 – 6 nmolles/ml