

Chapitre 3

Dosage des échantillons de plasma par RP-HPLC

1. Dosage des échantillons de plasma

1.1. Nature des échantillons

Les échantillons sont des plasmas d'enfants d'âge préscolaire (12 à 59 mois). Leurs prélèvements sont réalisés dans la wilaya de Tlemcen par le service pédiatrie du CHU de Tlemcen en trois zones différentes : zone côtière au nord, zone montagneuse au centre et zone steppique au sud de la wilaya. Chaque échantillon est mené d'un questionnaire. Un volume de 2 ml de sang pour chaque enfant été prélevé dans un tube héparine lithium protégé de la lumière par un étui en papier d'aluminium. Ces échantillons du sang sont transportés vers le laboratoire dans une glacière où ils sont centrifugés à 5000 tours/minute [23]. Le plasma obtenu d'une quantité de 1 ml a été pipeté dans le noir et placé dans 2 tubes aliquotes (a et b) de 0.5 ml pour chacun. Le tube « a » été réservé au dosage de Cholécalférol plasmatique et le tube « b » utilisé en double comme sauvegarde ou pour une étude ultérieure sur d'autres micronutriments. Les tubes recouvert de papier aluminium ont été mis à congeler à -25 °C, à cette température le cholécalférol peut rester intact sans se dégrader pendant des années. Le nombre total des échantillons prélevés est de 1376.

1.2. Traitement des échantillons

A partir du nombre total des échantillons prélevés, on a choisi aléatoirement une somme de 101 échantillons comme première tranche à analyser. Cette somme est répartie en six séries, analysées indépendamment dans les mêmes conditions opératoires.

La première étape de processus analytique consiste en une préparation de l'échantillon avant l'analyse. La réalisation de cette étape dépend de deux performances :

- ✓ Le volume de la prise du plasma traité : dans les méthodes directes pour le dosage de la vitamine D plasmatique le volume est généralement entre 20 et 100 µl. Pour notre étude, le volume minimal qu'on a pu prélever avec la micropipette utilisée 50 µl.
- ✓ Le solvant ou le mélange de solvants pour l'extraction du cholécalférol : le bon choix est basé sur les conditions suivantes :
 - Doit dénaturer les protéines.

- Doit avoir une polarité convenable et une affinité pour l'analyte pour éliminer une éventuelle co-précipitation pendant la dénaturation des protéines.
- Doit être complètement miscible avec l'échantillon.
- Doit être compatible avec le système de détection et ne pas interférer avec l'analyte.

Parmi les différents solvants et mélange proposés dans la littérature pour ce type de méthode. Le mélange $C_2H_5OH/CH_3COOC_2H_5$ (1 : 1 ; v : v) proposé par Andrioli et Paola Manini [18] est le plus pratique et répond à notre but. Le volume de ce mélange ajouté est égal à 400 μ l. tout les étapes de ce processus sont réalisées sous la lumière rouge pour minimiser l'oxydation de cholécalciférol, la concentration de cholécalciférol dans les solutions étalons et dans les échantillons à analyser.

Procédure

Préparation des échantillons de plasma

- Classer les échantillons de la série à analyser sur la paillasse afin de dégeler le plasma.
- préparer en double les tubes Eppendorff, selon le nombre d'échantillons prévus.
- Etiqueter les tubes deux à deux.
- Enlever de la seringue l'aiguille avec son étui.
- Transférer une faible quantité de plasma liquide dans le premier tube.
- Refaire la même opération pour l'ensemble des échantillons de la série.
- Centrifuger à 12000 rpm, pendant 1 minute pour éliminer les fibrines.
- Prélever 100 μ l de plasma et transférer dans le deuxième tube placé dans un étui d'aluminium.
- Même opération pour l'ensemble des échantillons de la série, en changement l'embout chaque prélèvement.
- Ajouter 400 μ l de mélange ($C_2H_5OH/CH_3COOC_2H_5$).
- Fermer le tube et agiter violemment avec la main, dans le sens vertical. [24]

- Refaire la même opératoire pour l'ensemble des échantillons de la série.
- Centrifuger à 11000 rpm pendant 4 minutes [25]. Enlever les tubes de la centrifugeuse.
- Mettre en marche le système HPLC.
- Prélever soigneusement le surnageant (à l'aide de la seringue conçue pour l'injection), sans toucher les parois du tube ou le précipité et charger la boucle d'injection.
- Injecter les échantillons.

1.3. Résultats

Les concentrations des échantillons de la première série, sont quantifiées par une droite d'étalonnage externe.

Tableau 3.1 : Résultats de l'analyse RP-HPLC de la première série d'échantillons.

N°	Code	Aire de pic	Concentration (nmol/L)
01	3113	4496	40.005
02	4146	747	6.582
03	3090	2717	24.145
04	QC	6124	54.519
05	3085	1054	9.319
06	3010	6891	61.357
07	1050	3348	29.771
08	3145	1882	16.701
09	1031	1122	92.925
10	3117	983	8.686
11	3080	2418	21.480
12	QC	6071	54.047
13	1433	3236	28.772
14	986	961	8.490
15	160c	1499	13.286
Moyenne		25.806	
Ecart-type		18.631	
CV (%)		72.195	

Les concentrations des échantillons de la deuxième série, sont quantifiées par une droite d'étalonnage externe.

Tableau 3.2 : Résultats de l'analyse RP-HPLC de la deuxième série d'échantillons.

N°	Code	Aire de pic	Concentration (nmol/L)
01	3112	2221	19.723
02	987	3019	26.838
03	3116	2142	19.019
04	QC	5988	53.307
05	3120	3061	27.212
06	36022	3332	29.628
07	3008	219	1.875
08	994	2181	19.367
09	1023	2995	26.624
10	996	2560	22.745
11	1429	1887	16.746
12	3228	104	0.850
13	1536	/	/
14	1431	2643	23.485
15	3179	516	4.523
16	3174	3714	33.034
17	QC	5981	53.244
18	1537	2228	19.786
19	999	2903	25.803
	Moyenne	23.545	
	Ecart-type	14.129	
	CV (%)	60.008	

Les concentrations des échantillons de la troisième série, sont quantifiées par une droite d'étalonnage externe.

Tableau 3.3 : Résultats de l'analyse RP-HPLC de la troisième série d'échantillons.

N°	Code	Aire de pic	Concentration (nmol/L)
01	3149	/	/
02	3105	4451	39.604
03	3035	/	/
04	QC	5948	52.950
05	3199	3567	31.723
06	3152	/	/
07	3034	1573	13.946
08	3055	1948	17.289
09	3082	1656	14.686
10	3114	5984	53.271
11	3086	/	/
12	3121	2335	20.740
13	1415	7977	71.039
14	3266	2816	25.028
15	3253	3067	27.265
16	QC	5955	53.013
17	3013	1137	10.059
18	3048	1480	13.117
19	3051	2518	22.371
	Moyenne	31.073	
	Ecart-type	18.655	
	CV (%)	60.037	

1.4.1. Distribution des Hauteurs des pics de la quatrième série

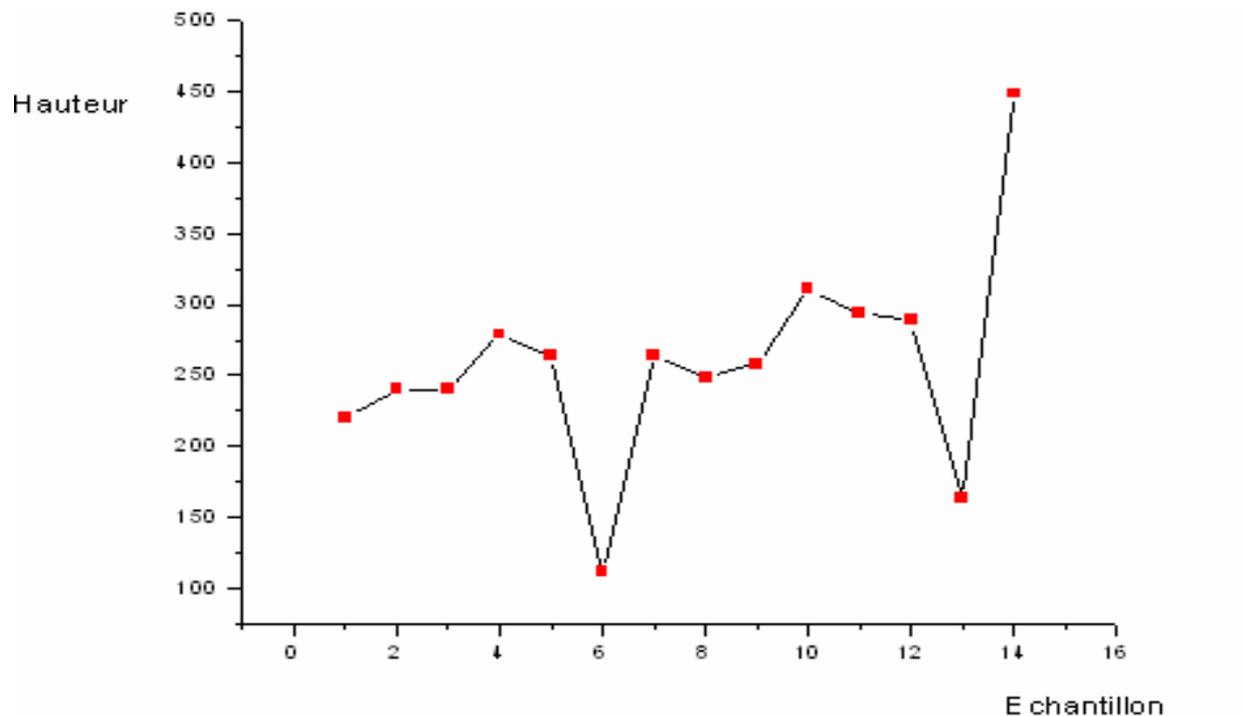


Figure 3.1 : Distribution des hauteurs des pics de la quatrième série.

Discussion

Le diagramme ci-dessus représente la distribution des hauteurs des pics de la Quatrième série qui contient 15 échantillons, nous remarquons que la majorité des échantillons se situe dans l'intervalle [27.586 nmol/l – 53.235 nmol/l] par contre la concentration des échantillons 6 et 13 sont largement inférieure à cette gamme. Se qui nous laisse supposé que ces deux sujets présentent une carence en vitamine D, en revanche la concentration du 15 ème échantillon représente un excès en cette vitamine par rapport aux autres échantillons.

1.4.2. Variation de la température

La variation de la température a un effet important sur la solubilité dans l'éluant, la viscosité des solvants et surtout sur le temps de rétention. Le détecteur utilisé dans le système HPLC est de type UV, c'est un détecteur indifférent aux fluctuations de température [19].

L'inspection des temps de rétention recueillis au cours de l'analyse des échantillons de la cinquième série effectuée à température ambiante, montre que ce paramètre étant

incontrôlable et varie très faiblement. La représentation graphique sur la figure (3.2), des résultats obtenus montre par contre une légère traîne sur la distribution de ces temps.

Cette traîne est probablement due à cette fluctuation. Donc l'augmentation de la température est traduite par une diminution du temps d'analyse.

Tableau 3.4 : Variation des temps de rétention en fonction de la température.

N°	Code	Temps de rétention	Température (°C)
01	3227	7.621	28
02	3235	7.620	28
03	3009	7.589	28
04	QC	7.584	28
05	3246	7.597	28
06	3236	7.577	28.5
07	1489	7.595	28.5
08	3026	7.586	28.5
09	3025	7.564	28.5
10	3177	7.565	29
11	3231	7.556	29
12	974	7.567	29
13	QC	7.565	29
14	1426	7.579	29
Moyenne		7.583	28.5
Ecart-type		0.0201	0.438
CV (%)		0.264	1.538

Tableau 3.5 : Variation des temps de rétention en fonction de la température.

N° d'échantillon	Température (°C)	Temps de rétention (mn)
1 - 5	28	7.602
6 - 9	28.5	7.590
10 - 14	29	7.566

Discussion

Au vue des résultats regroupés dans le tableau (3.5) on constate que l'augmentation de la température dans l'intervalle 28-29°C engendre une légère diminution des temps de rétention.

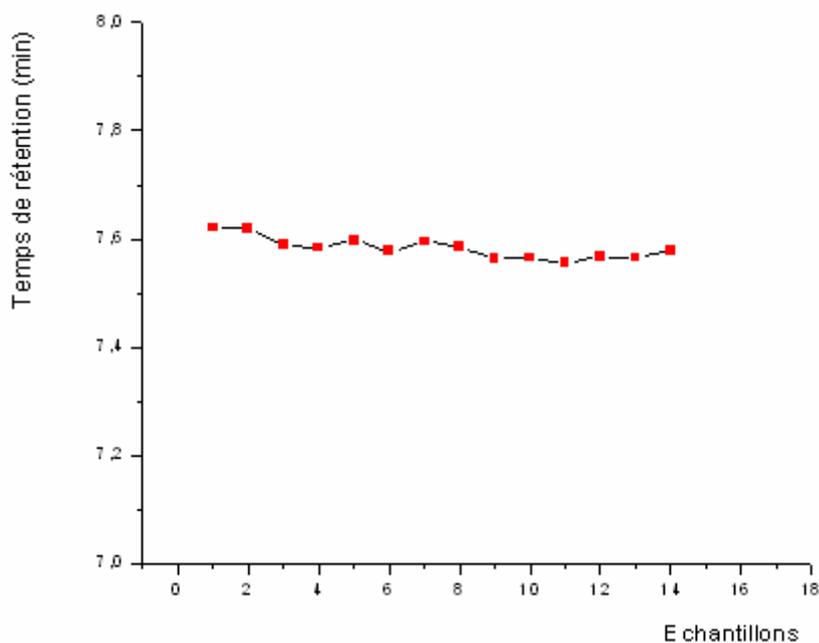


Figure 3.2 : Distribution des temps de rétention de la Quatrième série.

1.5. Evaluation de l'état de carence en vitamine D des échantillons analysés

L'évaluation de l'état de carence de l'ensemble des échantillons analysés et présentés dans cette étude, est déterminée par dénombrement des échantillons dont la concentration est inférieure à 1.3 nmol/l [12]. Les résultats obtenus sont donnés au tableau suivant :

Tableau 3.6 : Taux en (%) de la carence en vitamine D des échantillons analysés.

	Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons dont la concentration est < 1.3 nmol/L
1 ^{ère} Série	15	0
2 ^{ème} Série	17	2
3 ^{ème} Série	17	4
4 ^{ème} Série	17	5
5 ^{ème} Série	17	5
6 ^{ème} Série	18	9
Ensemble des échantillons	101	25
Etat de carence 24.75 %		

En se basant sur la concentration de 1.3 nmol/l comme seuil indicateur de carence, la valeur de taux de carence pour cette étude est 24.75 %.