

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire/ Biologie moléculaire des
procaryotes

Thème

**Influence de la température et du temps d'acheminement des
Prélèvements sanguins au laboratoire sur le bilan hépatique**

Présenté par : BOUFRIDA Hadjer

BOUHADJAR Soumia

GHOMRANI Sanna

GOUFI Hind

Devant le jury composé de :

Président : M. AYED Hayette (M.A)

Examineur : M. ZIDI Sourour (M.A)

Encadreur : M. MERABET Rym (M.A)

Juin 2011

Remerciment

*Nous tenons à remercier Dieu qui nous donnés le courage et le savoir
achever ce modeste travail.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciement à notre
cadreur de mémoire M^{elle} : Merabet Rym, maître assistane.*

*Pour ses conseils scientifiques et son encadrement attentif tout au long
de la durée de la préparation de notre mémoire ; pour
la confiance qu'elle nous a accordée et pour avoir
porté la rigueur scientifique nécessaire à son bon déroulemen*

*Nos gratitudes vont également à M, Ayed Hayette maître assistante et
M^{elle} , Zidi Sourour, maître assistante pour nous avoir fait*

*l'honneur de participer à ce jury et d'examiner ce thème, sans oublier tous
le personnel de l'EPSP laboratoire d'analyse médicale de Oued Zenati
qui nous a permis de réaliser ce travail surtout Nawel.*

*Nous tenons a remercie aussi notre co encadreur Ghorab .Dounia et
l'enseignant Ayed.faycel*



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles

Et ceux à qui je dois tant

*A mes parents Khamessi et Dalila qui m'ont éclairé le
chemin de la vie et pour leur amour et leur support continu*

A ma très chère frère Chouaib

A ma très chère sœur Chaima

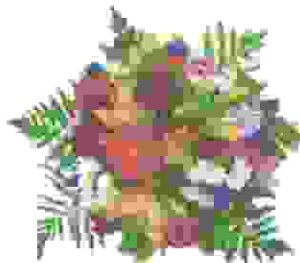
A toute ma famille Rabeh, Saleh, Souaib, Alcha, Sara, Imen, Loulou,

Arwa, Noussa, Ayoub, Abdou, Khadija, Ratiba, Asma

*A tous mes amis en qui j'ai toujours trouvé le soutien
et le réconfort*

A toute personne ayant contribué de près ou de loin à la

Réalisation de ce travail



Hadjer

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail d'abord et avant tout :
À la mémoire de ma mère qui a été mon guide parfait de puis mon
enfance vers le bon chemin et qui restera toujours dans mon
cœur, et je souhaite que dieu l'accepte dans son paradis.*

*A mon chère père qui m'a toujours encouragé et aidé à surmonter
les difficultés.*

*A mon mari la joie de ma vie qui m'a aidé d'arriver jusque là et
je lui dire : tu restera toujours dans mon cœur.*

*Ames très chères sœurs et frères : Karima, Moufida, Nawel,
Farouk, Haroun et Bilalé.*

*A ma belle famille et surtout, ma belle mère Nadjia. Atouts
mes amis chacun en son nom.*



sana.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Celle que dieu m'a aidée le faire, à mes plus chers êtres au monde : mes parents pour les sacrifices qu'ils ont consentis leur encouragement et leur soutiens moral et matériel ; ces grâce à leur amour que j'ai pu surmonter les moments les plus difficiles durant toute ma vie

A mes chers frères: Abd'ElGhan, Farouk, Noredidine, Walid.

A ma chère sœur : Assia.

*A tous les membres de ma famille surtout : ma grande mère,
mes chers oncles et mes chères tantes.*

*A mes cousines : Soraya, Nadiâ, Cherifa, Nadhira, Leila et
Amani.*

A mes amies et camarades d'enfances et universitaire :

Zina, Faiza, Nesrine et Rafima.

A mon encadreur : Merabet Rym.

Enfin, à tous ceux que j'aime et respect.



Soumia

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

*A mes parents que dieu les bénissent, avec ma profonde gratitude pour
tous les sacrifices et les efforts qu'ils ont consentis en ma faveur
durant mes études.*

*A ma sœur : Ahlem que j'adore, qui m'encouragees et pour
sa disponibilité.*

*A mes frères : Nadhir, Sief-el-dine et Mohamed islam pour ses soutient
moral, ses patiences et disponibilité.*

A toute la famille Goufi, à toute la famille Kaffousse.

A toutes mes amés.

*A toute l'équipe du laboratoire de biochimie d'LPSP de Bouchejouf
surtout madame Brahmia.*

A mon encadreur Rym Mérabet.

*A la mémoire de ceux qui n'ont pas pu partager avec moi cet instant
de bonheur et de joie*



Hind

Table des matières*Liste des abréviations**Liste des figures**Liste des tableaux**Résumé**Introduction***I- Etude bibliographique****Chapitre 1 : Le foie**

1. Anatomie morphologique du foie.....	1
2. Anatomie fonctionnelle.....	1
2.1. Physiologie du lobule hépatique.....	2
2.2. Hétérogénéité morphologique et fonctionnelle des hépatocytes.....	3
3. Exploration fonctionnel hépatique.....	4
3.1. Bilan hépatique.....	4
3.2. L'intérêt du Bilan hépatique.....	4
3.3. Les différents examens demandés dans le cadre du bilan hépatique.....	4

Chapitre 2 : les enzymes hépatiques

1. Transaminase (ASAT/ALAT).....	7
2. structure.....	7
3. Fonction.....	8
4. Classification des techniques de mesure enzymatique.....	9
5. Les techniques de dosage des transaminases.....	10

Chapitre 3 : la Glycémie

1. Structure du glucose.....	12
2. Technique de dosage des glycémies.....	12

Chapitre 4 : Pré analytique

1. Le Prélèvement.....	17
1.1. Définition.....	17
1.2. Modes de prélèvement.....	17
1.2.1. Le sang veineux (sgv).....	17
1.2.2. Le sang capillaire (sgc).....	17
1.2.3. Le sang artériel (sgA).....	18
1.3. Condition de prélèvement.....	18
2. Facteurs influençant les résultats d'analyses d'un bilan hépatique.....	19
2.1. Les paramètres influents se manifestant in vivo.....	19
2.2. Les artéfacts se manifestant in vitro.....	20
I. Matériel et méthode.....	23
1. Matériel.....	23
1.1. Matériel expérimental.....	23
1.2. Matériel biologique.....	23
2. Méthode.....	23
2.1. Protocole expérimental.....	25
2.2. Analyses biochimiques.....	26
2.2.1. Aspartate-aminotransférase(AST).....	26
2.2.2. Alanine- aminotransférase(ALT).....	27

2.2.3. Glucose	28
3. Méthodologie statistique	30
II. Résultats et discussions	31
Conclusion	
Références Bibliographiques	
Annexe	

Produced with ScanTOPDF

Liste des abréviations

<i>Mots</i>	<i>Abréviation</i>
<i>AFP</i>	<i>Alpha-foetoprotéine</i>
<i>ALAT</i>	<i>Alanine- aminotransférase</i>
<i>ASAT</i>	<i>Aspartate-aminotransférase</i>
<i>CDT</i>	<i>Transferrine déficient en carbohydrate</i>
<i>CK</i>	<i>Créatinine kinase</i>
<i>C6PDH</i>	<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>
<i>EDTA</i>	<i>Acide éthylène diamine tétracétique</i>
<i>Gamma GT</i>	<i>Gamma-glutamyl transpeptidase</i>
<i>GLY</i>	<i>Glycémie</i>
<i>LDH</i>	<i>Lactate déshydrogénase</i>
<i>MDH</i>	<i>Malate déshydrogénase</i>
<i>NAD</i>	<i>Nicotinamide adénine dinucléotide</i>
<i>PAL</i>	<i>Phosphatases alcalines</i>
<i>PLP</i>	<i>phosphate de pyridoxal</i>
<i>PMP</i>	<i>Phosphate de pyridoxamine.</i>
<i>TGO</i>	<i>Glutamate oxaloacétate transaminase</i>
<i>TGP</i>	<i>Glutamate pyruvate transaminase</i>
<i>TP</i>	<i>Taux de prothrombine</i>

Liste des figures

N° des figures	Titre des figures	pages
1	<i>Anatomie du foie (a) : Lobule hépatique, (b) : Travées de cellules hépatiques organisation vasculaire</i>	2
2	<i>la structure de la transaminase</i>	8
3	<i>la liaison des aminotransférases avec le coenzyme</i>	9
4	<i>La structure du glucose, (a) forme linéaire, (b) forme cyclique</i>	12
5	<i>Protocole expérimentale</i>	25
6	<i>variations sériques moyennes de l'activité enzymatique de TGO</i>	33
7	<i>variations sériques moyennes de l'activité enzymatique de TGP</i>	34
8	<i>variations sériques moyennes du taux du glucose sanguin</i>	35

Produced with Scantopdf

Liste des tableaux

N°	Titre	page
1	<i>Analyses des variances des trios paramètres mesurés (TGO, TGP, GLY)</i>	32
2	<i>Les résultats de l'activité de la TGO à des temps et du température différents.</i>	33
3	<i>Les résultats de l'activité de la TGP à des temps et du température différents.</i>	34
4	<i>Les résultats de l'activité de la GLY à des temps et du température différents.</i>	35

Produced with ScanTOPDF

Résumé

Le foie est la plus grosse glande annexe du tube digestif. Le diagnostic des anomalies est posé à partir d'un examen sanguin dans un bilan hépatique. Il désigne un ensemble d'analyses ayant pour but d'étudier les fonctions hépatiques. De nombreux échantillons sanguins analysés sont prélevés dans l'hôpital et les durées d'acheminement sont très variables. Dans le cadre de la démarche, qualité de notre laboratoire et en particulier de la réflexion menée sur l'étape pré analytique, nous avons voulu évaluer l'impact de la température et du délai avant centrifugation sur la stabilité des trois paramètres biochimiques : les transaminases et la glycémie du bilan hépatique. Cette étude a été réalisée sur 7 d'échantillons sanguins recueillis sur tubes secs pour les transaminases et sur tube héparine pour la glycémie. La glycémie a été mesurée par la méthode à le glucose oxydase quant aux les transaminases, une méthode enzymatique indirecte basée sur deux réactions complètes, a été utilisée. L'analyse statistique a montré, que ces deux facteurs n'influençaient pas les résultats. En conclusion, il convient de ne pas réaliser de dosage pour des délais d'acheminement dépassant quatre heures avant centrifugation quelque soit la température de conservation.

Mots clés : le foie, bilan hépatique, pré analytique, temps, température, stabilité, les transaminases, glycémie.

Produced with

INTRODUCTION

Produced with ScanTOPDF

Introduction

Le foie est la plus grosse glande annexe du tube digestif du corps humain, aux fonctions multiples et complexes de synthèse et de transformation de diverses substances. Le diagnostic des anomalies du foie est posé à partir d'un examen sanguin dans un bilan hépatique. Il désigne un ensemble d'analyse ayant pour but d'étudier les fonctions de foie.

Le dosage enzymatique des transaminases (TGO, TGP) et le test de la glycémie à jeun constituant trois (3) paramètres biochimiques les plus importants dans le bilan hépatique.

Le premier stade de toute analyse est le prélèvement de l'échantillon sanguin. Le prélèvement doit répondre à plusieurs critères de qualité puisque la fiabilité des résultats ne dépend pas uniquement de la technique d'analyse choisie, mais aussi de la stabilité et des conditions de conservation des échantillons pour analyses. Cette phase appelée pré-analytique doit être maîtrisée pour le laborantin et le médecin afin de garantir un diagnostic de laboratoire optimal.

C'est dans ce contexte là, qu'il est nécessaire d'établir des normes de qualité, pour d'aboutir à des résultats fiables, répétables et donc totalement crédibles. Notre travail sur l'étude de l'effet de la température et du temps d'acheminement des prélèvements sanguins destinés pour la mesure de l'activité enzymatique des transaminases et de la glycémie. Il a été réalisé à l'EPSP Oued Zénati (Laboratoire d'analyse médicale).

CHAPITRE 1

Le foie

Produced with ScanTOPDF

1. Anatomie morphologique du foie

Le foie est une volumineuse glande annexe du tube digestif, aux fonctions multiples et complexes de synthèse et de transformation de diverses substances.

Il est situé en haut et à droite de l'abdomen, sous la coupole droite du diaphragme, qui le sépare du poumon correspondant. Il est masqué, en arrière et sur les côtés, par les côtes. Il est en rapport anatomique avec plusieurs éléments. Vers le haut et en arrière il est fixé, au diaphragme par un épais ligament. Sous sa face inférieure ; la vésicule biliaire lui est accolée avec à sa gauche, le pédicule hépatique (allant de l'aorte vers le foie, de la veine porte drainant le tube digestif et allant vers le foie) et de la voie biliaire (allant du foie vers la vésicule biliaire et l'intestin).

Le foie pèse 1,5 kg chez l'adulte. Il présente quatre lobes (les lobes droit et gauche, le lobe médian et celui de Spiegel), chacun étant divisé en un ou plusieurs segments le foie est ainsi constitué en tout de huit segments, chacun étant l'objet d'une vascularisation propre. Cette segmentation permet de réaliser des hépatectomies partielles, dites encore réglées, ou l'ablation se limite à un ou quelques segments, 5 ou plus [Berthet et al, 2006].

2. Anatomie fonctionnelle

L'organisation anatomique du foie est telle que le sang, qui est au contact immédiat de chaque hépatocyte, a une double origine : sang veineux venant directement du tube digestif et sang artériel venant de l'aorte par l'artère hépatique. Comme les autres cellules, les hépatocytes sont irrigués par du sang artériel qui leur apporte de l'oxygène et les métabolites qu'ils prennent en charge. Le sang veineux arrive au foie par le système porte hépatique, un dispositif vasculaire unique qui le relie directement au tube digestif. Les veines venant du tube digestif ne gagnent pas directement la veine cave inférieure qui est l'une des voies du retour veineux au cœur. Les veines originaires de l'estomac et de l'intestin confluent pour former la veine porte par la quelle les substances absorbées arrivent au foie où elles sont stockées, traitées ou détoxifiées. Dans le foie, l'artère hépatique et la veine porte se ramifient et donne naissance à un réseau de capillaires « les sinusoides du foie » au niveau des quels ont lieu les échanges entre le sang et les hépatocytes et qui confluent pour former les veines sus-hépatiques qui débouchent dans la veine cave inférieure [Berthet et al, 2006].

2.1. Physiologie du lobule hépatique

Le lobule est l'unité fonctionnelle du foie. C'est un hexagone d'hépatocytes dont le centre est occupé par la veine centrolobulaire. Les six angles externes sont occupés par un rameau de la veine porte, un rameau de l'artère hépatique et un canalicule biliaire. Le sang de l'artère hépatique et de la veine porte coule de la périphérie du lobule vers les sinusoides, qui sont de gros capillaires situés entre les lames d'hépatocytes disposées comme les rayons d'une roue de bicyclette. Chaque lame est faite de deux couches d'hépatocytes de sorte que chacune de ses faces est en contact avec une capillaire sinusoidale. Les sinusoides convergent pour former la veine centrolobulaire. La confluence des veines centrolobulaires donne naissance aux veines sus-hépatiques par lesquelles le sang quitte le foie vers la veine cave inférieure. Un fin canalicule biliaire sans paroi propre court entre les lames d'hépatocytes qui y sécrètent en permanence la bile primitive qui s'écoule vers les canaux biliaires à paroi épithéliale situés à la périphérie du lobule. Les canaux biliaires des différents lobules confluent pour former le canal hépatique dont la jonction avec le canal cystique provenant de la vésicule biliaire donne naissance au canal cholédoque qui débouche dans le duodénum [Castaing et Smail, 1999 ; Berthet et al, 2006].

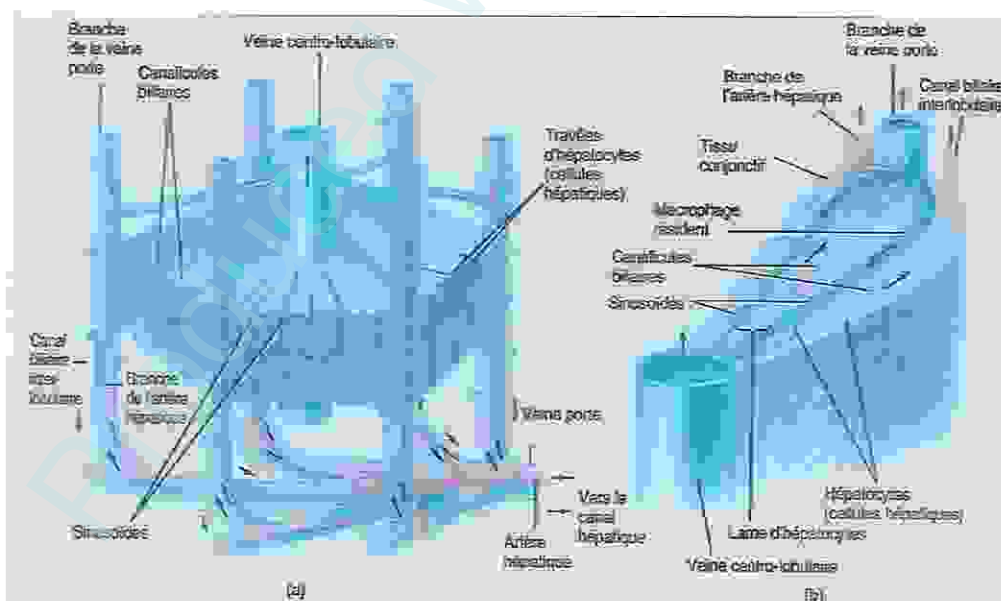


Fig1 : Anatomie du foie (a) : Lobule hépatique, (b) : Travées de cellules hépatiques organisation vasculaire [Berthet et al, 2006].

2.2. Hétérogénéité morphologique et fonctionnelle des hépatocytes

Les hépatocytes situés dans les différentes régions du lobule hépatique diffèrent par certains détails structuraux, mais surtout par leurs activités métaboliques. Les différences morphologiques des hépatocytes en fonction de leur position anatomique sont minimales, mais incontestables. Elles concernent essentiellement les mitochondries, moins nombreuses mais plus volumineuses, avec une surface active plus importante, dans la zone périportale que dans la zone périveineuse [Scoahec, 2003].

La plupart des fonctions métaboliques assurées par les hépatocytes sont distribuées de façon hétérogène à l'intérieur du lobule hépatique. Les activités enzymatiques correspondantes sont habituellement distribuées selon des gradients lobulaires : elles sont présentes dans tous les hépatocytes mais prédominent du côté périportal ou du côté périveineux. Certaines activités enzymatiques ne sont cependant détectables que dans une proportion d'hépatocytes localisés dans une des zones du lobule hépatique ou une partie de l'une de ces zones. Ce type de distribution, beaucoup plus rare que le précédent, est connu sous le nom de distribution en compartiments. L'existence de gradients et de compartiments enzymatiques le long de l'axe porto-centro-lobulaire détermine la zonation métabolique du lobule hépatique [Scoahec, 2003].

La zone périportale est spécialisée dans le métabolisme oxydatif, la néoglucogénèse, le catabolisme des acides gras et des acides aminés, la synthèse de cholestérol, la synthèse d'urée à partir de NH_3 .

La zone périveineuse assure préférentiellement la glycolyse, la synthèse des acides gras et la cétogénèse. Elle est responsable de la synthèse de glutamine à partir de NH_3 . Elle assure également l'essentiel des fonctions de biotransformation des xénobiotiques : c'est là notamment que prédominent les activités de la plupart des cytochromes et des enzymes de détoxification. Elle contient les plus fortes activités des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'alcool [Scoahec, 2003].

Une autre activité métabolique fondamentale des hépatocytes est également distribuée de façon hétérogène dans le lobule hépatique : c'est la capacité de synthèse des protéines plasmatiques. Tous les hépatocytes sont capables de synthétiser et de sécréter l'ensemble des protéines plasmatiques. Toutefois, l'activité de synthèse des

protéines plasmatiques est distribuée en gradients. Pour la plupart d'entre elles, la synthèse prédomine en région périportale : c'est le cas notamment de l'albumine, du fibrinogène ou de l'haptoglobine. Pour quelques autres, comme l'alpha-fœtoprotéine et l'alpha-1- antitrypsine, la synthèse prédomine en région périveineuse [Scoazec, 2003].

3. Exploration fonctionnelle hépatique

L'exploration fonctionnelle du foie repose sur les dosages sanguins. Ainsi, une insuffisance hépatique se traduit par une diminution du taux de certaines protéines (albumine), révélée par une alternation des tests de coagulation (surtout le temps de quick). Une cholestase (insuffisance de l'excrétion biliaire) provoque une augmentation du taux sanguin de bilirubine et des phosphatases alcalines. Une cytolysse (destruction des cellules hépatiques) s'accompagne d'une augmentation du taux (de certaines protéines) sanguin des transaminases. Le taux de gamma glutamyl-transférase sanguine s'élève au cours de toutes les affections du foie. La ponction- biopsie hépatique, pratiquée par voie transcutanée, permet l'examen histologique du fragment de parenchyme hépatique prélevé. Les examens complémentaires radiologiques du foie sont l'échographie, le scanner et l'IRM imagerie par résonance magnétique [Scoazec, 2003].

3.1. Bilan hépatique

Un bilan hépatique consiste à doser un certain nombre d'enzymes ou de substances transformées ou fabriquées en totalité ou en partie par le foie, afin d'apprécier le bon fonctionnement de celui-ci ou du métabolisme hépatique [Feldman, 2007].

3.2. L'intérêt du Bilan hépatique

Le bilan hépatique permet, d'une part, de rechercher une éventuelle anomalie de la fonction hépatique, d'autre part de préciser la nature de l'anomalie mise en évidence afin de mieux comprendre l'origine de l'atteinte [Feldman, 2007].

3.3. Les différents examens demandés dans le cadre du bilan hépatique

Le bilan hépatique comprend le dosage de plusieurs paramètres :

-Les transaminases (SGPT ou ALAT et SGOT ou ASAT) [voir chapitre 02]

-Les phosphatases alcalines (PAL) :

Sont des enzymes produites dans les voies biliaires et les os, et elle se retrouve dans le foie. Le taux normal est de 30 à 150 U/L [Marshall et bangert, 2005]. Elles sont augmentées dans les affections hépatiques: « cholestase extrahépatique et intrahépatique, hépatites, cirrhose hépatique...etc. » Elles sont diminuées en cas de malnutrition, le scorbut, le retard de croissance...etc [Teeter et Franciscus, 2004].

-La gamma-glutamyl transpeptidase (Gamma-GT):

Enzyme produite dans les voies biliaires. Le taux normal est ≤ 60 U/L [Marshall et bangert, 2005]. Elles sont augmentées lors de tumeurs malignes primitives ou métastatiques du foie, lors de la prise de certains médicaments ...etc. Elles sont diminuées chez l'enfant avant 15 ans, et lors d'un déficit congénital en gamma GT [Teeter et Franciscus, 2004].

-La bilirubine :

Est le principal produit résultant de la dégradation des vieux globules rouges. Lorsque la fonction hépatique est endommagée, la bilirubine s'accumule dans le sang et entraîne le jaunissement de la peau et des yeux. Taux normal : 3-20 μ mol/L [Teeter et Franciscus, 2004].

D'autres dosages sont des reflets moins spécifiques de l'activité du foie mais sont aussi des marqueurs du métabolisme hépatique.

-Le cholestérol: Son taux peut être augmenté en cas de cholestase, diminué en cas d'insuffisance hépatocellulaire. Taux normal : < 5 mmol/L

-L'albumine: c'est une protéine fabriquée par le foie. Une diminution de son taux évoque plutôt une insuffisance hépatocellulaire. Taux normal : 35-50 g/L

-Le fibrinogène: c'est une protéine fabriquée par le foie. Une baisse du taux de fibrinogène sanguin peut s'observer parfois en cas d'insuffisance hépatique.

-L'électrophorèse des protéines: c'est une technique qui permet d'observer une diminution ou une augmentation relative ou absolue de chacune des classes de protéines. Elle évalue notamment le bon fonctionnement du foie.

-Le taux de prothrombine (TP): La prothrombine est un facteur de coagulation (facteur II). Exclusivement produit par le foie. Le test biologique n'explore cependant pas exclusivement le facteur II. Mais aussi les facteurs V, VII et X. Il peut être abaissé dans deux circonstances, soit lors d'une insuffisance hépatocellulaire ou soit lors d'un déficit en vitamine K. La valeur du taux de prothrombine 80-100% [Healadot et al, 2006].

D'autres paramètres sont des marqueurs spécifiques d'une maladie particulière du foie:

-Le dosage de l'alpha-foetoprotéine (AFP): est une protéine qui peut être produite par le foie, en cas de cancer, et parfois de cirrhose. Le taux normal $<10\mu\text{g/L}$ [Feldman, 2007].

-Le dosage de la transférrine déficitaire en carbohydrate (CDT): est une protéine fabriquée par le foie, dont la concentration est augmentée dans l'alcoolisme chronique. Son taux normal est en-dessous de 60mg/litre [Feldman, 2007].

-Les sérologies de l'hépatite C et de l'hépatite B: diagnostic d'une hépatite virale C ou B [Feldman, 2007].

CHAPITRE 2

Les enzymes hépatiques

Produced with ScanTOPDF

1. Les transaminases

Enzyme qui accélère le transfert d'un groupement aminé d'un acide aminé sur un acide cétonique -SYN- aminotransférase.

Deux transaminases présentent un intérêt clinique ; l'augmentation de leur taux dans le sang est en effet révélateur d'un certain nombre d'affections ; leur mesure permet donc d'orienter le diagnostic.

L'alanine-aminotransférase (A.L.T. ; ALAT ou SGPT [serum glutamopyruvate transférase])

Est surtout présente dans le foie et les reins et, en quantité plus faible, dans les muscles striés et les globules rouges. Son taux, normalement inférieur à 15 unités internationales par litre, augmente en cas de destruction des cellules de foie- surtout lors d'une hépatite virale, avant l'apparition de l'ictère- parfois de façon très importante ; ce taux augmente également, dans de moindres proportions, au cours d'autres maladies du foie (cirrhose, hépatite toxique [causée par le tétrachlorure de carbone, par exemple], obstruction biliaire, etc.) et au cours de l'infarctus du myocarde.

L'aspartate-aminotransférase : (A.S.T ; ASAT ou SGOT [serum glutamo oxaloacétate transférase])

Se trouve principalement dans les cellules des muscles striés, du foie et dans les globules rouges. Son taux est normalement inférieur à 20 UI/L. Il augmente en cas de destruction des cellules, en particulier en cas d'infarctus du myocarde (l'importance de l'augmentation étant alors proportionnelle à celle de la lésion) et de myopathie. En cas de destruction des cellules du foie, le taux sanguin d'A.S.T. augmente moins que celui d'A.L.T. [Guyader, 2000].

2. La structure des transaminases

Les aminotransférases (transaminases) sont des enzymes qui jouent un rôle essentiel dans le métabolisme des acides aminés. L'Aspartate aminotransférase peut servir de modèle pour les transaminases, c'est un dimère constitué de 2 sous-unités identiques. Chacune avec environ 400 résidus d'acides aminés et un poids moléculaire d'environ 45 kD, renfermant chacune un site actif avec une molécule de PLP liée à Lys258. L'activité enzymatique est tributaire de la contribution des deux sous-unités.

Une sous-unité seule n'est pas active. Chaque site actif nécessite la collaboration des deux sous-unités à travers **Arg386** sur l'une et **Arg292** sur l'autre. En s'insérant entre les deux Arginines, le substrat entraîne le rapprochement des deux sous-unités et déclenche un remaniement étendu qui affecte les extrémités C-terminales et les boucles mobiles. Le PLP se trouve à l'articulation de deux domaines qui bougent l'un par rapport à l'autre [Petsko et al, 2008].

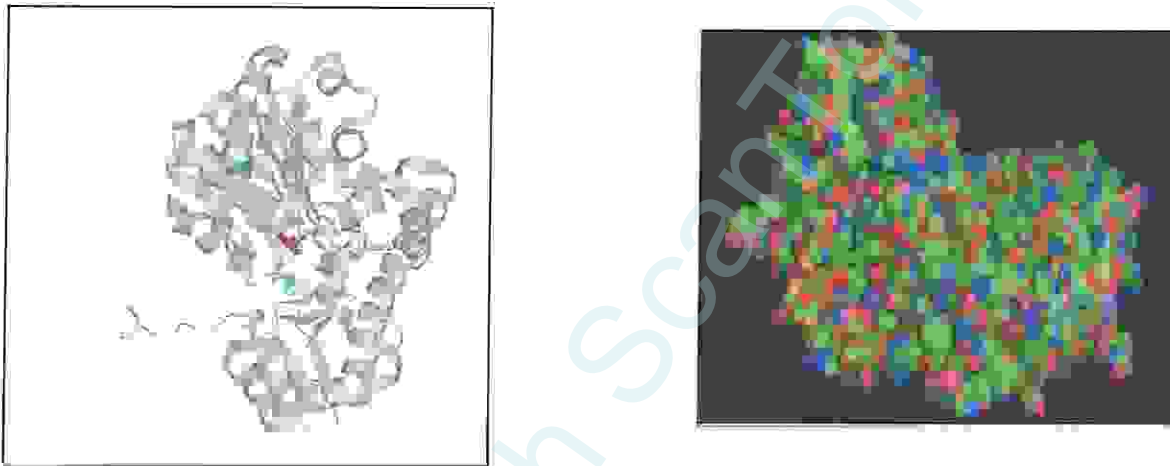


Fig2 : la structure de la transaminase [Petsko et al, 2008]

3. La fonction des transaminases

Les transaminases catalysent le transfert d'un groupement α -amine d'un acide aminé (l'alanine pour l'ALAT, l'aspartate pour l'ASAT) sur un groupement α -cétonique de l'acide céto-glutarique, formant ainsi respectivement un acide oxalo-acétique ou un acide pyruvique, plus un acide glutamique.

Acide aspartique + Acide alpha-céto-glutarique $\xrightleftharpoons{\text{TGO}}$ acide oxalo-acétique + Acide glutamique.

Alanine + acide alpha-céto-glutarique $\xrightleftharpoons{\text{TGP}}$ acide pyruvique + acide glutamique.

La fonction de l'enzyme dépend d'un coenzyme intimement lié à la protéine et se trouvant sous deux formes; le **Pyridoxal-5'-Phosphate (PLP)** et le **Pyridoxamine-5'-Phosphate (PMP)**. Le PLP a une fonction aldéhyde qui est remplacée par une fonction amine primaire dans le PMP. Le coenzyme est présenté sous ses deux formes libres

avec une forme PLP liée à une chaîne latérale de lysine appartenant à l'enzyme. Dans ce dernier cas, la liaison entraînant le départ d'une molécule d'eau donne naissance à une base de Schiff [Ouedraogo, 1986].

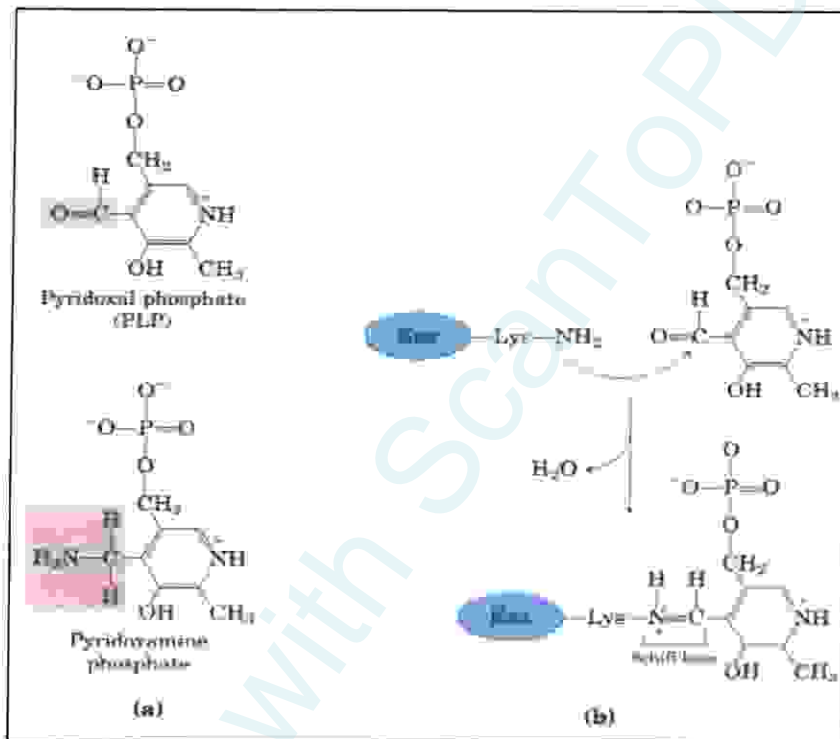


Fig3 : la liaison des aminotransférases avec le coenzyme [Petsko et al, 2008]

4. Classification des techniques de mesure enzymatique

La vitesse d'une réaction peut être théoriquement déterminée en mesurant la

Consommation de substrat par unité de temps - $\frac{ds}{dt}$ ou encore la vitesse d'apparition d'un produit de réaction $+\frac{dp}{dt}$.

Cette dernière mesure peut être directe ou indirecte. Avant d'aborder cette question, il est important de noter que certaines méthodologies permettent de suivre d'une manière continue l'évolution de la cinétique réactionnelle. Ceci est possible chaque fois qu'un substrat ou un produit de la réaction présente une propriété analytique qui est mesurable dans les conditions de l'incubation (par exemple lorsqu'un produit de réaction est coloré ou fluorescent au pH optimum de l'enzyme) [Métais et al, 1990].

4.1. Méthode basée sur la mesure de la vitesse de disparition d'un substrat

Il est nécessaire d'ajouter une quantité importante de substrat dans le milieu réactionnel pour mesurer une activité enzymatique

Une faible proportion de cette quantité devrait être transformée. Il est donc très difficile de mesurer avec précision cette quantité qui est le résultat de l'activité catalytique [Métais et al, 1990].

4.2. Méthode basée sur la mesure de la vitesse d'apparition d'un produit de réaction

Ces méthodes sont plus satisfaisantes que les précédentes puisqu'elles mesurent l'apparition d'un produit de réaction. Ce type de méthodes a été appliqué très largement en chimie clinique et utilise la photométrie, la titrimétrie, la manométrie, les mesures radio-immunologiques et la fluorimétrie [Métais et al, 1990].

5. Les techniques de dosage des transaminases

5.1. Technique de dosage du TGO(ASAT)

Dans le cas de la TGO, les deux réactions suivantes sont couplées :



Deux temps peuvent être distingués :

1-Mise en température des réactifs et élimination des réactions parasites «ici consommation de l'oxaloacétate présent dans l'échantillon et réactivation éventuelle de l'enzyme avec sa coenzyme, le phosphate de pyridoxal». En effet, la TGO se combine de manière réversible avec le phosphate de pyridoxal. C'est pourquoi l'addition de phosphate de pyridoxal au milieu réactionnel et à l'échantillon est recommandée par la S.F.B.C. ; elle a lieu à 30°C, 10min avant le démarrage de la réaction par le 2-oxoglutarate.

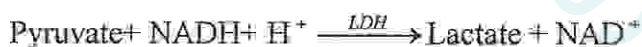
2-Déclenchement de la réaction par adition de 2-oxoglutarate et mesure de la vitesse de diminution de l'absorbance à 340 nm après que l'équilibre entre les deux réactions soit atteint.

Ce test cinétique est très supérieur à la méthode colorimétrique de Reifman et Frankel qui est basée sur le dosage de l'oxaloacétate par la 2-4 dinitrophényldrazine en milieu alcalin. Or, l'oxaloacétate est instable et est inhibiteur de la TGO. La méthode colorimétrique donne donc des valeurs trop basses et est trop peu sensible.

En pratique, l'adjonction de phosphate de pyridoxal conduit à une augmentation de la vitesse de la réaction. Cet effet dépend de la concentration de phosphate de pyridoxal, de la durée de contact entre l'enzyme et le phosphate de pyridoxal, de la concentration en TGO et de la nature du tampon.

5.2. Technique de dosage du TGP(ALAT)

L'ALAT catalyse le transfert de la fonction amine de l'alanine vers l' α -cétoglutarate qu'elle transforme en glutamate. Selon la réaction suivante :



Dans un premier temps, l'ALAT se lie à l'alanine puis transfère la fonction amine sur un coenzyme lié le phosphate de pyridoxal qui devient phosphate de pyridoxamine sans cesser d'être lié à l'enzyme. L'enzyme se dissocie alors du pyruvate.

Dans le second temps, l'enzyme liée au phosphate de pyridoxamine, forme un complexe avec l' α -cétoglutarate, puis transfère la fonction amine du coenzyme qui redevient phosphate de pyridoxal, vers le second substrat qui est transformé en glutamate. Enfin, le complexe ALAT-glutamate se dissocie : l'enzyme et son coenzyme lié ont recouvré leurs structures initiales. [Métais et al, 1990]

CHAPITRE 3

La glycémie

Produced with ScanTOPDF

1. La structure du glucose

Le glucose est un sucre monosaccharide (ose) de la famille des aldohexoses. Il contient six carbones. Il possède une fonction aldéhyde sur le premier carbone, une fonction alcool primaire ($-\text{CH}_2\text{OH}$) sur le sixième carbone et différentes fonctions alcools secondaires ($\text{OH}-\text{C}-\text{H}$) sur les autres carbones (Fig. 4).

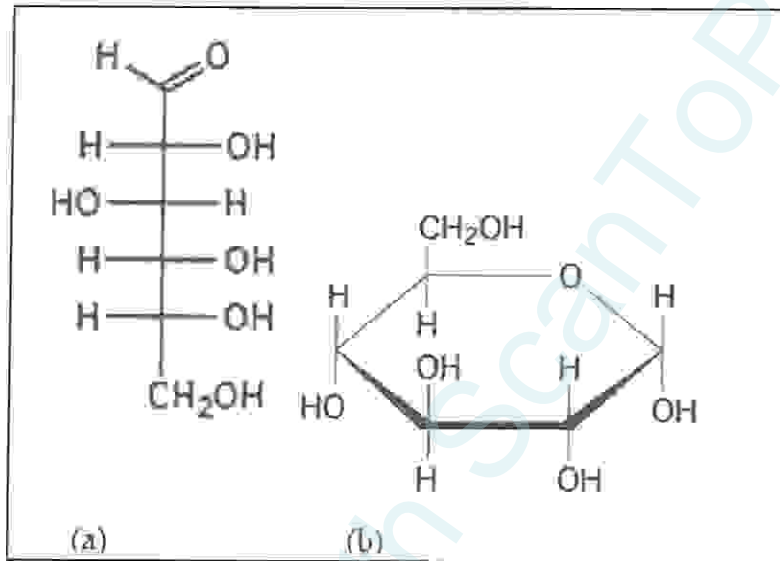


Fig4 : La structure du glucose, (a) forme linéaire, (b) forme cyclique

Le glucose est le seul glucide libre circulant dans le sang. Il est stocké sous forme de glycogène. Tous les hexoses absorbés par l'intestin sont convertis en glucose par le foie

[Poortmans et Boisseau, 2009]

2. Technique des dosages des glycémies

Les méthodes utilisables pour doser le glucose dans le plasma sanguin, peuvent être classées en trois groupes :

2.1. les méthodes réductométriques

Les techniques réductométriques visent à doser le glucose par la mesure du pouvoir réducteur. Ce pouvoir réducteur est dû à la présence d'un groupement pseudo-aldéhydique sur le carbone 1 du glucose. Toutes ces techniques sont effectuées en milieu alcalin puisque le glucose, alors sous forme d'énolate, est plus facilement oxydé que sous sa forme cétoïque. Ces méthodes manquent de spécificité puis qu'elles

mesurent non seulement le glucose. Mais aussi l'acide urique, la créatine, la créatinine et certains acides aminés. [Métais et al, 1990]

2.1.1. Méthodes aux ferricyanures [Méthode de Hoffman (1937)]

La consommation de ferricyanure est déterminée par colorimétrie. La méthode est rapide et a été adaptée sur auto-analyseur Technicon. Malgré l'opération de dialyse la méthode de Hoffman reste peu spécifique : la créatinine et l'urate interfèrent. De plus, sa précision est insuffisante pour les faibles concentrations en glucose puisqu'il s'agit de mesurer une diminution de coloration. [Métais et al, 1990]

2.1.2. Méthodes à l'iodomercurate de Boudoin et Lewin (1927)

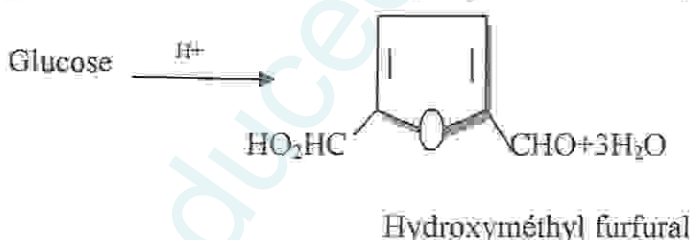
En présence d'une solution alcaline d'iodomercurate et à chaud, le glucose forme par réduction un précipité de mercure métallique, qui sera titré à chaud par iodométrie. Cette méthode qui a servi de référence en France est aujourd'hui dépassée sur les plans de la rapidité et de la spécificité. [Métais et al, 1990]

2.1.3. Méthode aux ions cuivriques [Méthode de Brown (1961)]

Les sels cuivreux formés après chauffage en milieu alcalin sont dosés avec la néocuproïne (2-9, diméthyl, 1-10 phénanthroline) qui forme un complexe jaune orangé stable. La méthode est beaucoup plus sensible [Métais et al, 1990].

2.2. Les méthodes furfuruliques

Les oses chauffés en milieu acide sont déshydratés en dérivés du furfural (le glucose fournit de l'hydroxyméthyl furfural), qui se combinent facilement avec des phénols ou des amines aromatiques pour donner des produits colorés.



Les réactifs proposés sont très nombreux : les principaux sont l'anthrone, l'aniline est surtout l'ortho-toluidine.

2.2.1. Méthode à l'aniline : Lorentz (1963)

L'aniline en solution acétique fournit une coloration rouge intense avec les hexoses, l'acide glucuronique et les pentoses après chauffage, la méthode est très

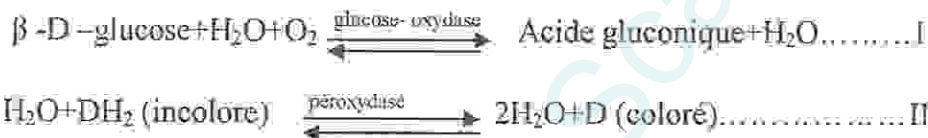
sensible puisque 2µl de plasma suffisent pour faire une détermination. Elle est simple et rapide, mais n'est pas spécifique du glucose.

2.3. Les méthodes enzymatiques

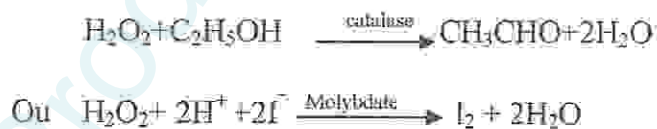
Depuis de nombreuses années, on a utilisé la spécificité des enzymes pour le dosage du glucose dans les milieux complexes tel que le plasma. Dans ce but, ont été employés la glucose oxydase. La glucose déhydrogénase et le système hexokinase-glucose-6-phosphate déhydrogénase.

2.3.1. Méthodes à la glucose oxydase (Hugett et Nixon 1957)

Plusieurs techniques ont été développées. La plus connue utilise l'association glucose oxydase-peroxydase qui catalyse les réactions I et II,



Le glucose oxydase enzyme est très spécifique du β-D glucose. Plusieurs chromogènes ont été proposés pour doser le peroxyde d'hydrogène formé dans la réaction I. Ils diffèrent par leur spécificité, leur stabilité et leur sensibilité et peuvent être classés en deux groupes : Les premiers utilisent une substance qui se colore sous l'action d'un oxydant, les seconds sont basés sur une réaction d'addition produisant en présence d'un oxydant un composé coloré. Le glucose peut être déterminé par dosage de l'oxygène consommé dans la réaction I ou par dosage d'H₂O₂ selon diverses méthodes. L'addition de catalase et d'éthanol ou d'iodure et de molybdate a été proposé pour détruire H₂O₂ sans libération d'oxygène et permettre ainsi à la réaction I d'être complète



2.3.2. Méthode à la glucose déhydrogénase (Banaush 1975)

Le glucose déhydrogénase (*Bacillus megaterium*) catalyse la déhydrogénation du βD-glucose en D-gluconolactone en présence de NAD. L'addition de mutarotase permet d'accélérer la transformation d'α en β-D-glucose et l'obtention de l'équilibre

réactionnel. La formation de $\text{NADH}_2 \text{H}^+$, proportionnelle à la quantité de glucose est évaluée à 334,340 ou 366 nm.

La méthode a été adaptée sur de nombreux automates (flux continu, appareils à transfert, analyseurs centrifuges). La spécificité de la réaction est satisfaisante, notamment sans influence de l'acide ascorbique, de la bilirubine, ...etc, aux concentrations susceptibles d'être rencontrés; Sa sensibilité permet d'opérer sur 2 μl de plasma ou moins pour des méthodes automatisées. [Métais et al, 1990]

2.3.3. Méthodes à l'héxokinase (Schmidt 1961)

Cette méthode utilise l'héxokinase et le glucose -6- phosphate déshydrogénase (G6PDH) qui catalysent les deux réactions suivantes :



La mesure de l'absorbance à 340 nm, après que les réactions aient atteint leur équilibre, rend compte de la quantité de glucose présent dans l'échantillon. Le principal avantage de cette méthode est que la réaction indicatrice (II) est catalysée par une enzyme très spécifique du glucose, ce qui rend cette méthode très exacte, même si l'héxokinase n'est pas spécifique. La méthode mesure la somme glucose + glucose -6- P dans les conditions opératoires habituelles. [Métais et al, 1990]

2.4- Les méthodes rapides sur sang capillaire

Les méthodes rapides sur bandelettes servent à la mesure semi- quantitative de la concentration sanguine du glucose. Ces méthodes sont utilisées par les médecins en cas d'urgences et par les diabétiques dans la cadre d'un autocontrôle glycémique au cours du traitement insulinaire. Les mesures sont faites sur du sang capillaire prélevé au bout du doigt. Ce prélèvement fournit une goutte de sang qui est déposée sur la bandelette réactive. Celle, ci contient de la glucose oxydase, de la peroxydase et un chromogène. Les diverses techniques proposées diffèrent par la qualité du chromogène, et les modalités d'appréciation ou de mesure de la coloration produite. L'appréciation peut être visuelle par comparaison avec une échelle de couleurs correspondant à des concentrations définies. Certaines bandelettes sont basées sur la simple diffusion du sang

dans le support cellulosique, alors que d'autres (dextrostix) ont leur partie réactive recouverte d'une membrane filtrante qui retient les macromolécules et les éléments figurés du sang et laisse diffuser les molécules de petite taille. Afin de réduire ces erreurs, des lecteurs de bandelettes servent à évaluer la coloration obtenue. Ils sont basés sur la mesure de la lumière réfléchie à une longueur d'onde donnée (réalisée par un filtre coloré) [Métais et al, 1990].

CHAPITRE 4

Le pré analytique

Produced with ScanTOPDF

La phase pré analytique

Le pré analytique se définit comme l'ensemble des processus qui se déroulent préalablement à l'analyse biologique proprement dite [Pangault et al, 2007].

1. Le Prélèvement

Le premier stade de toute analyse (et l'un des plus important) est le prélèvement de l'échantillon à analyser

1.1. Définition

Le prélèvement sanguin est un soin réalisable par un infirmier, une sage femme, un biologiste médical, un médecin ou un technicien de laboratoire. Il permet de réaliser des examens de laboratoire sur un échantillon de sang (sang total, sérum ou plasma) prélevé par ponction veineuse, capillaire ou artériel [Métais et al, 1990 ; Bustin, 2008].

1.2. Modes de prélèvement

En fonction du mode de prélèvement, on distingue :

1.2.1. Le sang veineux (sgv)

Le sang veineux est le plus souvent prélevé dans les veines superficielles du pli du coude, avec une aiguille bien coupante en acier inoxydable. Pour faciliter le prélèvement, on peut placer un garrot de telle manière que la circulation artérielle ne soit pas arrêtée. Mais il est nécessaire de le retirer dès que l'aiguille est en place pour éviter la stase. Le sang contenu dans la seringue sera rapidement réparti dans les tubes spéciaux pour être transporté au laboratoire [Métais et al, 1990].

1.2.2. Le sang capillaire (sgc)

Le sang capillaire est de plus en plus, fréquemment prélevé du fait de la miniaturisation des prélèvements (en particulier chez les enfants). Le prélèvement se fait à la pulpe du doigt, au lobe de l'oreille ou au talon pour des enfants, avec des lancettes que l'on aseptise après chaque prélèvement ou des vaccino-styles à usage unique. Les tubes sont centrifugés dans une centrifugeuse spéciale.

Le prélèvement est souvent effectué chez les nouveau-nés et même les prématurés (proscrire alors l'usage d'alcool ou d'éther dans les couveuses). Il suffit pour cela d'échauffer, de masser le doigt ou le talon avant le prélèvement, d'éliminer les premières gouttes pour recueillir une gouttelette de sang rouge artériel. Cette méthode est très utilisée pour la détermination du pH, de P_{CO_2} [Métais et al, 1990].

1.2.3. Le sang artériel (sgA)

Le sang artériel est réservé à des déterminations exceptionnelles : gaz du sang, étude de l'équilibre acido-basique, ammoniacque. Le prélèvement est délicat et doit être réalisé par un médecin. Il se fait à l'artère humérale ou fémorale. L'aiguille doit être plantée directement dans le vaisseau que l'on repère au toucher par le battement artériel. Le sang est recueilli dans une seringue étanche ou par un cathéter directement dans un tube sous huile de paraffine [Métais et al, 1990].

1.3. Les conditions de prélèvement

On opère en général le matin à jeun (entre 7 et 9 heures), afin d'obtenir toujours les mêmes conditions et d'éviter les variations nyctémérales. Pour certaines déterminations un jeûne de 3 ou 10 heures suffit. Le sujet doit se trouver en état de repos, allongé et détendu. Il faut éviter toute émotion, rassurer le patient et le placer dans un endroit confortable. Le matériel doit être sec et propre (aiguilles, seringues, tubes, bouchons, etc.). Le sang ne doit pas être trituré, ni secoué brutalement, mais agité par simple retournement dans un tube bouché. Les aiguilles et seringues ne doivent pas être nettoyées à l'alcool ou à l'éther. Elles doivent être stérilisées à l'étuve et bien refroidies pour éviter toute hémolyse qui empêche la réalisation de nombreux dosages sur le sérum et le plasma. Les tubes utilisés pour recevoir le sang sont en verre ou en matière plastique, de taille très variable (1 ml à 20 ml). Toujours munis d'un bouchon adapté. Il est nécessaire de rendre le sang incoagulable par addition d'anticoagulants pour obtenir après centrifugation le plasma avec son fibrinogène. On opérait le plus souvent sur du sérum. Actuellement pour de raison de facilité et de gain de temps, on travaille sur du plasma [Métais et al, 1990].

- **La prise de certaines substances** : (médicaments, café, alcool, tabac) : certains médicaments que prend le patient peuvent provoquer des augmentations enzymatiques par induction ou effet pathologique. La prise de vitamine B12 peut rendre un test de sang occulte faussement positif. L'alcool peut abaisser le glucose et augmenter les urates.
Le tabac peut modifier la concentration de certains constituants. Ainsi que l'activité de certaines enzymes, d'hormones et de vitamine [Togni et al, 2002 ; Mouris et Deom, 2003].
- **L'activité physique du patient** : peut également modifier les résultats de certaines analyses sous le fait de variations de l'équilibre hormonal qui peuvent provoquer une augmentation de la glycémie. Un effort physique intense provoque une élimination urinaire d'érythrocytes et de leucocytes et une augmentation de CK (créatinine kinase) [Togni et al, 2002].
- **La position du patient** : lors de la préparation du patient à la prise de sang, la position corporelle (debout, assise ou couchée) peut influencer sur de nombreux paramètres. La position debout augmente le calcium total. Le passage de la position couchée à la position debout abaisse le volume plasmatique d'environ 12%, ce qui il faut faire la prise de sang avec le patient en position assise ou couchée [Togni et al, 2002 ; Mouris et Deom, 2003].

Les artefacts se manifestant in vitro : Comprennent :

a) Le Prélèvement de l'échantillon : Le meilleur moment pour une prise de sang

L'interprétation de plusieurs paramètres de laboratoire, surtout clinico-chimiques, passent par des variations circadiennes, saisonnières et périodiques.

Comme les valeurs de référence sont souvent données dans les prélèvements se font à des heures standardisées, les examens diagnostics doivent se faire dans des conditions semblables (exemple : le matin entre 7 à 9 heures) [Togni et al, 2002].

b) Le Choix du récipient : le choix du bon récipient est très critique, car chaque récipient est spécifique pour une analyse précise. De nombreux tubes pour le sang contiennent des gels de séparation, des stabilisateurs ou des anticoagulants qui sont classés en :

Substances captant le calcium : dont EDTA, Citrate, Oxalate

Substances inhibant des enzymes : comme l'héparine [Togni et al, 2002].

c) **L'identification des prélèvements :** pour une bonne interprétation des résultats, l'indication complète du nom, du prénom, de la date de naissance sur la demande d'examen et le tube est la condition sine qua non d'une attribution sans erreur possible au patient, de valeurs de références spécifiques et d'anciens résultats le concernant [Togni et al, 2002].

d) **L'utilisation du garrot lors d'une prise de sang :** le garrot ne doit pas rester trop long temps en place et ne doit pas être trop serré, vu qu'une stase peut fausser les résultats d'analyses [Togni et al, 2002].

e) **L'utilisation du plasma ou de sérum :** le plasma est obtenu après centrifugation sur du sang prélevé avec un anticoagulant, le sérum est obtenu sur du sang complet (sans adjonction d'anticoagulant) après que le processus de coagulation soit terminé.

La concentration sérique d'un constituant peut être différente, de la concentration plasmatique [Mauris et Deom, 2003].

f) **L'hémolyse :** est le passage des constituants des globules rouges dans le plasma ou le sérum. On le reconnaît généralement par la couleur rouge du sérum ou du plasma, causée par l'éclatement des érythrocytes [Mauris et Deom, 2003]. Comme conséquence d'un retard dans la centrifugation, ce qui entraîne l'augmentation de la concentration plasmatique en potassium, phosphate et la diminution de la concentration du glucose [Marshall et Bangert, 2005].

g) **La conservation :** une bonne conservation joue un très grand rôle, surtout pour l'envoi d'échantillons ou l'analyse demandées après coup. Le sang total doit être examiné dans les 24 heures. La conservation du sang total pour le dosage de la glycémie donne des résultats faux, vu que des cellules continuent à métaboliser le glucose. Les échantillons pour les paramètres clinico-chimiques et de la coagulation doivent être centrifugés dans les 45 minutes. Pour le potassium, le phosphate, TGO, il est recommandé de séparer le sérum. Pour les analyses de paramètre photosensibles comme la bilirubine, les vitamines et la créatine kinase, les tubes doivent être à l'abri de la lumière sitôt après la prise de sang.

Les récipients doivent rester bien fermés pour éviter le risque de toute contamination des échantillons par d'autres échantillons ainsi que par oxydation des composants sanguins par la présence d'oxygène. Et l'évaporation de l'eau en provoque la concentration. Le sang total ne doit pas être conservé au réfrigérateur, car les éléments cellulaires peuvent être lysés à basse température [Togni et al ,2002].

MATÉRIEL

ET

MÉTHODES

Processed with Scan2PDF

I. Matériel et méthode

1. Matériel

1.1. Matériel expérimental

Tous les appareils et les réactifs utilisés dans ce travail appartiennent au laboratoire de biochimie à l'EPSP-Oued-Zénati (voir annexe).

Le Tris, L-aspartate, L-alanine, NADH, LDH, MDH, α -cétoglutarate et l'eau physiologique, étaient de qualité analytique, et équilibrés à température ambiante avant utilisation.

1.2. Matériel biologique

Sept échantillons sanguins ont été collectés le matin à 8h, à partir de sept individus à jeun (depuis 8heures). Dans le respect des bonnes pratiques de prélèvement. Un volume de 10 ml de sang a été prélevé au niveau des veines superficielles du pli du coude. Le sang veineux a été réparti dans 3 tubes : 2 tubes pour les transaminases (TGO, TGP) et un tube pour la glycémie.

2. Méthode

2.1. Protocole expérimental

Le sang contenu dans chacun des trois tubes a été fractionné (partagé) en 5 autres tubes.

- Tube 1** : a été immédiatement centrifugé pendant 5 min à 4000 tours pour déterminer les valeurs initiales à t_0 (t_{10h})
- Tube 2** : a été gardé à une température ambiante pendant 2h, puis centrifugé pendant 5 min à 4000 tours pour la détermination des valeurs t_{12h} (t_1)
- Tube 3** : a été conservé à une température égale à $4c^\circ$, puis centrifugé pendant 5 min à 4000 tours pour la détermination des valeurs t_{12h} (t_2)
- Tube 4** : a été gardé à une température ambiante pendant 4h puis centrifugé pendant 5 min à 4000 tours pour la détermination des valeurs t_{14h} (t_3)

-**Tube 5** : a été conservé à une température égale à 4°C , puis centrifugé pendant 5 min à 4000 tours pour la détermination des valeurs t_{14h} . (t_4)

Produced with ScanTOPDF

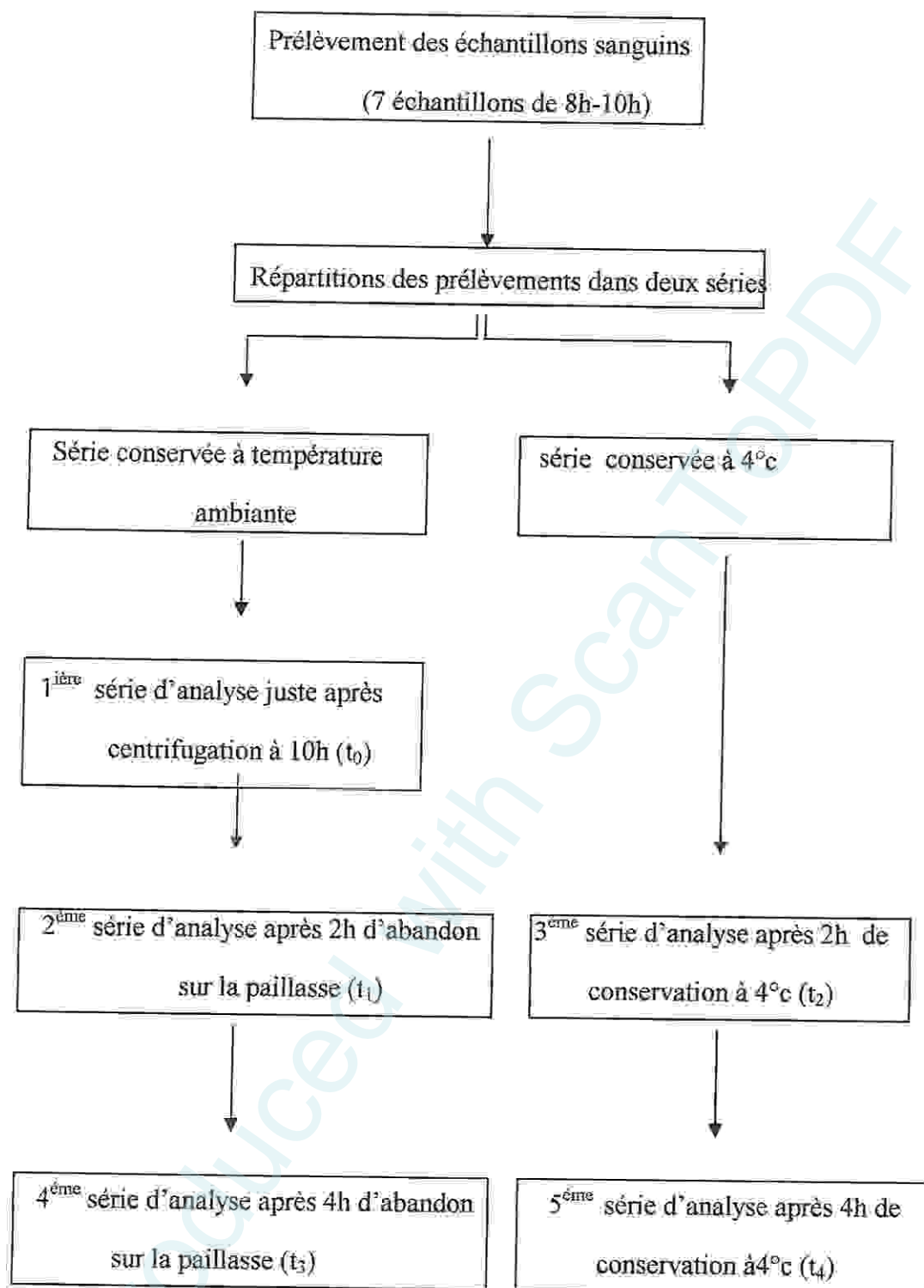


Fig5 : Protocole expérimentale

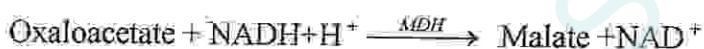
2.2. Analyses biochimiques

L'analyse biochimique consiste au dosage de l'activité enzymatique, alanine aminotransférase (ALT), aspartate aminotransférase (AST) et de la glycémie.

2.2.1. Aspartate-aminotransférase (AST)

a) Principe

L'aspartate-aminotransférase (AST), appelée aussi glutamate oxaloacétate (GOT) catalyse le transfert réversible du groupement amino de l'aspartate au α -cétoglutarate, en formant le glutamate et le l'oxaloacétate ; qui lui est réduit en malate. La concentration catalytique est déterminée, en utilisant la réaction couplée de la malate-déshydrogénase (MDH), à partir de la vitesse de disparition du NADH, mesuré à 340 nm.



R1	TRIS Ph 7.8	80 mmol/L
Tampon	L-Aspartate	200mmol/L
R2	NADH	0.18mmo/L
Substrat	Malate déshydrogénase	600U/L
	α -Cétoglutarate	12mmol/L

b) Caractéristiques diagnostiques

L'aspartate aminotransférase présente un taux d'activité élevé dans le cœur, les muscles squelettiques et le foie. L'AST sérique est généralement augmenté à la suite d'un infarctus du myocarde, d'une embolie pulmonaire, d'un traumatisme des muscles squelettiques, d'une cirrhose éthylique, ainsi que d'une hépatite virale ou médicamenteuse.

c) Méthode

Le dosage a été effectué sur le sérum du sang. Le réactif de travail a été préchauffé à la température de réaction et de l'instrument, ce dernier a été ajusté avec de l'eau distillé. 1ml de réactif de travail et 100 μ l de l'échantillon ont été pipeté dans une cuve

puis mixé, incubé pendant une minute. L'absorbance initial a été noté et de nouvelles lectures ont été effectuées chaque minute, pendant 3 minute. La différence entre les absorbances et l'accroissement moyen par minute ($\Delta A/\text{min}$) a été calculé.

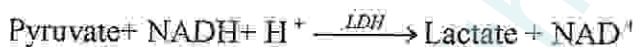
Calcul

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de ALT [spinreact, 2003]}$$

2.2.2 Alanine- aminotransférase(ALT)

a) Principe

Alanine aminotransférase(ALT), appelé aussi glutamate pyruvate transaminase (GPT) catalyse le transfert réversible de groupement amino de l'alanine au α -cétoglutarate, en formant du glutamate et du pyruvate ; qui lui est réduit en lactate par l'intermédiaire du lactate déshydrogénase (LDH) et du NADH. La vitesse de disparition du NADH est mesurée à 340 nm.



R1	TRIS pH 7.8	100 mmol/L
Tampon	L-Alanine	500mmol/L
R2	NADH	0.18mmo/L
Substrat	Lactate déshydrogénase (LDH)	1200U/L
	α -Cétoglutarate	15mmol/L

b) Caractéristiques diagnostiques

L'alanine aminotransférase présente un taux d'activité élevé dans le cœur, les muscles squelettiques et le foie. L'ALT sérique est généralement augmentée à la suite d'un infarctus du myocarde, d'une embolie pulmonaire, d'un traumatisme des muscles squelettiques, d'une cirrhose éthylique, ainsi que d'une hépatite virale ou médicamenteuse.

c) Méthode

Le dosage a été effectué sur le sérum du sang. Le réactif de travail a été préchauffé à la température de réaction et de l'instrument, ce dernier a été ajusté avec de l'eau distillé. 1ml de réactif de travail et 100µl de l'échantillon ont été pipeté dans une cuve puis mixé, incubé pendant une minute. L'absorbance initial a été noté et de nouvelles lectures ont été effectuées chaque minute, pendant 3 minute. La différence entre les absorbances et l'accroissement moyen par minute ($\Delta A/\text{min}$) a été calculé [Spinreact, 2003].

Calcul

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de ALT [spinreact, 2003]}$$

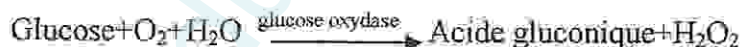
2.2.3. Glucose

a) Principe

La méthode utilisée pour le dosage du glucose sanguin est celle utilisant comme enzyme le glucose oxydase dite glucose PAP.

-Le D-glucose est transformé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène par la glucose oxydase.

-Le 4-aminoantipyrine, présent dans le réactif est oxydé par le peroxyde d'hydrogène, donnant ainsi naissance à un complexe stable de quinone de couleur rouge. La mesure de l'absorbance de la quinone se fait à 505nm.



Réactif 1 Solution tampon	Tampon tris pH=7 Phénol	100mmol /l 0.3mmol/l
Réactif 2 enzymes	Glucose oxydase péroxydase Amino 4-antipyrine	10000U/l 1000U/l 2.6mmol /l
Réactif 3 standard	glucose	100mg/dl 1g/l 5.56mmol /l

3. Méthodologie statistique

Le design de notre expérience est un design avec un facteur fixe de cinq niveaux (7 groupes) et 3 variables dépendantes qui sont les variables biochimiques TGO, TGP et GLY. Dans l'étude actuelle, on a adopté une analyse d'ANOVA ordinaire pour toutes les variables biochimiques. Dans le cas où les tests de Fisher d'ANOVA ont été significatifs on a procédé à des analyses post hoc pour détecter les différences bi variées par la voie d'une comparaison multiple de Tukey. Les analyses statistiques ont été effectuées par STATA 10 un logiciel répandu dans le domaine de la bio statistique et adopté principalement par la Harvard Medical School.

RÉSULTATS

ET

DISCUSSION

Processed with Scantopdf

Résultats et discussion

De nombreux échantillons sanguins analysés dans nos laboratoires sont prélevés et acheminés dans des durées, très variables. Peuvent aller jusqu'à 24 heures. Dans le cadre de la démarche qualité de nos laboratoires, et notamment le laboratoire d'analyses médicales EPSP Oued Zénati, nous avons voulu évaluer l'impact de la température et du délai avant centrifugation sur la stabilité des trois paramètres (TGO, TGP, GLY) au cours du bilan hépatique.

En effet ce travail a été conçu pour formuler une réponse à une question posée par un médecin qui a constaté que les bilans hépatiques de toutes les maladies d'un jour sont devenues pathologiques et lui a interrogé si vraiment toutes ces maladies sont issues d'un vrai problème hépatique ou s'il s'agit d'un problème d'acheminement de prélèvement au laboratoire ?

Les différentes variances statistiques pour TGO, TGP et GLY par groupe sont représentées dans le Tableau 1. Le test de Fisher pour l'hypothèse de différence moyenne de TGO est significative entre les 5 groupes a été non significatif (Tableau 1, Figure 6, $F(4, 30) = 0,433, p = 0,784 > 0,05$). Le test de Fisher pour l'hypothèse de différence moyenne TGP est significative entre les 5 groupes a été non significatif (Tableau 1, Figure 7, $F(4, 30) = 1,570, p = 0,208 > 0,05$). Le test de Fisher pour l'hypothèse de différence moyenne GLY est significative entre les groupes a été non significatif (Tableau 1, Figure 8, $F(4, 30) = 1,902, p = 0,136 > 0,05$).

Tableau 1: Analyses des variances des trios paramètres mesurés (TGO, TGP, GLY)

ANOVA

		Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
AST (U/L)	Inter-groupes	482.857	4	120.714	.433	.784
	Intra-groupes	8363.113	30	278.770		
	Total	8845.970	34			
ALT (U/L)	Inter-groupes	407.675	4	101.919	1.570	.208
	Intra-groupes	1947.733	30	64.924		
	Total	2355.408	34			
GLY (mg/dL)	Inter-groupes	.208	4	.052	1.902	.136
	Intra-groupes	.821	30	.027		
	Total	1.029	34			

Les résultats obtenus montrent une stabilité de moins de 4 heures de tous les paramètres à + 21°C (température ambiante du laboratoire). L'étude de [Foucher et al., 2005] montre des résultats proches malgré une interprétation statistique différente.

Concernant des variations de l'activité enzymatique des transaminases, l'analyse statistique a montré qu'il n'y a pas de différences significatives entre 5 mesures effectuées à des temps et des températures différentes, malgré, qu'à vue d'œil, de légères fluctuations ont été remarquées et expliquées par des erreurs de manipulation en autres dues à l'appareillage et au réactifs.

Tableau 2 : Les résultats de l'activité de la TGO à des temps et du température différents

TGO	T0	T1		T2	
		T amb	T 4°C	T amb	T 4°C
Echantillon1	11,47	20,39	20,70	23,38	25,95
Echantillon2	48,28	33,92	26,96	25,93	18,86
Echantillon3	67,43	44,74	31,81	41,12	34,04
Echantillon4	22,50	19,36	14,55	19,46	17,71
Echantillon5	15,51	20,72	12,43	18,45	17,80
Echantillon6	25,47	34,16	27,47	84,44	24,64
Echantillon7	35,48	39,56	52,66	46,06	53,15

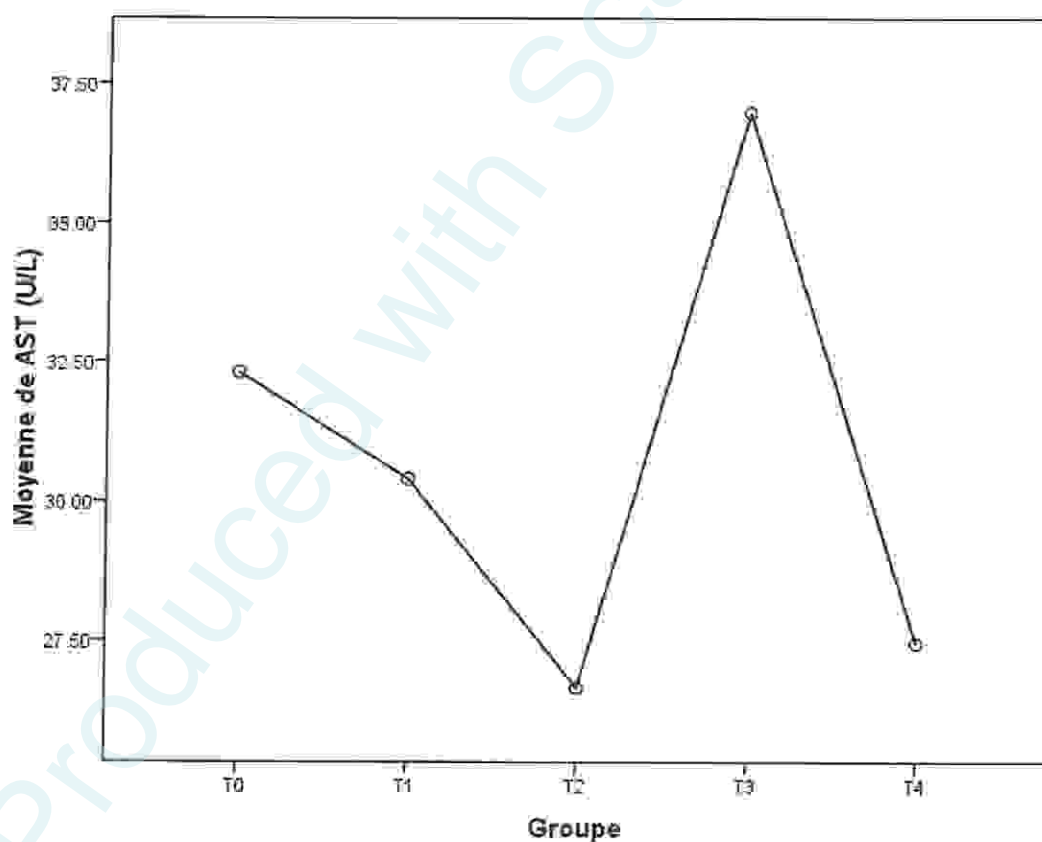


Fig6: variations sériques moyennes de l'activité enzymatique de TGO.

Tableau 3 : Les résultats de l'activité de la TGP à des temps et du température différents

TGP	T0	T1		T2	
		T amb	T 4°C	T amb	T 4°C
Echantillon1	22,37	20,03	19,00	25,38	19,35
Echantillon2	0,57	7,37	13,08	23,28	10,63
Echantillon3	29,56	15,87	21,94	12,17	11,74
Echantillon4	15,88	5,37	1,16	8,55	1,43
Echantillon5	10,56	11,19	21,18	7,55	8,82
Echantillon6	3,67	19,75	27,17	20,32	6,61
Echantillon7	7,82	2,17	23,02	16,29	0,07

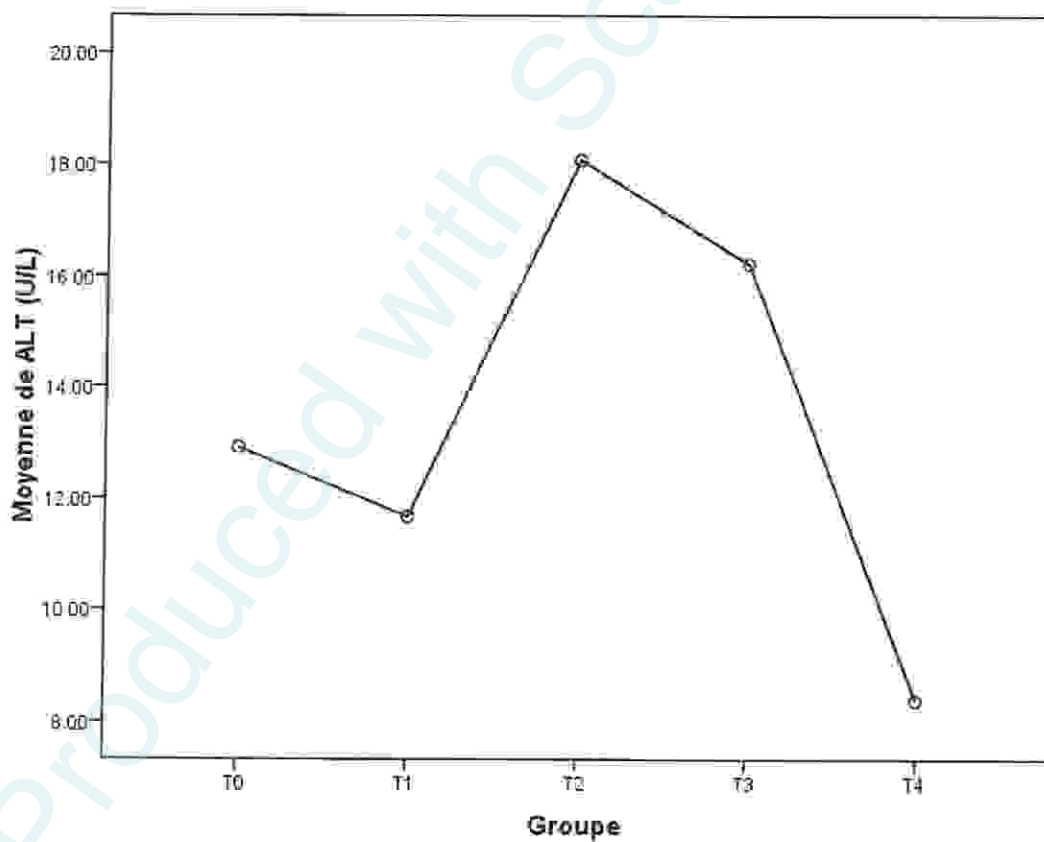


Fig 7: variations sériques moyennes de l'activité enzymatique de TGP

[Métais et al, 1999] expliquent que lorsque la température augmente, la protéine subit une dénaturation thermique. Il est donc important de contrôler avec précision la température pendant la période de contact entre l'enzyme et le substrat.

Les mêmes auteurs rapportent, que la température à laquelle débute l'inactivation thermique est variable d'une enzyme à l'autre. Dans un but de standardisation la Société Française de biologie clinique a proposé en 1974 de retenir la température de 30°C pour déterminer les activités enzymatiques en chimie clinique.

Dans leur étude produite sur la détermination des propriétés de la TGO d'E. Coli, [Chesne et Pelnont, 1974], ont démontré que la TGO est partiellement inactivée à température élevée (64°C).

Rappelons aussi que la température modifie la concentration en ions H^+ et donc le pH du milieu réactionnel, ce dernier constitue une condition optimale de l'activité enzymatique, donc par la variation de la température. Le pH de nos spécimens pourrait être changé, ce qui explique la stabilité de l'activité enzymatique des transaminases.

D'autre part, l'analyse statistique n'a signalé aucun effet des deux facteurs étudiés sur les valeurs de la glycémie.

Tableau 4 : Les résultats de l'activité de la GLY à des temps et du température différents

GLY	T0	T1		T2	
		T amb	T 4°C	T amb	T 4°C
Echantillon 1	0,89	0,70	0,81	0,69	0,78
Echantillon 2	1,09	0,92	0,98	0,84	0,89
Echantillon 3	0,63	0,56	0,63	0,41	0,49
Echantillon 4	1,06	0,84	0,89	0,77	0,84
Echantillon 5	1,17	1,12	1,08	0,96	0,89
Echantillon 6	0,88	0,71	0,84	0,66	0,79
Echantillon 7	0,84	0,71	0,79	0,65	0,74

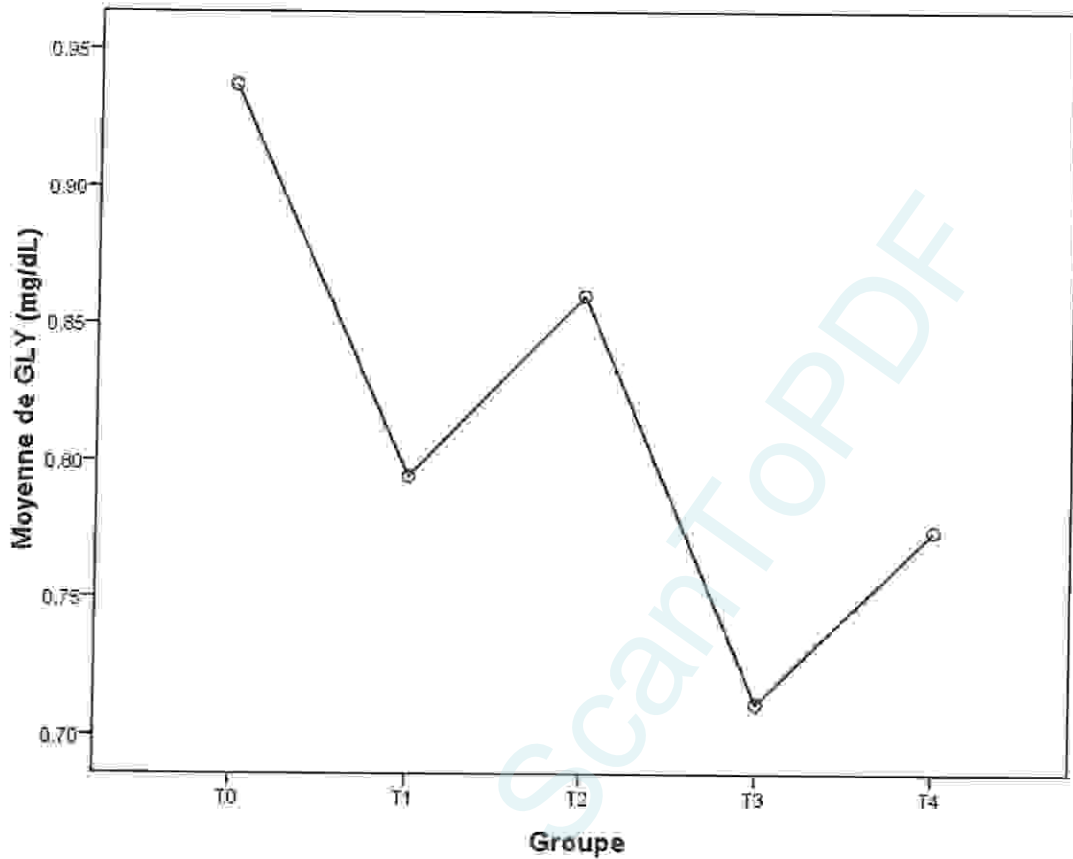


Figure 8: variations sériques moyennes du taux du glucose sanguin.

Néanmoins, le tableau 4 montrent des variations minimales dans les concentrations du glucose sanguin. Ces diminutions du taux de la glycémie peuvent être dues à la continuation des réactions enzymatiques du cycle de glycolyse qui se définit comme étant une série de réactions dégradant le glucose en deux molécules de pyruvate dans le cytosol de la cellule.

Et comme les différentes cellules sanguines n'ont pas été lysées ou séparées des tubes l'hypothèse que la voie glycolytique a persisté pendant le temps d'abandon de ces tubes sur la paillasse, est fort probable.

CONCLUSION

Produced with ScanTOPDF

Conclusion

Ce travail de recherche a été réalisé dans le but d'étudier l'effet du temps et de la température d'acheminement des prélèvements sanguins, au laboratoire, destinés pour la mesure de trois paramètres biochimiques du bilan hépatique.

L'analyse statique a montré que ces deux facteurs n'influençaient pas les résultats. Néanmoins, les résultats de cette étude montrent qu'il est préférable que le délai limité entre le prélèvement et les centrifugations demeure inférieur à 4h pour la détermination de ces paramètres courants en biochimie. Ce délai permet cependant de garantir la stabilité de ces trois paramètres mais (peut-être) pas d'autres.

Il est donc nécessaire de séparer les érythrocytes et les leucocytes du plasma dans l'heure qui suit le prélèvement et d'effectuer l'analyse juste après centrifugation. Mais si l'analyse ne peut être effectuée rapidement, il est nécessaire d'ajouter un agent antiglycolytique tel que le monoiodacétate de sodium (inhibiteurs de la glycolyse), de centrifuger les prélèvements et de conserver les sérums ou les plasmas décentrés à +4°C pour les analyser ultérieurement.

Produced with

Références bibliographiques

- Acques J.R., Poortmans. Et Boisseau .N. (2009) Biochimie des activités physiques et sportives. *Livre : français* : 126.
- Berthet .J., Costessec. A., Borcey. N.R., Rohitaker R. H., Brooker .C., Faller .A., Sprumont.P., Schünke.M., Gosling.J.A., Harris.P.F., Whitmore. I., Willan .P.L.T., Marieb.E .N., Moore.K.L., Dalley.A.F., Schmdt .R.F., Tortora.G.J., Grabowski. S.R., Weir.J.A. Et Brahams.P.H. (2006) Physiologies humaine. *De Boeck* : 489.
- Biomaghreb. (2008) Fiche technique de la glycémie.
- Bustin.A.M. (2008) Mieux réaliser les prises de sang pour s'assurer des résultats de qualité. *La revue de la médecine générale* 256 : 1-5.
- Chesne.S .ET Pelmont.J. (1974) Glutamate-oxaloacétate transaminase d'e-coli II-propriétés. *Biochimie*.56 (5) :631-639.
- Feldman .C. (2007) Bilan de la fonction hépatique du foie (en ligne). [[www. E -Santé .fr](http://www.E-Santé.fr).>maladie >hépatite] : 1-3.
- Foucher .B., Pina.G.,Prevosto.J.M.,Chaulet.J.F. ET Cheminel.V. (2005) Influence de la température et du délai avant centrifugation sur la stabilité de 28 paramètres de détermination courante en biochimie. *Ann biol clin* 63 (1) : 93-100
- Gyader D (2000) Cytolyse aiguë. *Encyclopédie médico-chirurgicale* 7.007.R.31 : 1-5.
- Helardot.D.,Berl.M.,Rebillon.M. Et Roussely.B.(2006)Guide concours infirmier (e) anesthésiste. *Masson* : 84.
- Hennen .G. (1996) Biochimie humaine. *De Boeck &larcier s.a* : 313-317.
- Marshall .W.J. Et Bangert .S.K. (2005) Biochimie médicale. *Elsevier* : 3-83.
- Mauris .A. Et Deom. A. (2003) Elément de pré analytique au cabint médicale.*CSCQ* : 51-2.
- Mauris .A. Et Deom. A. (2004) Elément de pré analytique au cabint médicale.*CSCQ* : 51-2.
- Métais.P., Agnray.J., Férard.G., Fruchart.J.C., Jardillier.J.C., Révol .A., Siest .G. Et Stahl .A (1990) Biochimie chimique. *Simep* : 19-20-151-158.
- Ouedraogo.G.A. (1986) Contribution à la connaissance des valeurs sérique des enzymes du zébu GOBRA (PAL, TGP, TGO, GGT etLDH). *Faculté de médecine et de pharmaciede Daker*. 16 ; 6 - 13.
- Panganet.C., Arlotto. M., Berger.F., De vos.J., Béné.M.C. Et Fest.T. (2007) les enjeux du pré analytique du transcriptome et du protéome sanguins. *médecine sciences*. 23(horssérie 1) : 13-17.

Petsko. D., Gregory.A., Ringe .D.ET Sanlaville .C. (2008) Structure et fonction des protéine. De bæck : 154.

Scoazec .J.Y. (2003) Physiologie du lobule hépatique. *Encyclopédie médico- chirurgicale 7-005-A-12* : 1-6.

Spinreact. (2003) Fiche technique de TGO.

Spinreact. (2003) Fiche technique de TGP.

Teeter .T. Et Prancise .A. (2004) Comment interpréter un rapport de laboratoire. *Fiche de renseignement hcsp hépatites C support projet (en ligne)* [www.he-Vadvocate.org]. 1-3.

Togni.G., Volken.C. ET Sabo.G. (2004) Spalering145I/147CH- 4002 Basal: 113-118.

Vaubourdolle .M. (2007) Biochimie hématologie .*wolters.Kluwer. s.a* : 102-105.

Produced with Scantopdf

ANNEXE

Produced with ScanTOPDF

Annexe

-Les tubes : secs et héparines.

-Centrifugeuse: rot fixe 32 A.

-Les réactifs.

- Les gants

-Portoir.

-Analyseur, spectrophotomètre avec cuve thermostatable à 30 ou 35 °C pour lecture à 340 nm.

- Cuve striée de 1.0 cm de trajet optique.

-Bain thermostaté à 37°C

-Analyseur, spectrophotomètre ou photomètre pour lectures à 500 ± 20 nm

Produced with ScanTOPDF

Abstract

The liver is the largest gland annexe of the digestive tract. Diagnosis of anomalies is larding from blood tests in a hepatic cheche-up .It refers to a set of anomalysis dinged to investigate the liver fonctions . A large amount of off -site blood sampling are analysed in our laboratory with a variable conveying time of up to 7 hours. Fifteen healthy volunteers were included in this stady.In the quality approch in our laboratries in particular the reflection on the preanalytical phase. The aim was to evaluate the stability of currant analyts in regard to the temperature and the time before centrifugation. Whole blood obtained bay venipuncture was collected into collector tubes transaminase respectiveluy withe heparinate for blood glucose determination. Blood glucose was mesured bay the method glucose oxydase. As for transaminases .indirect enzymatic method based on two couples reactions has been used .Statical analsis showed that these two factors did note influence the results.

On conclusion it showld be de not achieve assay fin a true of delivery exceeding 4 hours before centrifugation.

Key words: liver, hepatic cheche-up, preanalytic, temps, temperature, stability, transaminases, glycemie.

Produced with ScanTopdf

ملخص

الكبد هو أكبر غدد الجهاز الهضمي. يطرح التشخيص في اختبارات فحص الدم خطأ في وظائف الكبد. وهو نظام التحليل يهدف إلى دراسة وظائف الكبد.

تحليل الكثير من عينات الدم أخذت من المستشفى وتختلف أوقات الترانزيت. أردنا وكجزء من هذه العملية ، ونوعية المختبر وعلى وجه الخصوص أردنا النقاش حول الخطوة ما قبل التحليل، لتقييم تأثير درجة الحرارة والوقت قبل الطرد المركزي على استقرار المعلمات البيوكيميائية الثلاث الترانساميناسات والجلوكوز التوازن كبدي.

وقد أجريت هذه الدراسة على سبعة عينات الدم التي تم جمعها على أنابيب جافة لالترانساميناسات و أنابيب الهيبارين لمستوى السكر في الدم. وتم قياس نسبة الجلوكوز في الدم بواسطة الأسلوب الجلوكوز أكسيداز فيما يتعلق الترانساميناسات، وكانت تستخدم الطريقة غير المباشرة استنادا إلى اثنين من التفاعلات الأنزيمية كاملة. وأظهر التحليل الإحصائي أن هذين العاملين لم تؤثر على النتائج. وفي الختام، فإنه لا ينبغي قياس أداء الأوقات التسليم تتجاوز أربع ساعات قبل الطرد المركزي وأيضا كانت درجة حرارة التخزين. كلمات البحث : الكبد، الكبد، قبل التحليلية ، الوقت ، درجة الحرارة، الاستقرار ، الترانساميناسات ، السكر ، مستويات.