



République Algérienne Démocratique et Populaire
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Université Batna 2 - Mostefa Ben Boulaid

جامعة الشهيد مصطفى بن بولعيد – باتنة 2

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Biologie des Organismes

قسم بيولوجيا الكائنات الحية

Polycopie pédagogique

Travaux Pratique de Biochimie Clinique

Préparée par :
Dr. BENBIA Souheyla

Destiné aux étudiants: Master 1 Biologie et pathologie Cellulaire
Master 1 Biologie Moléculaire et Cellulaire

Année universitaire :2024 /2025

Avant-Propos

Ce document de Travaux Pratiques (TP) est un dispositif indispensable, conçu pour renforcer les acquis théoriques en Biochimie Clinique et les valoriser en compétences pratiques utiles des étudiant Master 1 en Biologie Moléculaire et cellulaire ,Biologie et pathologie Cellulaire et tous les étudiant dans le domaine médicale. La biochimie clinique est un domaine clef qui lie la biochimie fondamentale, la physiologie humaine et la pratique médical, présentant des ressources cruciaux pour le diagnostic, la suivi thérapeutique et la prévention des maladies.

L'objectif principal de ce document est d'améliorer la compréhension de la biochimie clinique e des étudiants d'une part et de préparer de manière efficace aux défis rencontrés dans les laboratoires d'analyses médicales ou dans les carrières de recherche d'autre part, grâce à une série de manipulations pratiques abordant les éléments essentiels de l'analyse biochimique. Cela permet de se perfectionner dans la manipulation d'échantillons biologiques, la réalisation de dosages par différentes techniques (colorimétriques, enzymatiques, spectrophotométriques), la maîtrise du matériel de laboratoire (spectrophotomètres, pipettes de précision) et surtout, l'analyse des résultats dans un cadre clinique approprié.

Chaque TP est organisé pour offrir une expérience éducative exhaustive : il comporte un récapitulatif des buts d'apprentissage, une présentation du concept des techniques, une liste minutieuse des outils et des agents chimiques, un guide de procédure expérimentale pas à pas, ainsi que des directives pour l'analyse des données et l'évaluation clinique des résultats.

Nous prôtons une démarche minutieuse et critique pour chaque protocole. La précision technique est essentielle, en particulier lors des phases de pipetage et de dilution, car elle influence directement la crédibilité des résultats. Plus qu'une simple mise en œuvre, ce module vise une connaissance approfondie des mécanismes sous-jacents et une capacité à établir un lien entre les observations de laboratoire et leurs implications physiopathologiques.

La sécurité dans le laboratoire est d'une importance primordiale. Il est impératif de suivre rigoureusement les directives de sécurité, y compris l'utilisation d'équipements de protection individuelle et la manipulation appropriée des produits chimiques et des échantillons biologiques.

Sommaire

TP N°1 Dosage du glucose.....	P1
TP N° 2 Détermination quantitative de cholestérol.....	P5
TP N°3 Dosage de cholestérol HDL/LDL.....	P8
TP N° 4 Dosage des Protéines par la Méthode de Bradford.....	P10
TP N° 5 Dosage de la calcémie.....	P13
TPN° 6 Analyse physique des Urines	P17
TP N°7 Analyse biochimique des urines	P19
TP N°8 Coloration de Masson Trichrome pour la Détection de la Fibrose	P24

TP N°1
Dosage du glucose

TP N°1
Dosage du glucose**I. Objectifs Pédagogiques**

- Comprendre le principe enzymatique de la méthode de Trinder (GOD-POD) pour le dosage du glucose ;
- Maîtriser les techniques de pipetage précis ;
- Utiliser un spectrophotomètre visible pour mesurer l'absorbance d'une solution colorée ;
- Construire et interpréter une courbe d'étalonnage à partir de solutions standards de glucose ;
- Calculer la concentration de glucose dans des échantillons inconnus (sérums/plasmas de patients simulés) en appliquant la Loi de Beer-Lambert.

II. Principe de la méthode

La méthode de Trinder est une technique enzymatique colorimétrique largement adoptée pour sa spécificité et sa sensibilité. Elle repose sur deux réactions couplées séquentielles :

Type de réaction	Substrat initial	Enzyme catalyseur	Résultats
Oxydation du glucose	Glucose	Glucose Oxydase (GOD)	Acide Gluconique+H ₂ O ₂
Réaction colorimétrique	H ₂ O ₂ + chromogène (4- aminoantipyrine et le phénol)	Peroxydase (POD)	Quinoneimine rouge- violette

L'intensité de la coloration rouge-violet est directement proportionnelle à la concentration initiale de glucose dans l'échantillon et est mesurée par spectrophotométrie à 500 nm.

III. Matériel

Gants de protection, blouse de laboratoire, lunettes de sécurité ;
Spectrophotomètre visible (avec cuvettes adaptées pour 500 nm) ;
Micropipettes + embouts jetables ;
Tubes à essai (verre ou plastique) ;
Vortex et Bain-marie

IV. Réactifs

Enzyme (R1) : Tampon phosphate, Glucose Oxydase (GOD), Peroxydase (POD) ;
Chromogène (R2) : 4-aminoantipyrine (4-AAP) et phénol.

glucose

Standard de Glucose (R3) : 1 g/l (5 mmol/l)

Échantillons : Sérums ou plasmas prélevés sur tube fluoré pour inhiber la glycolyse.

Eau distillée

V. Prélèvement et Conditions Pré-Analytiques

Échantillon	Conditions de jeûne	Conservation	Longueur d'onde	Tube
Sérum ou plasma	12 heures	A 4°C : 3 jours -20°C. : plus longtemps à	505nm	Fluorure oxalate

Après le prélèvement les tubes doivent être agités par retournement (5 fois)

VI. Protocole Expérimental**A. Préparation de la solution du travail**

Mélanger R1 +R2

Maintenir à 2-8°C

B. Préparation du Spectrophotomètre

1. Allumer le spectrophotomètre et le laisser préchauffer pendant au moins 15 minutes.
2. Sélectionner la longueur d'onde de lecture à 500-540 nm.

C. Dosage Avec un seul standard de référence (méthode 1)

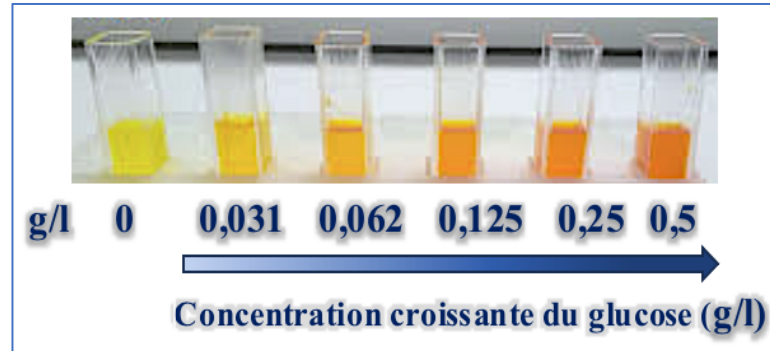
1. Identifier et étiqueter les tubes (Blanc (b), Standard (s), , serum (E1) comme suit
2. Pipeter 1000 ul de la solution du Travail dans chaque tube.
3. Ajouter ensuite 10 ul d'eau distillée, standard et serum dans le tube b, S, E1 respectivement
4. Changer d'embout de pipette entre chaque ajout pour éviter toute contamination croisée.
5. Mélanger doucement le contenu de chaque tube par vortexage rapide et bref ou par inversion. ;
6. Placer tous les tubes simultanément dans le bain-marie à 37°C pendant 10 minutes

D. Dosage avec une Gamme des dilution glucose (méthode 2)

1. Étiquetez soigneusement 8 tube (S0-S7)

glucose

2. Pipeter soigneusement les volumes correspondant à 0, 0,031, 0,062, 0,125, 0,25, 0,5 g/l de standard dans les tube (S0-S7), Le volume final de tous les échantillons doit être de 1ml.
4. Changer d'embout de pipette entre chaque ajout pour éviter toute contamination croisée.
3. Pipetez 10 µl de chaque dilution de standard et l'échantillon dans des tube a essais préalablement étiquetés ;
1. Ajoutez 1 ml de la solution du travail aux tubes préparés;
2. Mélangez bien et incubez pendant 10 minutes à 37°C ;
3. Verser les solutions dans des cuvette ;
4. Mesurez l'absorbance à 500 nm;
5. Tracez la courbe d'étalonnage pour le standard.



C. Lecture Spectrophotométrique

1. À la fin de l'incubation, retirer les tubes du bain-marie ;
2. Transférer le contenu de chaque tube dans cuvette sèche et propre ;
3. Placer la cuvette contenant le Blanc dans le compartiment du spectrophotomètre et ajuster l'absorbance à zéro ;
4. Mesurer l'absorbance de la cuvette contenant le Standard ;
5. Mesurer l'absorbance de chaque Échantillon ;
6. Noter chaque valeur avec précision.

***NB:** pour éviter la dégradation de la couleur les lectures doivent être faites dans les 30 minutes suivant l'incubation.*

VII. Calcul des Résultats

Pour la méthode d'étalonnage : Calculez la concentration en glucose des échantillons testés en comparant la densité optique de l'échantillon avec la courbes standard.

Pour la méthode directe :

$$[\text{Glucose}] \text{ (g/l)} = \frac{\text{Abs (Échantillon)}}{\text{Abs (standard)}} \times \text{Conc (standard)}$$

VIII. Interprétation des résultats

Normale : < 1.00 g/L (< 5.6 mmol/L)

glucose

Prédiabète : 1.00 - 1.25 g/L (5.6 - 6.9 mmol/L)

Diabète : ≥ 1.26 g/L (≥ 7.0 mmol/L) (diagnostic posé sur deux valeurs)

Compte rendu

Compléter le tableau de mesure

Tracer la courbe d'étalonnage de glucose $A = f(C)$

N° tube	S0 (Blanc)	S1	S2	S3	S4	S5	E
Dilution							
Concentration finale (g/L)	0	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031	
Volume de standard (µl)	0	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031	
Eau distillée (q.s.p 1 ml)	1	0.5	0.75	0.875	0.938	0.969	
volume d'Échantillon (ml)							1
Solution du travail (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Absorbance à 500 nm							

Reference

Lott JA, Turner K. Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. Clin Chem. 1975 Nov;21(12):1754-60. PMID: 1237363.

Nakrani MN, Wineland RH, Anjum F. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): Jul 17, 2023. Physiology, Glucose Metabolism.

Shaker G, Zubair M. Peroxidase-Coupled Glucose Method. [Updated 2025 Jun 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK594277/>

TP N° 2

Détermination quantitative de cholestérol (Méthode Enzymatique Colorimétrique)

total

TP N° 2

Détermination quantitative de cholestérol total

I. Objectifs Pédagogiques

- Comprendre la séquence des réactions enzymatiques
- Maîtriser le pipetage de précision
- Maîtriser la manipulation correcte des cuvettes et du spectrophotomètre
- Réaliser le "blanc" pour ajuster l'absorbance à zéro
- Calculer la concentration de cholestérol total
- Interpréter les résultats du cholestérol total dans un contexte clinique
- Identifier les facteurs pré-analytiques et les interférences

II. Principe de la méthode

La méthode de dosage la plus courante et la plus spécifique pour le cholestérol total est la méthode enzymatique colorimétrique (souvent appelée CHOD-PAP)pour Cholestérol Oxydase - Peroxydase couplée à un chromogène).

Type de réaction	Substrat initial	Enzyme catalyseur	Résultats
Hydrolyse des esters de cholestérol	Esters de cholestérol	Cholestérol Estérase	Cholestérol libre et acides gras
Oxydation du cholestérol libre	Cholestérol libre	Cholestérol Oxydase	Peroxyde d'hydrogène
Réaction colorimétrique	Peroxyde d'hydrogène + chromogène	Peroxydase (POD)	Quinoneimine rouge-violette

III. Réactifs

Enzyme (R1) : Cholestérol estérase , Cholestérol oxydase, Peroxydase (POD), 4 – aminophénazone (4-AF) ;

Tampon (R 2) et Eau distillée

IV. Matériel

Gants de protection, blouse de laboratoire, lunettes de sécurité

Spectrophotomètre visible ;

total

Micropipettes + embouts jetables ;

Tubes à essai (verre ou plastique) ;

Vortex et Bain-marie.

V. Prélèvement et Conditions Pré-Analytiques

Échantillon	Conditions de jeûne	Conservation	Longueur d'onde	Tube
Sérum ou plasma	9 à 12 heures	A 4°C : 4 à 7 jours -20°C. : plus longtemps	505 nm	Heparine/sec avec gel

VI. Préparation du Spectrophotomètre

1. Allumer le spectrophotomètre et le laisser préchauffer pendant au moins 15 minutes ;
2. Sélectionner la longueur d'onde de lecture à 500 nm ;
3. Régler le spectrophotomètre sur zéro en utilisant l'eau distillée.

VII. Préparation des Tubes de Réaction

1. Identifier et étiqueter les tubes (Blanc (b), Standard (s), , serum (E1) comme suit
2. Pipeter 1000 ul de Réactif de Travail (R1+R2) dans chaque tube ;
3. Ajouter ensuite 10 ul d'eau distillée, standard et serum dans le tube B S E1 respectivement ;
4. Changer d'embout de pipette entre chaque ajout pour éviter toute contamination croisée ;
5. Mélanger doucement le contenu de chaque tube par vortexage rapide et bref ou par inversion ;
7. Placer tous les tubes simultanément dans le bain-marie à 37°C pendant 5 minutes ;
8. Lire l'absorption (A) du standard et l'échantillon ;

VIII. Calcul des Résultats

$$[\text{Cho t}] \text{ (mg/l)} = \frac{\text{Abs (Échantillon)}}{\text{Abs (standard)}} \times \text{Conc (standard)}$$

Facteur de conversion: mg/dL x 0,0258 = mmol/L.

Valeurs de reference

Normal : Moins de 200 mg/dL

Modéré : 200-239 mg/dL

total

Elevé : ≥ 240

Références

Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin Chem. 1974 Apr;20(4):470-5. PMID: 4818200.

Lie RF, Schmitz JM, Pierre KJ, Gochman N. Cholesterol oxidase-based determination, by continuous-flow analysis, of total and free cholesterol in serum. Clin Chem. 1976 Oct;22(10):1627-30. PMID: 975508.

Siedel J, Hägele EO, Ziegenhorn J, Wahlefeld AW. Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency. Clin Chem. 1983 Jun;29(6):1075-80. PMID: 6851096.

TP N°3
Dosage de cholestérol HDL/LDL

HDL/LDL**TP N°3
Dosage de cholestérol HDL/LDL****I. Reactifs**

Enzymes (R1) : Cholestérol estérase , Cholestérol oxydase, Peroxydase (POD), 4 -

Aminophénazone (4-AF)

Tampon (R 2) et l'eau distillée

Réactif de précipitation de cholestérol LDL (a base de polyéthylène glycol)

Standard cholestérol

II. Matériel

Gants de protection, blouse de laboratoire, lunettes de sécurité ;

Spectrophotomètre visible (avec cuvettes adaptées pour 505 nm) ;

Micropipettes + embouts jetables ;

Tubes à essai (verre ou plastique) ;

Vortex et Bain-marie .

III. Protocol expérimental**A. Préparation du surnageant**

1. Dans un tube a essais mélanger un volume de sérum (500 ul) avec un volume de réactif de précipitation de cholestérol (50ul) ;
2. Incuber pendant 10 min à 37°C ;
3. Centrifuger 15 min à 5000 t/min ;
4. Récupérer le surnagent .

B. Dosage de cho-HDL

1. Pipeter 1 mL de solution de travail dans des tube a essais étiquetés (blan (b), standard (S) et échantillon (E) ;
2. Ajouter 10 ul d'eau distillée, standard et surnageant dans le tube b, S, E respectivement ;
3. Changer d'embout de pipette entre chaque ajout pour éviter toute contamination croisée ;
4. Mélanger doucement le contenu de chaque tube par vortex ou par inversion ;
5. Placer tous les tubes simultanément dans le bain-marie à 37°C pendant 5 minutes ;
6. Lire l'absorption (A) du standard et l'échantillon ;

C. Calcul de cholestérol-LDL-cholestérol (la méthode de Friedewald)

HDL/LDL

$LDLc = \text{Cholestérol total} - HDLc - (TG/5)$

NB : Lorsque le taux de triglycérides dépasse 3,9 mmol/L, la formule de Friedewald ne peut être utilisée.

IV. Calcul des Résultats

Concentration de cho-HDL (mg/l) = Abs (Échantillon) / Abs (standard)) X Conc (standard)

1. Valeurs de références cholestérol HDL

Risque	Homme	Femme
Faible	> 55 mg/dL	> 65 mg/dL
Modéré	40 - 55 mg/dL	45 - 65 mg/dL
Élevé	< 40 mg/dL	< 45 mg/dL

2. Valeurs de références cholestérol LDL

Valeurs suspectes	150 mg/dL
Valeur élevées	190 mg/dL

Références

Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, Bachmann LM, Caudill SP, Dziekonski A, Edwards S, Kimberly MM, Korzun WJ, Leary ET, Nakajima K, Nakamura M, Nilsson G, Shamburek RD, Vetrovec GW, Warnick GR, Remaley AT. Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures. Clin Chem. 2010 Jun;56(6):977-86. doi: 10.1373/clinchem.2009.142810. Epub 2010 Apr 8. PMID: 20378768; PMCID: PMC4687457.

Martins J, Steyn N, Rossouw HM, Pillay TS. Best practice for LDL-cholesterol: when and how to calculate. J Clin Pathol. 2023 Mar;76(3):145-152. Doi: 10.1136/jcp-2022-208480. Epub 2023 Jan 17. PMID: 36650044.

Ćwiklińska A, Wiczorek E, Gliwińska A, Marcinkowska M, Czaplińska M, Mickiewicz A, Kuchta A, Kortas-Stempak B, Gruchala M, Dębska-Ślizień A, Król E, Jankowski M. Non-HDL-C/TG ratio indicates significant underestimation of calculated low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) better than TG level: a study on the reliability of mathematical formulas used for LDL-C estimation. Clin Chem Lab Med. 2020 Dec 24;59(5):857-867. doi: 10.1515/cclm-2020-1366. PMID: 33554544.

HDL/LDL

TP N° 4
Dosage des Protéines par la Méthode de
Bradford

TP N° 4**Dosage des Protéines par la Méthode de Bradford****I. Objectifs Pédagogiques**

- Comprendre le principe de la méthode de Bradford ;
- Préparer une gamme de dilution d'Albumine de Sérum Bovin (BSA) ;
- Construire et interpréter une courbe d'étalonnage ;
- Calculer la concentration de protéines totales.

II. Principe

La méthode de Bradford est une approche quantitative pour l'analyse des protéines, qui repose sur la fixation d'un colorant, le bleu de Coomassie, à un échantillon protéique. Elle consiste ensuite à comparer cette liaison à une courbe standard produite par la réaction d'échantillons contenant des quantités connues d'une protéine standard, souvent l'albumine de sérum bovin (BSA). la longueur d'onde maximale d'absorption est lue à 595 nm.

III. Matériel

Gants de protection, blouse de laboratoire, lunettes de sécurité ;

Échantillons (sérum, plasma, homogénat tissulaire).

Spectrophotomètre visible ; Cuvettes en verre ou en plastique ;

Micropipettes + embouts cône bleu et jaune ;

Tubes à essai , Vortex et Papier Whatman

IV. Réactifs

Bleu de Coomassie G-250.

Éthanol à 95%

Acide phosphorique à 85%

Standard de Protéine : Albumine de Sérum Bovin (BSA) de concentration connue (ex: 1 mg/ml).

Eau distillée .

V. Prélèvement et Conditions Pré-Analytiques

Échantillon	jeûne	Conservation	Longueur d'onde	Tube
-------------	-------	--------------	-----------------	------

Bradford

Sérum ou plasma	10 à 12h	A 4°C : 7jours	595nm	Hépariné/Sec avec gel
-----------------	----------	----------------	-------	-----------------------

Après le prélèvement les tubes doivent être agités par retournement (5- 8 fois)

VI. Protocol expérimental**A. Préparation de réactif de Bradford**

1. Dissoudre (5 mg) de bleu de Coomassie G-250 dans 2.5 ml d'éthanol.
2. Ajouter 5ml d'acide phosphorique à la solution.
3. Ajouter une qsp d'eau à 50 ml.
4. Filtrer la solution.
5. Conserver la solution au réfrigérateur entre +4 °C à l'abri de lumière.

B. Préparation de la Gamme des dilution BSA

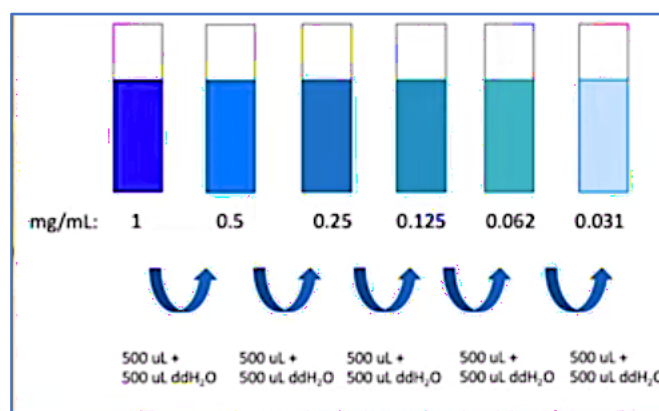
1. Étiquetez soigneusement 6 tubes (S0-S6 pour BSA)
2. Pipeter soigneusement les volumes correspondant à 0, 0,031, 0,062, 0,125, 0,25, 0,5 mg/ml de BSA dans les tubes (S0-S7),
3. Le volume final de tous les échantillons doit être de 1ml.
4. Pipetez 20 µl de chaque dilution de BSA et l'échantillon dans des tubes étiquetés ;

C. Développement de la Couleur

1. Ajoutez 1 ml de réactif Bradford préalablement dilué (1/5) aux dilutions préparées
2. Mélangez bien et incubez pendant 5 minutes à température ambiante.
3. Verser les solutions dans des cuvettes ;
4. Mesurez l'absorbance à 595 nm pour chaque échantillon,
5. Tracez la courbe d'étalonnage pour le standard (BSA) ;
6. Calculez la concentration en protéines des échantillons testés en comparant la densité optique à 595 avec la courbe standard.

NB : *Il est important que les échantillons à tester soient manipulés de la même manière que les échantillons utilisés pour générer les courbes standard.*

Bradford



rendu

Compléter le

Tracer la

BSA $A = f(C)$

VII. Compte

tableau de mesure

courbe d'étalonnage de

N° tube	S0 (Blanc)	S1	S2	S3	S4	S5	E
Dilution							
Concentration finale (mg/mL)	0	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031	
Volume de BSA (µl)	0	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031	
Eau distillée (q.s.p 1 ml)	1	0.5	0.75	0.875	0.938	0.969	
volume d'Échantillon (ml)							1
Réactif de Bradford (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Absorbance à 595nm							

Références

Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Bradford Assay for Determining Protein Concentration. Cold Spring Harb Protoc. 2020 Apr 1;2020(4):102269. doi: 10.1101/pdb.prot102269. PMID: 32238597.

Hammond JB and Kruger NJ. The bradford method for protein quantitation. Methods Mol Biol. 1988;3:25-32. doi: 10.1385/0-89603-126-8:25. PMID: 21400151.

Bradford

Rouhollah Valipour Nouroozi, Mouloud Valipour Noroozi , Masoumeh Ahmadizadeh.
Determination of Protein Concentration Using Bradford Microplate ProteinQuantification Assay.
nternational Electronic Journal of Medicine. 2015 Autumn; 4(1).

TP N° 5

Dosage de la calcémie

TP N° 5 Dosage de calcium

I. Objectifs Pédagogiques

- Maîtriser le principe du dosage colorimétrique du calcium ;
- Préparer une gamme de solutions standards de calcium pour l'étalonnage ;
- Construire et interpréter une courbe d'étalonnage ;
- Calculer la concentration de calcium dans des échantillons sériques inconnus.

II. Principe

Le dosage colorimétrique du calcium sérique repose sur la formation d'un complexe coloré (rouge violet-violet) entre les ions calcium de l'échantillon et un chromogène (colorant) spécifique, en présence d'un agent chélatant et d'un tampon. La méthode la plus courante utilise l'o-crésolphtaléine complexone (OCPC). L'absorbance du complexe coloré est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde caractéristique, généralement entre 570 -660 nm.

Type de réaction	Substrat initial	Chélateur	Résultats
Réaction colorimétrique	Ca ²⁺ OCPC	8-Hydroxyquinoline + pH alcalin (10.6)	Ca ²⁺ -OCPC rouge-violette

III. Matériel

Échantillons (sérum, plasma, homogénat tissulaire) ;
 Gants de protection, blouse de laboratoire, lunettes de sécurité ;
 Spectrophotomètre visible ;
 Cuvettes en verre ou en plastique ;
 Micropipettes + embouts cône bleu et jaune ;
 Tubes à essai et Vortex.

IV. Réactifs

Solution Tampon alcaline : 2-Amino-2-méthyl 1-Propanol
 Chromogène : l'o-crésolphtaléine complexone (OCPC)
 Agent chélateur: 8-hydroxyquinoléine .
 Eau distillée .

calcium

V. Prélèvement et Conditions Pré-Analytiques

Échantillon	Conditions de jeûne	Conservation	Longueur d'onde	Tube
Sérum ou plasma	Préférable (4h -12h)	Serum T°A : 7jours A 4°C : 10 jours -20°C. : plus 1 mois	570nm	Sec / hépariné

Après le prélèvement les tubes doivent être agités par retournement (5- 8 fois)

V. Protocol expérimental

1. Préparation de la solution de travail

Mélanger 1 volume du tampon avec 1 volume du Chromogène.

2. Préparation du Spectrophotomètre

1. Allumez l'appareil et laissez-le préchauffer (au moins 15 minutes),
2. Sélectionnez la longueur d'onde de mesure à 570 ou 578 nm (vérifier la notice du kit).

3. Préparation de la Gamme des dilution de calcium

1. Étiquetez soigneusement 6 tube (S0-S6)
2. Pipeter soigneusement les volumes correspondant à 0, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5mg/dl de chlorure de calcium dans les tube (S0-S6),
3. Le volume final de tous les échantillons doit être de 1ml.
4. Pipetez 20 µl de chaque dilution de standard et l'échantillon dans des tube étiquetés ;.

4. Développement de la Couleur

1. Ajoutez 1 ml de la solution de travail aux dilution préparées ;
2. Mélangez bien et incubez pendant 5 minutes à température ambiante ;
3. Verser les solutions dans des cuvette ;
4. Mesurez l'absorbance à 570 (550_590) nm pour chaque échantillon ;
5. Tracez la courbe d'étalonnage pour le standard (chlorure de calcium) ;

calcium

6. Affichez l'équation de la droite ($Y=aX+b$) et le coefficient de détermination (R^2) sur le graphique ;
7. Utilisez l'équation de la droite d'étalonnage pour déterminer sa concentration de calcium.

$\text{Concentration de Ca } 2+ \text{ (mg/dL)} = \text{Absorbance de l' échantillon} - b/a$
--

5. Méthode standard

Si un seul standard utilisé en routine, la calcémie est calculée comme suit :

$$\text{Concentration de Ca } 2+ \text{ (mg/dL)} = (\text{Abs (Échantillon)} / \text{Abs (standard)}) \times \text{Conc (standard)}$$

NB : Si la concentration est élevée, diluer l'échantillon au 1/2 par du NaCl à 9 g/l. Multiplier le résultat par  2.

VI. Interprétation des Résultats

	Calcémie (mg/dl)	Calcémie (mmol/l)
Nouveau-nés	7.5 - 12	1.87 - 3
Enfants	10 - 11	2.50 - 2.74
Adultes	9.0 - 10.6	2.25 - 2.65

VII. Calcul de la calcémie corrigée (basée sur la protidémie)

$\text{Calcémie corrigée} = \text{calcémie totale} / [0,55 + (\text{protidémie}/160)].$

A. Interprétation de la calcémie corrigée

Hypercalcémie (>2,20 mmol/l)	Hypocalcémie (< 2,20 mmol/l)	Valeur de référence (mmol/l)
Hyperparathyroïdie,	Carence en vitamine,	2,20 - 2,60
Ostéoporose, Excès de vitamine	Hypoparathyroïdie, Pancréatite,	
D, atteinte rénale	Carence en magnésium	

$$\text{Unité de conversion : mg/dl} \times 0.25 = \text{mmol/l}.$$

VIII. Compte rendu

Compléter les tableau de dosage de calcémie par courbe d'étalonnage et directe

calcium

- Méthode de dosage de calcium par un seul standar

N° tube	S0 (Blanc)	S	E
Standard (ul)		20	
Échantillon (ul)			20
Solution de travail (ml)	1	1	1
Absorbance à 570nm			

- Méthode de dosage de calcium par gamme d'étalonnage

N° tube	S0 (Blanc)	S1	S2	S3	S4	S5	E
Dilution							
Concentration finale (mg/mL)	0	5	2.5	1.25	0.62	0.31	
Volume de stanadr (µl)							
Eau distillée (q.s.p 1 ml)	1	0.5	0.75	0.875	0.938	0.969	
volume d'Échantillon (ml)							20ul
standard (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Absorbance à 570nm							

Références

Mir AA, Goyal B, Datta SK, Ikkurthi S, Pal A. Comparison Between Measured and Calculated Free Calcium Values at Different Serum Albumin Concentrations. J Lab Physicians. 2016 Jul-Dec;8(2):71-6. doi: 10.4103/0974-2727.180785. PMID: 27365914; PMCID: PMC4866387.

calcium

Thomas L, ed. Clinical Laboratory Diagnostics Use and Assessment of Clinical Laboratory Results, 1st ed. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998:231-241.

Alhenc-Gelas, M., Ouahabi, S., Bachmeyer, C., Bappe, P., Grateau, G., Lefevre, G., Letavernier, E., & Steichen, O. (2018). Calcémie totale et calcémie corrigée par l'albumine ou les protéines totales : valeur diagnostique chez les patients hospitalisés en médecine interne. La Revue De Médecine Interne, 39, A88. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2018.10.359>

TPN° 6
Analyse physique des Urines

Urines**TPN° 6
Analyse physique des Urines****I. Objectifs Pédagogiques**

- Comprendre l'importance clinique de l'analyse physique des urines ;
- Maîtriser les techniques de mesure des caractéristiques physiques des urines (volume, aspect, couleur, odeur).

II. Matériel

Matériel de protection individuelle : Gants, blouse, lunettes de sécurité ;

Rats ;

Cage métaboliques ;

Récipients de collecte d'urine (propres et secs) ;

Pots gradué avec couvercles en plastique.

III. Protocole expérimentale**A. Protocole de Collecte des Urines de 24h**

1. Placez un récipient de collecte propre sous l'entonnoir de la cage métabolique ;
2. Notez l'heure exacte de début de la collecte ;
3. Retirez le récipient de la collecte à l'heure exacte de la fin de la période de 24 heures .

B. Mesure de volume des urines

1. Homogénéisez délicatement le contenu du récipient de collecte ;
2. Mesurez le volume total d'urine collectée dans chaque récipient gradué ;
3. Notez ce volume (ml) avec précision sur une feuille de suivi ;

C. Interprétation des résultats

Urines

Paramètre	Signification clinique	Normes
Volume	Oligurie (200 à 500 ml): insuffisance cardiaque, lithiase, forte fièvre, trouble gastro entérique, insuffisance rénale aiguë, AINS Anurie : obstruction urétérale bilatérale, insuffisance rénale aiguë Polyurie (> 3L) : diabète insipide, polydipsie psychogène, diabète sucré	1-1.5l/24h
Couleur	Décoloré/ transparent : hyperhydratation Brune : Bilirubinurie Jaune verdâtre : Biliverdine, oxydation de bilirubine Rouge /rose : Hématurie, alimentaire Bleu/ vert : médicament ou alimentaire Jaune foncée à Orange : déshydratation	Jaune translucide
Transparence	Opaque /turbidité : infection urinaire, prostatite, pyélonéphrite Lactescent : chylurie	Transparent et limpide
Odeur	Ammoniac : infection urinaire ; cystite Sucrée / fruité : cétonurie, problèmes liés au diabète	

Références

- Mewara, N. K. L. B., Soni, K. M. P., Swami, S. P. N., & Sharma, G. (2022). Urine search in three components or examinations: physical, chemical and microscopical. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 11(11), 145–163. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2022.1111.019>
- Ridley, J. W. (2018). Elements involved in the physical evaluation of urine. In Springer eBooks (pp. 143–175). https://doi.org/10.1007/978-3-319-78417-5_8
- Skrajnowska, D., & Bobrowska-Korczak, B. (2024). The effects of diet, dietary supplements, drugs and exercise on physical, diagnostic values of urine characteristics. *Nutrients*, 16(18), 3141. <https://doi.org/10.3390/nu16183141>

TP N°7

Analyse biochimique des urines

Urines**TP N°7**
Analyse biochimique des urines**I. Objectifs Pédagogiques**

- Comprendre l'importance clinique de l'analyse physico-chimique des urines ;
- Maîtriser les techniques de mesure des caractéristiques biochimiques des urines (pH, glucosurie, protéinurie, densité, hématurie, bilirubinémie, , leucocyturie, Nitriturie, urobilinogène) ;
- Appliquer la technique de la bandelette urinaire pour la détection semi-quantitative de plusieurs paramètres chimiques

II. Principes

- 1. pH urinaire :** Les ions H^+ des urine interagissent avec un indicateur de couleur (Rouge de méthyle /Bleu de bromothymol) pour générer une couleur spécifique.
- 2. Glucosurie :** le glucose urinaire réagit avec deux enzymes, la glucose oxydase et la peroxydase, présentes sur la bandelette pour générer une couleur spécifique.(réaction enzymatique colorimétrique) ;
- 3. Protéinurie :** basé sur le contact entre les protéines (albumine) et l'indicateur coloré(bleu de tétrabromophenol ou rouge de pyrogallol), génère une libération d'ions hydrogènes, ce qui entraîne un changement de coloration
- 5. Corps cétoniques :** l'acide acétoacétique réagit avec les nitroprussiates pour produire un changement de couleur, allant du rose pâle pour les résultats négatifs au rose foncé ou violet pour le résultats positifs. Ce test est moins sensible pour l'acétone et ne détecte plus l'acide bêtahydroxybutyrique.
- 6. Sang:** Ce test est basé sur l'activité pseudo-péroxydase de l'hémoglobine, myoglobine qui catalyse la réaction de peroxyde et un chromogène présent sur les bandelette. La couleur qui en résulte vire de point orange au vert au bleu foncé.
- 7. Leucocyturie :** Ce test est basé l'hydrolyse de l'ester d'indoxyle par l'estérase granulocytaire. L'indoxyle libéré réagit avec chromogène (sel de Diazonium) ce qui induit un changement de coloration (violette)
- 8. Nitrite:** Ce test est basé sur l'interaction de nitrite (produit sous l'action de bactéries à Gram négative dans les urine) avec l'acide p-arsanilique pour former un composé diazonium.

Urines

Ce composé à son tour se couple avec 1 N-(1-naphthyl)-éthylènediamine pour générer une couleur rose.

9. Densité urinaire : mesure la concentration ionique de l'urine.

10. Bilirubine: Ce test dépend de la réaction de la bilirubine avec le DCA (dichloroaniline diazoté) pour former un azocomposé de couleur rouge.

11. Urobilinogène: Ce test est basé sur une réaction entre l'acide urobilinogène et le DMAB(4-diméthylaminobenzaldéhyde dans un milieu fortement acide pour former une couleur rose.

III. Matériel

Récipients de collecte d'urine (propres et secs) ;

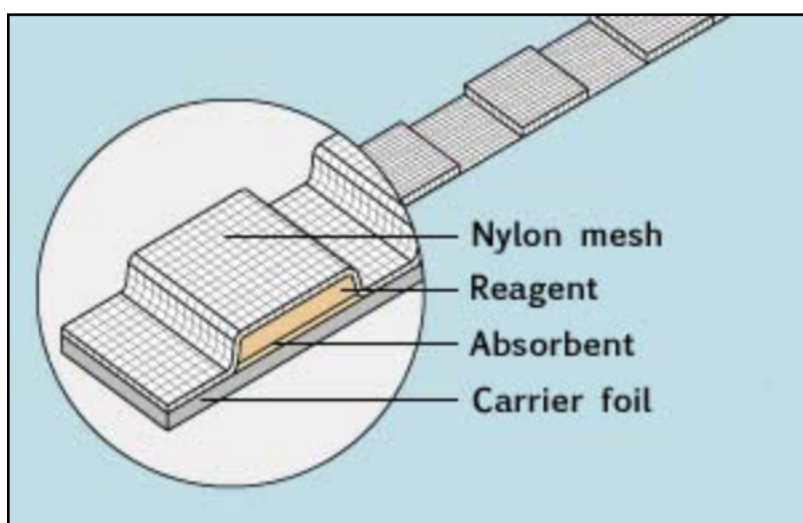
Bandelettes urinaires multi-paramètres ;

Pipettes / seringue jetable ;

Tubes à essai ;

Pots gradué avec couvercles en plastique ;

Matériel de protection individuelle : Gants, blouse, lunettes de sécurité.



Coupe d'une bandelette chimie des urine

IV. Protocol expérimentale

1. Aliquotez une quantité suffisante d'urine fraîche dans un tube à essais propre ;

Urines

2. Trempez la bandelette dans le tube à essais pendant 1 seconde max ;
3. Égoutter rapidement la bandelette à l'aide d'un papier essuis tout ;
4. Laissez agir 60 min : pour la lecture de : pH , nitrites, le glucose les protéines ;
l'urobilinogène, les corps cétoniques, , le sang et la bilirubine ;
5. Laissez agir 120 sec pour la lecture des leucocytes ;
6. Comparez les couleurs obtenues avec celles de l'échelle fournie sur la boîte.

TESTS	TEST RESULT
Compensation area Área de compensación Surface de compensation Kompensationsfeld Área de compensação Zona di compensazione	
Urobilinogen / Urobilinógeno/ Urobilinogène / Urobilinogen/ Urobilinogénio / Urobilinogeno	 0.1 (Normal) → 1(16) 2(33) 4(66) 8(131) $\mu\text{g/dl}$ ($\mu\text{mol/L}$)
Glucose / Glucosa / Glucose/ Glukose / Glucose / Glucosio	 neg. ± 100(5.5) +250(14) ++500(28) +++1000(55) mg/dl (mmol/L)
Bilirubin / Bilirrubina/ Bilirubine / Bilirubin/ Bilirrubina / Bilirubina	 neg. +9 ++17 +++ 50 $\mu\text{mol/L}$
Ketones / Cetonas/ Corps cétoniques / Keton/ Cetonas / Corpi chetonici	 neg. ± 5(0.5) +15(1.5) ++40(3.9) +++100(10) mg/dl (mmol/L)
Specific gravity / Densidad/ Densité spécifique/ Spezifisches Gewicht/ Densidade / Densità	 1.000 1.005 1.010 1.015 1.020 1.025 1.030
Blood / Sangre/ Sang / Blut / Sangue/ Sangue	 neg. Hemolysis +10 ++ 50 +++ 250 Non Hemolysis +10 ++ 50 $\text{RBC}/\mu\text{L}$
pH	 5 6 6.5 7 8 9
Protein / Proteínas/ Protéines / Protein/ Proteínas / Proteine	 neg. trace +30(0.3) ++100(1.0) +++300(3.0) ++++1000(10) mg/dl (g/L)
Nitrite / Nitritos / Nitrites/ Nitrit / Nitritos / Nitriti	 neg. trace pos.
Leukocytes / Leucocitos/ Leucocytes / Leucocyten/ Leucócitos / Leucociti	 neg. +25 ++75 +++500 $\text{WBC}/\mu\text{L}$
Ascorbic acid / Ácido ascórbico/ Acide ascorbique / Ascorbinsäure/ Ácido ascórbico / Acido ascorbico	 neg. +20(1.2) ++40(2.4) mg/dl (mmol/L)

Read after 60 seconds. (Leukocytes 90-120 sec.)
 Leer después de 60 segundos. (Leucocitos 90-120 seg.)
 Lire après 60 secondes. (Leucocytes 90-120 sec.)
 Nach 60 Sekunden ablesen (Leukozyten 90-120 sek.)
 Ler após 60 segundos (Leucócitos 90-120 seg.)
 Leggere dopo 60 secondi (Leucociti 90-120 sec.)

Résultats d'un test urinaire sur bandelette

V. Interprétation des résultats

Urines

Paramètre	Indications	Valeur de références
pH	pH alcalin (>7.0): infection urinaire, alcalose métabolique, IRC, pathologie pulmonaire, régime végétarien pH acide (< 5): jeûne, acidose métabolique, diarrhée sévère, cétose diabétique, Acidose respiratoire, repas riche en viande	5
Leucocytes		10 leucocytes / μL
Glucose	>1.1 mmol : Diabète sucré, Glucosurie de la grossesse, glucosurie rénale, diabète mal équilibré, physiologique transitoire (stress, post-prandiale), hépatite chronique	Aucun/ 1.1 mmol / L (~ 20 mg / dl)
Corps cétoniques	résultat positif (+, ++, +++): Diabète sucré, Diabète sucré, régime sévère riche en graisse faible en glucide, troubles tubulaires rénaux, troubles digestifs, jeûne, activité physique importante	Absent
Sang	>5-10 hématie/μL : dysfonctionnement rénal ou post-rénal, , activité physique importante, thrombopathies	0- 5 hématie/μL
Protéines	Lésion rénale (glomérulonéphrite), orthostatique, lésions musculo-squelettiques, hémolyse intra vasculaire, IDM, AVC, cystite et prostatite	<0.14 g/L
Leucocytes	>10/Leucocytes /μL: infections urinaires et rénales, Infections	0-10/Leuc /μL
Nitrites	Infection des voies urinaires	Absent
Bilirubine	Atteinte hépato-biliaire, hémolyse intra- ou extravasculaire	Absent
Urobilinogène	Au-delà de 1 mg/dL : anémie hémolytique, troubles hépatobiliaires ;	<1 mg/dL

Urines

Densité relative	Hyposthénurie (< 1.010 g/mL) : diabète insipide, Hypercalcémie, hypokaliémie, insuffisance hépatique, polyurie prolongée	1.003-1.030 g/mL
	Hypersthénurie (> 1.030 g/mL) : Insuffisance surrénalienne, Insuffisance cardiaque, Perte massive d'eau	

Références

Keller, V. L., Junod-Perron, N., Graf, J., & Chopard, C. S. (2009). Analyse [b]d'urines : l'ABC[b] du praticien. *Revue Médicale Suisse*, 5(218), 1870–1875. <https://doi.org/10.53738/revmed.2009.5.218.1870>

Audouin, W., Couture, G., Girard, J., & Forest, J. (1985). Évaluation de la densité urinaire par la bandelette réactive de la Cie AMES et comparaison avec la densité donnée par le réfractomètre et avec l'osmolalité urinaire. *Clinical Biochemistry*, 18(2), 130–133. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(85\)80095-3](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(85)80095-3)

Oyaert, M., & Delanghe, J. R. (2019). Semiquantitative, fully automated urine test strip analysis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 33(5). <https://doi.org/10.1002/jcla.22870>

Delanghe, J. R., Himpe, J., De Cock, N., Delanghe, S., De Herde, K., Stove, V., & Speeckaert, M. M. (2017). Sensitive albuminuria analysis using dye-binding based test strips. *Clinica Chimica Acta*, 471, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.05.032>

TP N°8

Coloration de Masson Trichrome pour la Détection de la Fibrose

Fibrose**TP N°8****Coloration de Masson Trichrome pour la Détection de la Fibrose****I. Objectifs Pédagogiques**

1. Comprendre le principe de la coloration de Masson Trichrome ;
2. Identifier les couleurs spécifiques que prendront le collagène, les noyaux, le cytoplasme et les érythrocytes après coloration ;
3. Évaluer semi-quantitativement le degré de fibrose hépatique en utilisant des critères morphologiques.

II. Matériel

Coupe de foie de souris/rat induisant une fibrose ;
Cuves de coloration ;
Microscope optique ;
racks de coloration ;

III. Réactifs

Solution de Fuchsine-Biebrich Scarlet ;
Solution de Bleu d'Aniline ;
Solution d'Acide Phosphomolybdique/Phosphotungstique ;
Fixateur ;
Hématoxyline de Weigert ;
Éthanol à différents degrés (70%, 95%, 100%) ;
Xylène (ou substitut moins toxique) ;
Milieu de montage (ex: Entellan) et lamelles ;
Acide acétique à 1%

***NB** : travailler sous hotte et porter systématiquement gants, blouse et lunettes de protection.*

IV. Protocole Expérimental

1. Induction d'une intoxication aigue de rats ;
2. Sacrifice de l'animal et récupération du le fois ;
3. Fixation pendant 24h ;
4. Confection des coupe histologique toute en suivant le protocole classique d'histologie ;

Fibrose

5. Préparation des lames (Déparaffinage et Réhydratation dans une gamme d'alcool à degré décroissant

A. Étape de la Coloration de Masson Trichrome

Etape		Temps
Fixation	solution de Bouin	56°C pendant 1 heure température ambiante pendant 4-8 heures ou toute une nuit

Refroidissement des lames à température ambiante

Rinçage	sous l'eau courante	jusqu'à ce que la couleur jaune disparaisse complètement de la lame.
Coloration 1	Hématoxyline de Weigert	10-15 minutes
Rinçage	sous l'eau courante	5 minute
Coloration 2	Fuchsine-Biebrich Scarlet	5 minutes
Rinçage	eau distillée	1 minutes
Différenciation	Acide Phosphomolybdique/ Phosphotungstique	10-15 minutes
Coloration 3	Bleu d'Aniline	5-10 minutes
Rinçage	eau distillée	1 minutes
Différenciation finale	acide acétique à 1%	1 minute

V. Résultats

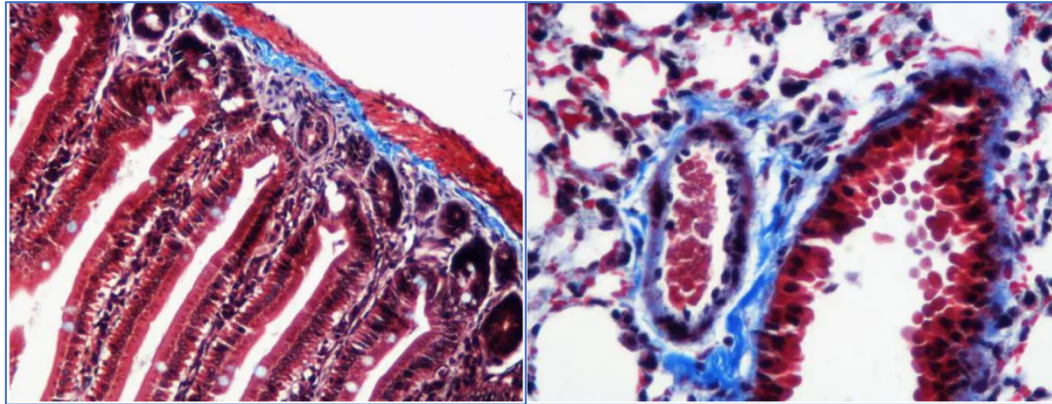
Coloration bleu ou vert : fibres de collagène ;

Coloration rouge-rosé : le cytoplasme ;

Coloration bleu-noir / noir : noyaux ;

Coloration rouge : fibres musculaires.

Fibrose

**Références**

Foot, N. C. (1933). The Masson trichrome staining methods in routine laboratory use. *Stain Technology*, 8(3), 101–110. <https://doi.org/10.3109/10520293309116112>

Al-Mahmood, S. S. (2020). Improving light microscopic detection of collagen by trichrome stain modification. */Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 34(2), 273–281. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2019.126176.1256>

Padmalatha Kadirappa K., Prathap Kumar & Prakash B S (2022). Modified masson's method of staining tissues- an experimental microanatomy study. *International Journal of Scientific Research*, 68–70. <https://doi.org/10.36106/ijsr/0408638>