

UNIVERSITE MONTPELLIER II
Sciences & Techniques du Languedoc

Licence Biologie des Organismes

Travaux Pratiques de Physiologie Animale :

Détermination du volume sanguin chez le rat

Le but de cette séance de travaux pratiques est de déterminer le volume sanguin d'un rat. Pour mesurer ce volume, on utilise une méthode de détermination indirecte. Cette méthode est basée sur l'injection d'une substance dans le réseau sanguin, après quelques minutes on mesure la concentration dans le sang de cette substance qui va nous permettre de déterminer alors le volume sanguin du rat. La substance utilisée ne doit pas modifier significativement le fonctionnement physiologique de l'animal, pour cela nous utilisons du Bleu Evans car cette substance est de pH neutre et ne modifie pas l'osmolarité du sang de plus elle ne se diffuse pas hors du système circulatoire.

I) Matériel & Méthodes :

1) Préparation du rat :

La mesure du volume sanguin s'effectue sur des rats anesthésiés à l'uréthane (carbonate d'éthyle) à 5 % (2,5 ml / 100 gm de poids vif). Pour cette expérience nous devons mettre en place une voie pour l'introduction du Bleu Evans nous utilisons donc une canule insérée dans la jugulaire droite. Pour récupérer le sang après l'injection du Bleu Evans, nous devons introduire un cathéter (contenant de l'héparine afin d'éviter la coagulation du sang) dans la carotide gauche, la circulation de la carotide doit être bloquée préalablement par une pince à artère.

2) Injection du bleu Evans :

Une fois le cathéter et la canule installés, nous devons introduire dans la jugulaire 0,05g d'Bleu Evans pour 100g de poids vif. Nous disposons d'une solution mère à 0,025g/100ml et d'un rat de 312 g nous devons donc injecter 0,1826g de bleu Evans soit une injection de 0,73 ml de solution mère.

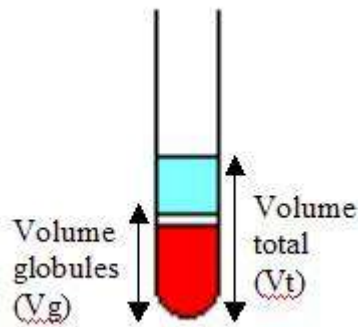
3) Prélèvement du sang :

Trois minutes après l'injection on récupère 2ml de sang dans un tube contenant quelques gouttes d'Héparine. La récupération se fait par le cathéter introduit dans la carotide, mais on doit éviter de récupérer le sang bloqué entre la pince à artère et le cœur, on ne gardera donc pas les premières gouttes de sang.

4) Analyses du prélèvement :

Le volume de sang récupéré doit être centrifugé (15 minutes à 4000tr/mn) afin de séparer les éléments figurés (globules rouges et blancs) du plasma.

Après centrifugation nous obtenons 3 niveaux : Globules rouges, globules blancs et plasma (qui est coloré par le bleu Evans), on peut alors déterminer l'hématocrite qui est le rapport des globules sur le volume total ($H = V_g / V_t$).



Après avoir déterminé l'hématocrite on récupère 1 ml de plasma auquel on rajoute 1 ml de sérum physiologique, ensuite nous déterminons la concentration de bleu Evans dans le plasma par l'intermédiaire d'un photocolorimètre (mesure de l'absorption).

Le photocolorimètre doit être réglé à la longueur d'onde optimale, on va ainsi mesurer l'absorption d'une solution de bleu Evans suivant différentes longueurs d'ondes afin de déterminer la valeur λ la plus précise.

On doit ensuite procéder aux mesures permettant l'élaboration de la courbe étalon de l'absorption du Bleu Evans. On procède tout d'abord par la mise à zéro de l'appareil (le zéro correspond à l'absorption pour du sérum physiologique). On mesure ensuite l'absorption de bleu Evans suivant différentes concentrations (0.005, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025) de cela, on construira un graphique et on calculera le coefficient directeur afin de déterminer la concentration en Bleu Evans du plasma prélevé. Une fois la concentration trouvée on peut retrouver par le calcul le volume sanguin du rat.

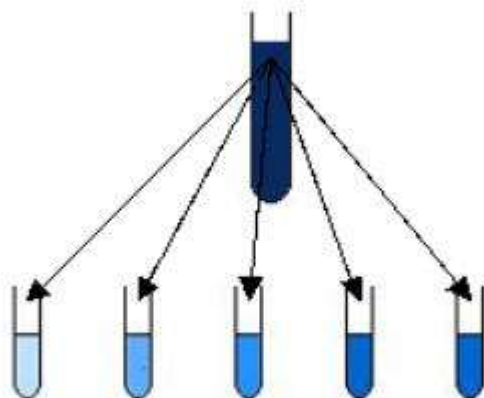
Schéma des dilution pour l'étalonnage du photocolorimètre

Solution A
(à 0.025 mg/ml)

2 ml 4 ml 6 ml 8 ml 10 ml

Complété à 10 ml de sérum
physiologique

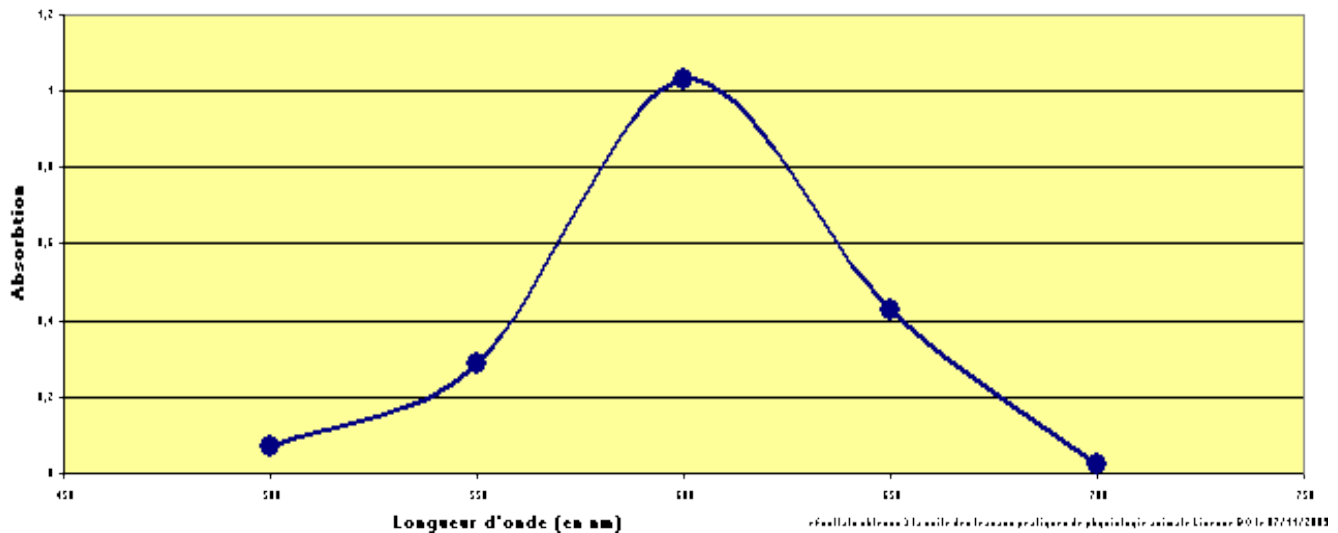
0.005 0.010 0.015 0.020 0.025
mg/ml mg/ml mg/ml mg/ml mg/ml



II) Calculs et Résultats :

1) Choix de la longueur d'onde :

Absorption suivant la longueur d'onde du photocolorimètre

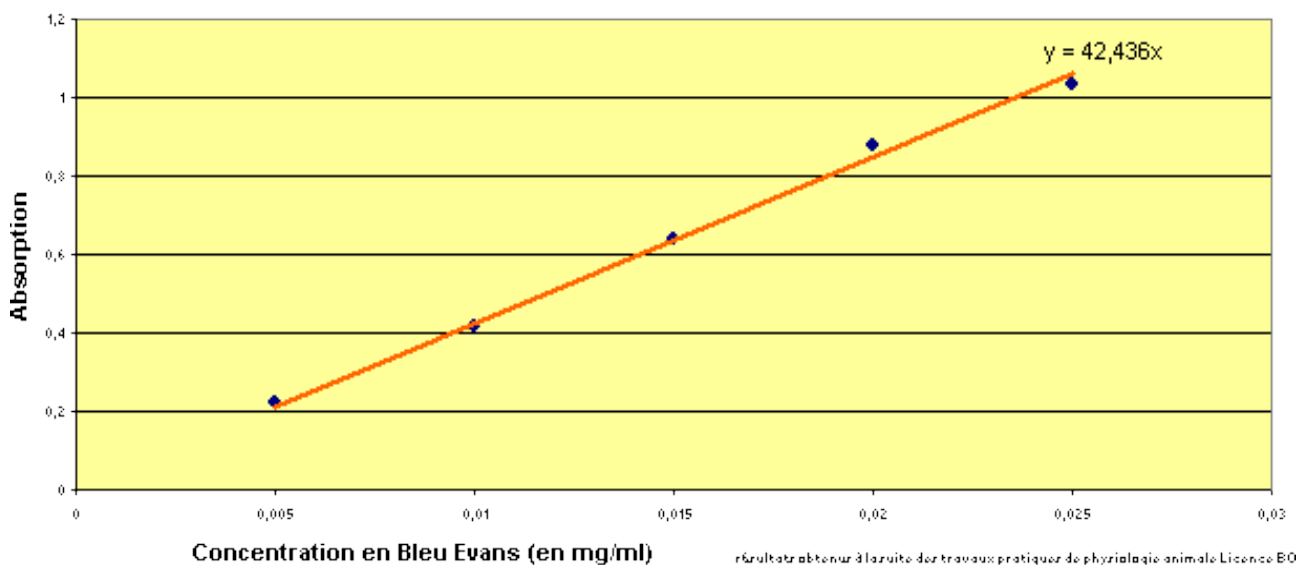


Le graphique ci-dessus montre que la longueur d'onde = 600 nm est la plus optimale pour la mesure de la concentration en Bleu Evans.

2) Etalonnage de l'appareil :

Le graphique suivant correspond à la courbe d'étalonnage pour différentes concentrations de bleu Evans :

Absorption en fonction de la concentration en Bleu Evans



On peut retrouver la concentration en bleu Evans d'une substance avec le coefficient directeur inverse de celui du graphique : $1/42,436 = 0,02356$ on a donc le rapport suivant : $C_{BE} = 0.02356 \times Do$

avec C_{BE} : concentration en Bleu Evans (en mg/ml), Do : absorption du plasma.

Comme nous avons rajouté du sérum physiologique dans la solution de plasma lors de la mesure, nous devons donc multiplier par deux la concentration obtenu, on obtient le rapport suivant :

$$C_{BEP} = 0.4713 \times Do$$

avec C_{BEP} : concentration en Bleu Evans du plasma (en mg/ml)

3) Calcul du volume sanguin :

Nous avons obtenu la concentration en bleu de Evans (C_{BEP}) du plasma. Nous pouvons en déduire la concentration pour le volume total du sang :

$$C_{BET} = C_{BEP} / (1 - H)$$

avec C_{BET} : concentration total en bleu Evans (en mg/ml), H : hématocrite.

Sachant que l'on a introduit 0.1828 g de bleu Evans on peut retrouver le volume sanguin total du rat :

$$V_{ST} = 182.8 / C_{BET}$$

avec V_{ST} en ml

4) Résultats :

N°	Masse			Do	Concentration	Concentration de BE*	Volume	Volume de s pour 100
	du rat (g)	Masse de BE* Injecté	Hématocrite (H)		de BE* dans le Plasma (C_{BEP})	dans le volume total de sang (C_{BET})	Sanguin Total (V_{ST})	
1 ²	365	0,1825	0,552	0,378	0,017766	0,007959	22,92	6,28365
2	326	0,163	0,52	0,867	0,02601	0,012484	13,05	4,00992
3	312	0,156	0,56	0,469	0,022043	0,009698	16,08	5,15316
4	303	0,1515	0,4545	0,37	0,01739	0,009486	15,97	5,27944

BE*= Bleu Evans

1²= rat pour lequel nous avons décrit le protocole ainsi que les calculs.

N° rat :	Observations :
1	Prélèvement et dissection sans inconvénient significatifs, pose de la sonde trachéale.
2	Le bleu Evans a été introduit directement dans le cœur. De plus il y a eu deux erreurs de manipulation. D'une part le photolorimètre n'a pas été mis à zéro et d'une autre part la dilution n'a pas été effectuée, ce qui explique la valeur élevée du Do. Ces erreurs ont été prises en compte lors des calculs et ne devraient pas modifier significativement les résultats. On peut aussi rajouter que le débit sanguin au niveau du cathéter était très faible.
3	Prélèvement et dissection sans inconvénient significatifs, pose de la sonde trachéale.
4	Prélèvement et dissection sans inconvénient significatifs

Moyenne du volume sanguin total : 17,01 +/- 4,10 ml

Ecart type : 4,18 ml

Moyenne du volume sanguin/100 g poids vif : 5,18 +/- 0,91 ml / 100 g pv

Ecart type : 0,96 ml / 100 g pv

III) Discussions & interprétation

L'analyse des résultats des 4 rats dont on a mesuré le volume sanguin, nous donne un volume sanguin compris entre 4,27 et 6,09 ml par 100g de poids vif (pour une marge d'erreur de 5%). La valeur théorique de ce volume est comprise entre 5 et 7 ml par 100 g de poids vif. Les légères différences entre ces valeurs peuvent être dues pour différentes raisons, d'une part les conditions expérimentales (anesthésie et vivisection), peuvent provoquer une légère déshydratation. D'une autre part on doit prendre aussi en compte la petite taille de l'échantillon qui n'est pas forcément significative, de plus la majorité des rats présentaient un développement important de tissus adipeux, la présence de gras a tendance à diminuer le volume sanguin.

Pour le rat n° 2, les erreurs de manipulations on étaient rectifiées de la manière suivante : d'une part, pour la remise à zéro nous avons utilisé une équation de type $y = ax + b$ qui nous a permis de retrouver le rapport entre Do et la concentration. Et pour l'oubli de la dilution, étant donné que la Do trouvée était comprise dans les valeurs d'étalonnage la concentration trouvée n'était donc pas faussée. La concentration élevée en bleu de Evans pourrait être expliquée par le fait que l'injection a été effectuée directement dans le cœur et par conséquent la concentration au niveau de la carotide pourrait être plus élevée ce qui explique le faible volume sanguin trouvé.

La mesure du volume sanguin est utilisée actuellement pour étudier le développement des tumeurs cancéreuses vascularisées, et les expériences sont effectuées sur des rats. La méthode indirecte de détermination du volume sanguin a été remplacée par l'utilisation de scanners beaucoup plus précis et ne détériorent pas l'animal qui peut alors être suivi à plusieurs reprises contrairement à la méthode utilisée en TP.