HAL
open science

Dosage de l'hémoglobine dans les liquides biologiques par spectrophotométrie dérivée : adaptation d'une méthode sur un spectrophotomètre Uvikon 820 (Roche Kontron)

Bernard Cadoux

To cite this version:

Bernard Cadoux. Dosage de l'hémoglobine dans les liquides biologiques par spectrophotométrie dérivée : adaptation d'une méthode sur un spectrophotomètre Uvikon 820 (Roche Kontron). Sciences pharmaceutiques. 1988. dumas-01791308

HAL Id: dumas-01791308

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01791308v1

Submitted on 14 May 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UFR de Pharmacie
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES Grenoble Alpes

UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
Grenoble INP

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

2e exemplaire

UNIVERSITE SCIENTIFIQUE TECHNOLOGIQUE ET MEDICALE DE GRENOBLE

U.F.R. DE PHARMACIE

Domaine de la Merci - La Tronche

ANNEE 1988

N° d'ORDRE 7019

TITRE DE LA THESE

Dosage de l'hémoglobine dans les liquides biologiques par spectrophotométrie dérivée :

adaptation d'une méthode sur un spectrophotomètre Uvikon 820 (Roche kontron)

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE SCIENTIFIQUE TECHNOLOGIQUE et MEDICALE DE GRENOBLE, pour obtenir le grade de : DOCTEUR EN PHARMACIE.

par

CADOUX Bernard

[Données à caractère personnel]

Cette Thèse sera soutenue publiquement le 24 MARS 1988

devant Monsieur le Professeur A. FAVIER, Président du Jury

et

Monsieur G. DESCH : Docteur es sciences pharmaceutiques

Monsieur C. BOUJET : Docteur es sciences pharmaceutiques

BIBLIOTHÈQUE INTERUNIVERSITAIRE
GRENOBLE
MÉDECINE-PHARMACIE

UNIVERSITE SCIENTIFIQUE TECHNOLOGIQUE ET MEDICALE DE GRENOBLE

U.F.R. DE PHARMACIE

Domaine de la Merci - La Tronche

ANNEE 1988

N° d'ORDRE

TITRE DE LA THESE

Dosage de l'hémoglobine dans les liquides biologiques par spectrophotométrie dérivée :

adaptation d'une méthode sur un spectrophotomètre Uvikon 820 (Roche kontron)

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE SCIENTIFIQUE TECHNOLOGIQUE et MEDICALE DE GRENOBLE, pour obtenir le grade de : DOCTEUR EN PHARMACIE.

par

CADOUX Bernard

[Données à caractère personnel]

Cette Thèse sera soutenue publiquement le 24 MARS 1988

devant Monsieur le Professeur A. FAVIER, Président du Jury

et

Monsieur G. DESCH

Monsieur C. BOUJET

BIBLIOTHÈQUE INTERUNIVERSITAIRE GRENOBLE MÉDECINE-PHARMACIE

A ma mère, A mon père,

Les mots n'exprimeront jamais les sentiments que j'éprouve envers vous. Je vous dédie ce travail pour votre affection, votre dévouement et votre soutien de tous les instants.

A Nicole,

A mon frère et toute ma famille,

A la famille Croizat,

A notre Président de thèse,

Monsieur le Professeur FAVIER,

Vous m'avez fait l'honneur de bien vouloir accepter la Présidence de ce Jury. Pendant mes années d'externat, j'ai pu apprécier votre disponibilité, votre courtoisie.

Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance, de mon respect et de ma profonde admiration.

A notre Directeur de thèse,

Monsieur le Docteur DESCH,

Vous avez bien voulu accepter de diriger ce travail. Vos conseils, votre expérience, votre rigueur ont permis la bonne réalisation de cette étude.

Recevez ici l'expression de ma sincère gratitude et de mes sentiments respectueux.

A Monsieur le Docteur BOUJET,

Vous avez accepté, avec votre gentillesse habituelle de juger ce travail.
Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect et de ma reconnaissance.

En souvenir de l'Hôpital de Hyères,

Aux docteurs MATHELIN J.P. et CECCALDI R., médecins du S M U R avec qui nous avons eu une étroite collaboration. Qu'ils trouvent ici un témoignage de remerciements et d'amitié.

Au docteur ESCARQUEL C. qui nous a formé dans le domaine de la microbiologie, qu'il reçoive un signe de respect et de profonde considération.

A Anita GENEVOIS qui a permis la mise en forme de cette thèse.

PLAN

A. INTRODUCTION

B. HEMOGLOBINE ET SES DERIVES

I. Définition - Structure

II. Biosynthèse de l'hémoglobine

2.1. Synthèse de l'hème

2.2. Synthèse de la globine

III. Cataboliseme de l'hémoglobine

IV. Stabilité

4.1. in vivo

4.2. in vitro

V. Caractéristiques spectrales de l'hémoglobine et de ses dérivés.

5.1. Carboxyhémoglobine

5.2. Oxyhémoglobine

5. 3. Cyanmethémoglobine

5. 4. Hémoglobine totale

5. 5. Bilirubine

C. INTERETS DU DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES

I. Contrôle de qualité au niveau des centres de transfusion sanguine.

II. Intérêt en pathologie médicale.

2.1. Diagnostic des hémolyses d'origine accidentelle.

a) Hémolyse bactérienne et parasitaire

- bactérienne
- parasitaire

b) Hémolyse d'origine toxique

- toxiques professionnels ou accidentels
- médicaments
- toxines animales

c) Hémolyse mécanique

d) Hémolyse immunologique

2.2. Surveillance des traitements susceptibles de créer une hémolyse

a) Oxygénothérapie hyperbare

b) radiothérapie

c) hémodialyse

2.3. Contrôle de qualité en biologie

a) évaluation d'une méthode

b) validation des résultats

D. LES DIFFERENTES METHODES DE DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE

I. Transformation de l'hémoglobine en cyanmethémoglobine par la méthode de Drabkin.

II. Formation d'hématine alcaline D 575.

III. Méthodes basées sur les propriétés péroxydasiques du pigment.

3.1. Techniques colorimétriques

3.2. Techniques par chimioluminescence

IV. Dosage de l'hémoglobine par le fer qu'elle contient.

V. Méthodes immunologiques.

VI. Méthodes de dosage physique de l'hémoglobine.

E. MATERIELS ET METHODES

I. Matériel.

II. Prélèvements.

2.1. sang

2.2. urine

2.3. dialysat

III. Méthode.

F. RESULTATS

Remarques préliminaires.

I. Dosages dans le sang et les dialysats.

1.1. évaluation de l'imprécision sur la mesure de l'hémoglobine totale.

1.1.1. Essai de répétabilité

1.1.2. Reproductibilité

1.2. évaluation du domaine d'analyse

1.2.1. limite de détection

1.2.2. limite de linéarité

1.3. exactitude et application au milieu protéïque

1.3.1. surcharge d'hémoglobine dans l'eau

1.3.2. surcharge de l'hémoglobine dans le plasma

1.4. sélectivité de la méthode

1.5. valeurs normales

II. Dosage de l'hémoglobine dans l'urine.

2.1. évaluation de l'imprécision sur la mesure de la cyan-

methémoglobine.

2.1.1. essai de répétabilité

2.1.2. essai de reproductibilité

2.2. Evaluation du domaine d'analyse

2.2.1. limite de détection

2.2.2. limite de linéarité

2.3. Exactitude

2.3.1. surcharge de cyanméthémoglobine dans l'eau

2.3.2. surcharge de cyanméthémoglobine dans l'urine

G. DISCUSSION

H. CONCLUSION

I. BIBLIOGRAPHIE

J. ANNEXES

K. TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

A. INTRODUCTION

En biologie clinique, le dosage de l'hémoglobine plasmatique a un rôle important dans le diagnostic et la surveillance de pathologies variées, ayant pour origine une hémolyse. L'hémolyse entraîne un affaiblissement du malade par anémie (troubles cardiovasculaires, respiratoires...) ; en outre, l'hémoglobine libérée peut être la cause d'une importante insuffisance rénale, aux conséquences sévères.

Après avoir rappelé la structure, la stabilité et les caractéristiques spectrales des dérivés hémoglobiniques, nous illustrerons l'intérêt de son dosage.

Le dosage de l'hémoglobine trouve des applications aussi bien dans l'industrie pharmaceutique qu'en pathologie médicale ou dans la prophylaxie de certaines maladies professionnelles.

Les méthodes de dosages sont fort nombreuses et utilisent les différentes techniques de la "physico-chimie" biologique (colorimétrie spectrophotométrie - spectrométrie d'absorption atomique - immunologie - chromatographie - luminescence...).

Lors de ce travail, nous allons adapter sur un spectrophotomètre Uvikon 820 (Roche Kontron) la technique publiée par Taulier (43) utilisant un procédé mathématique, la dérivation.

L'étude critique des résultats, illustre l'intérêt de cet outil mathématique et nous engage à développer cette procédure pour l'évaluation quantitative d'autres molécules.

HEMOGLOBINE ET SES DERIVES

B. HEMOGLOBINE ET SES DERIVES

I. Définition et structure

L'hémoglobine est un composé macromoléculaire chromoprotéïque (26), de masse moléculaire 64500, résultant d'unassemblage de 4 chaines polypeptidiques ou globine, combinées chacune à un hème et réunies entre elles par des forces d'interactions non covalentes telles des liaisons hydrophobes et électrostatiques.

* Le noyau héminique contient une molécule de protoporphyrine et un noyau de fer ionisé II +,lié aux 4 atomes d'azote des noyaux pyrroles par deux liaisons covalentes et deux liaisons de coordination sous la forme d'un système en résonnance. L'atome de fer II + hexacoordinné réalise ainsi un complexe susceptible d'échanger 2 autres liaisons soit avec des résidus de la globine, soit avec des ligands.

* La globine est constituée de 4 chaines, identiques 2 à 2, de structure primaire et conformationnelle connue (chaines α 141 AA, chaines β 146 AA dont l'organisation est fonction du stade de développement).

On note la structure ε pour l'hémoglobine embryonnaire, γ pour l'hémoglobine foetale, β et δ pour l'hémoglobine adulte. (fig 1)

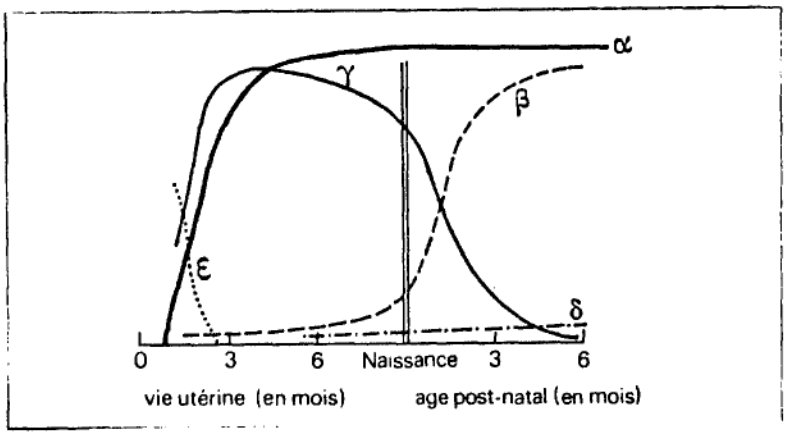


Fig 1 : Evaluation de la synthèse des chaines d'hémoglobine en

fonction de l'âge. Hématologie. J. BERNARD. Page 46. fig 37.

II. Biosynthèse de l'hémoglobine

2.1. Synthèse de l'hème (3).

Elle se fait dans les mitochondries des érythroblastes où toutes les enzymes nécessaires sont réunies. A partir de la glycine et de l'acide succinique, une série de précurseurs intermédiaires sont synthétisés : les porphyrines.

L'incorporation du fer dans la protoporphyrine III réalise l'hème.

La pyridoxine (vitamine B 6) est le co-enzyme de l'ala-synthétase et de l'héme synthétase aux deux extrémités de la chaine de réaction qui mène à l'hème. (fig 2)

Le défaut de synthèse de l'héme n'est cependant qu'une conséquence très tardive et exceptionnelle de la carence en vitamine B 6.

La régulation de la synthèse de l'hème se fait essentiellement au niveau de l'ala-synthèse, enzyme clef dont l'activité est inhibée par son produit direct l'acide δ amino lévulinique (Ala) et par le produit final, l'hème.

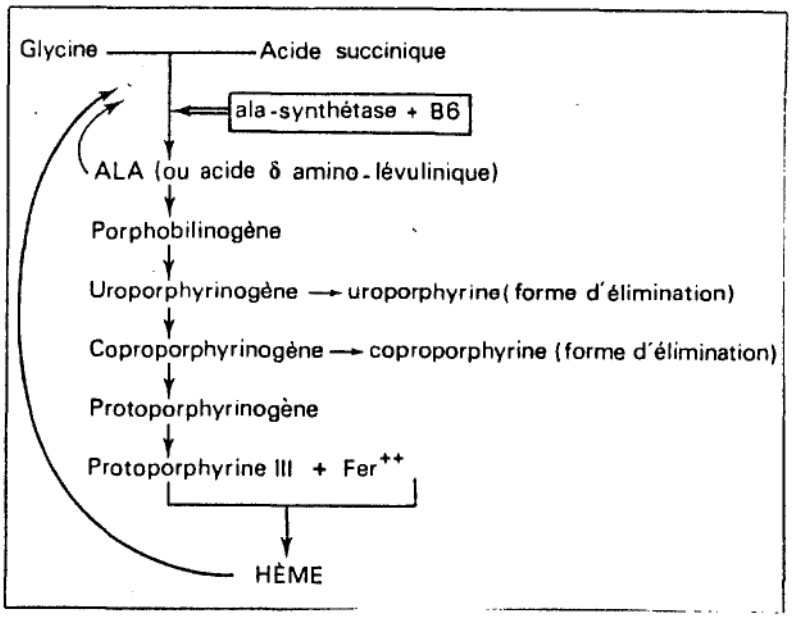


Fig 2 : Synthèse de l'hème (Hématologie. J. BERNARD. p. 48. fig. 39)

2.2. Synthèse de la globine.

Elle se fait selon le schéma général de la synthèse des protéïnes. Il existe une synchronisation normale de la synthèse des chaines alpha et non alpha : une chaine alpha et une chaine non alpha s'associent pour former un dimère, deux dimères associées à 4 molécules d'hème constituant une molècule d'hémoglobine. La synchronisation entre la synthèse de l'hème et celle de la globine se fait par l'intermédiaire de l'hème qui stimule la synthèse des chaines de globines. L'hème jour un rôle clef dans la régulation de la synthèse de l'hémoglobine (hème et globine).
On ignore en revanche encore le mécanisme exact du passage de la synthèse d'une chaine non alpha à une autre et principalement celui du "switch" de la synthèse de la chaine gamma à celle de la chaine beta autour de la naissance.

III. Catabolisme de l'hémoglobine.

Au sein de la cellule macrophagique, on retrouve les divers composés suivants :

- le fer qui sera réutilisé par l'hématopoïèse
- la globine qui est dégradée en acides aminés
- le noyau tetrapyrrolique est transformé sous l'action d'enzymes spécifiques en une série de pigments libérés dans le plasma sous forme de bilirubine libre (ou non conjuguée) qui est fixée sur l'albumine et transportée vers les cellules hépatiques.

Au niveau de l'hépatocyte, une glycuronyl transférase transforme la bilirubine non conjuguée en bilirubine glycurono conjuguée hydrosoluble qui passe dans la bile et s'élimine dans les selles sous la forme d'une série de dérivés dont le plus important est le stércobilinogène.

IV. Stabilité

In vivo et in vitro, l'hémoglobine peut être soumise à l'action des oxydants qui la transforme en methémoglobine. L'atome de fer passe de l'état ferreux Fe 2 + à l'état ferrique Fe 3 + et se trouve lié par une valence ionique à un ion OH - qui occupe la place de l'oxygène.

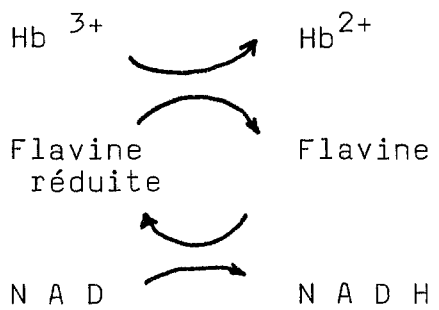
4.1. In vivo

Dans l'érythrocyte, l'hémoglobine est oxydée en méthémoglobine (systèmes oxydants mal connus) et la methémoglobine, devenue incapable de fixer l'oxygène, est reconvertie continuellement en hémoglobine réduite.

Une methémoglobinémie faible atteste de cet équilibre.

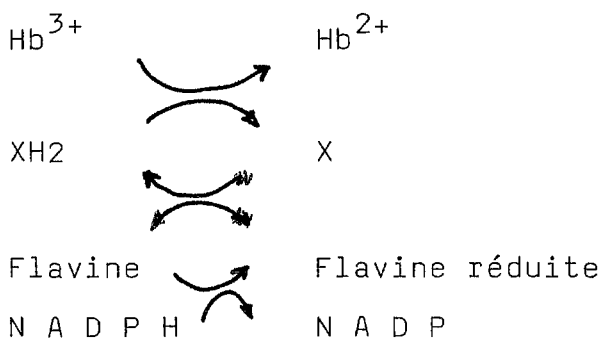
Deux methémoglobines réductases appartenant au groupe des flavoprotéïnes assurent la réduction de la methémoglobine.

- methémoglobine réductase I



La glycolyse anaérobie joue un rôle capital, car elle fournit l'essentiel du N A D H par l'intermédiaire de la phospho-glycéraldéhyde deshydrogénase.

- methémoglobine réductase II



Le passage par un catalyseur rédox inconnu est nécessaire car la flavine ne rentre pas en contact avec la methémoglobine. Ce système de protection a un rôle moindre que celui exercé par la réduction de type I.

L'hémoglobine est transformée en verdoglobine sous l'action de peroxydes divers.

La glutathion peroxydase, la glutathion réductase, la catalase et le N A D H sont des systèmes protecteurs empêchant cette transformation selon le schéma suivant :

(1) $X\ O_2 + H_2O \rightleftharpoons X + H_2O_2$

(2) Hb $\longrightarrow$ verdoglobine

($X\ O_2$ ou H_2O_2)

(3) $O_2X \longrightarrow X + H_2O_2$

Glutathion peroxydase

$H_2O_2 \downarrow$ Catalase $\rightarrow H_2O + 1/2\ O_2$

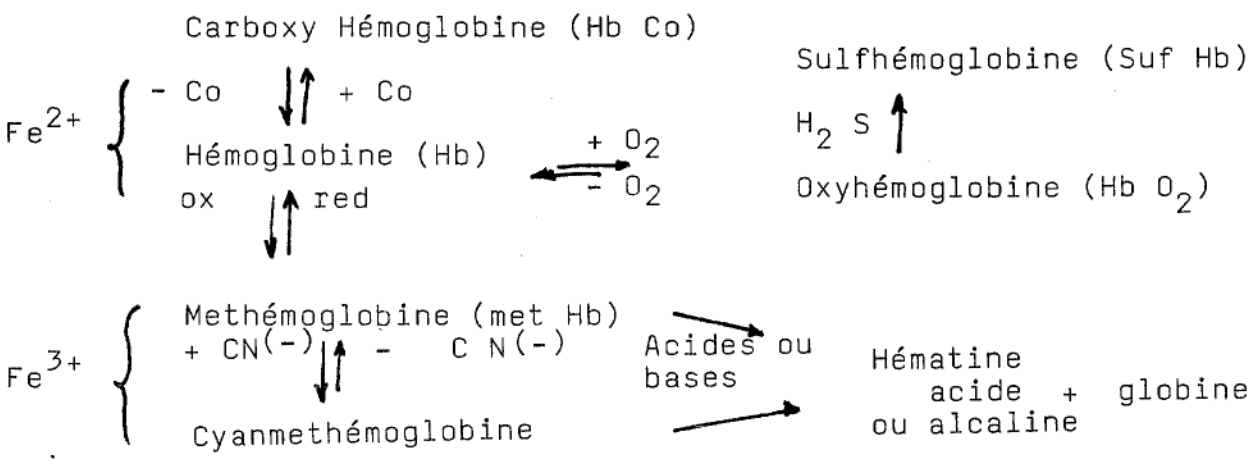
2 G S H $\rightleftarrows$ G S - G S

Glutathion réductase

N A D P $\longleftarrow$ N A D P H

4.2. in vitro

Soumise à l'action d'oxydants, du monooxyde de carbone, d'acides, de bases ou d'ions cyanure, l'hémoglobine se transforme en divers composés (27).



Par sa structure même, par son instabilité, l'hémoglobine est un composé difficile à doser car il ne s'agit pas d'une molécule chimique simple mais d'un ensemble de composés.

La méthode que nous nous sommes proposés d'étudier doit limiter les imprécisions dues à l'instabilité de ce composé.

V. Caractéristiques spectrales de l'hémoglobine et de ses dérivés (26) - fig 3.

5.1. Carboxyhémoglobine

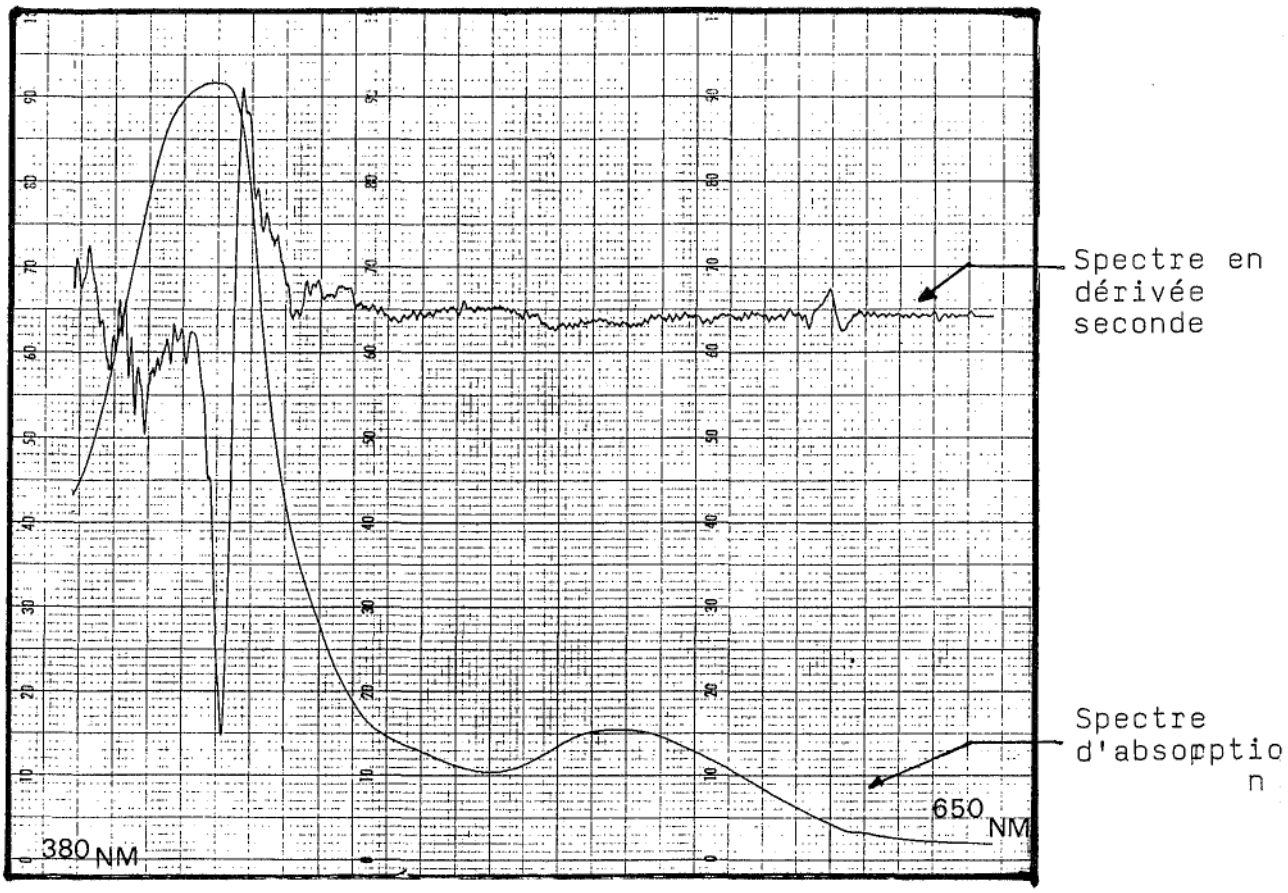
- le sang est dilué, hémolysé et saturé avec de l'oxyde de carbone.
- le spectre présente un maximum d'absorption à 539 nm.

5.2. Oxyhémoglobine

- après hémolyse et dilution dans un tampon ou une solution alcaline de pH 8 (destinée à éviter la précipitation des protéïnes), le spectre d'oxyhémoglobine présente 2 maxima à 540 et 576 nm.

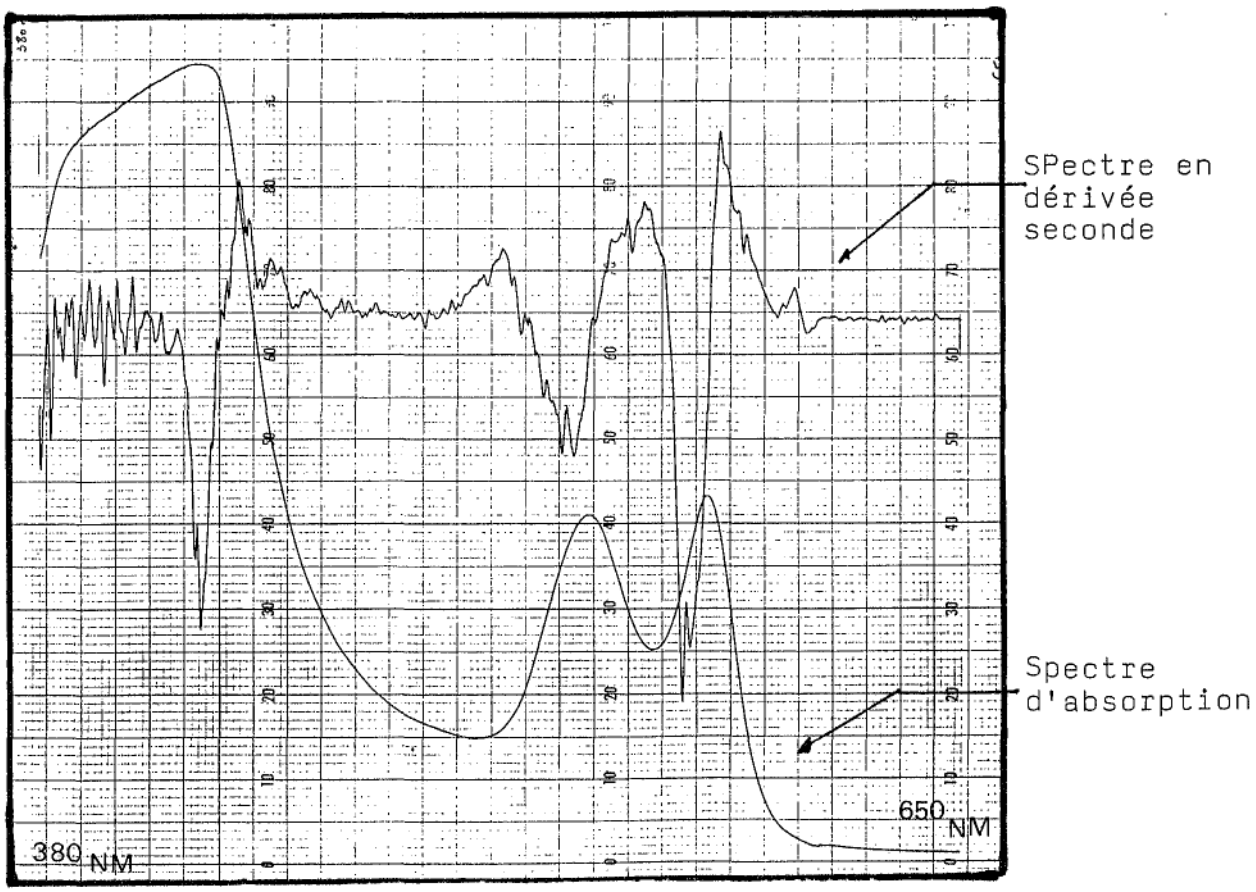
5.3. Cyanmethémoglobine

- le réactif de Drabkin transforme toutes les formes d'hémoglobine à l'exception de la sulfhémoglobine. Ce réactif contient du ferricyanure de potassium K_3 Fe (CN) 6 (qui oxyde les hémoglobines en methémoglobine), du cyanure de potassium (KCN) (qui assure la conversion en cyanmethémoglobine) et un détergent qui évite la précipitation des globulines (cf matériels et méthodes).
- le spectre présente deux bandes d'absorption interessantes vers 540 et 420 nm. (fig 4)



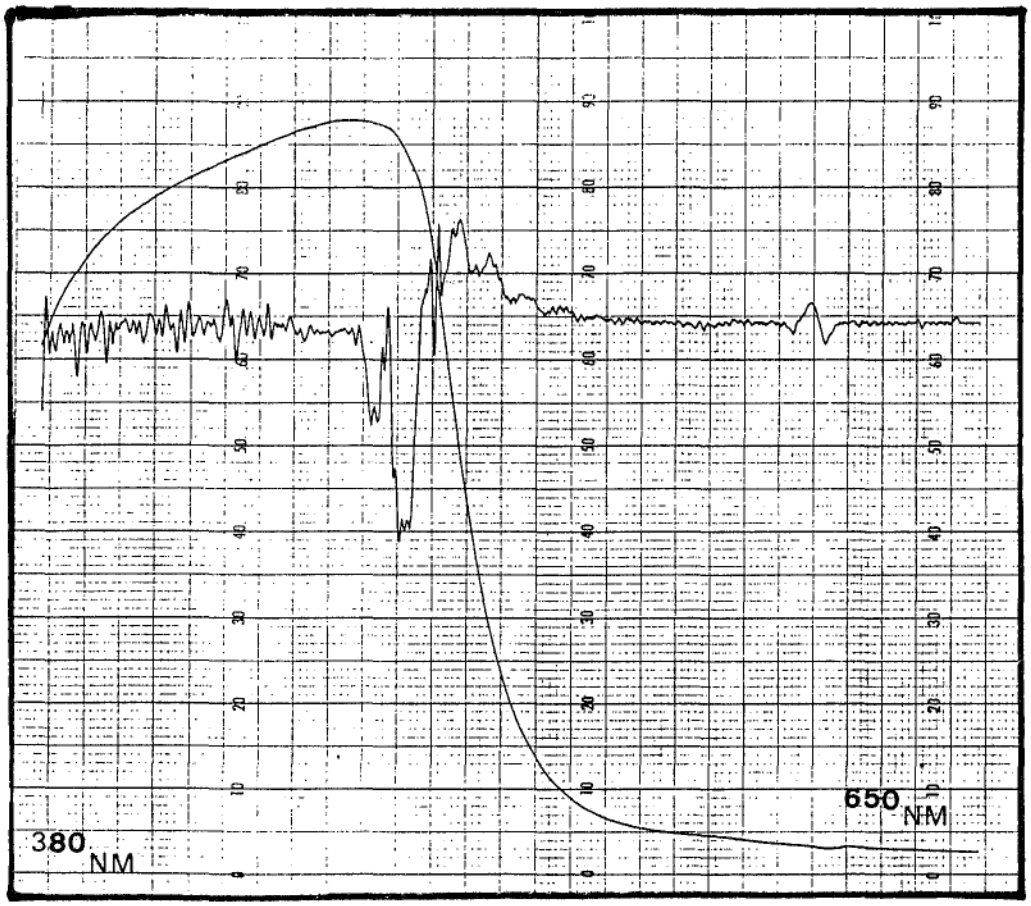
Cyanmethémoglobine. Spectre d'absorption et spectre en dérivée seconde. 650 - 380 nm.

Fig 4



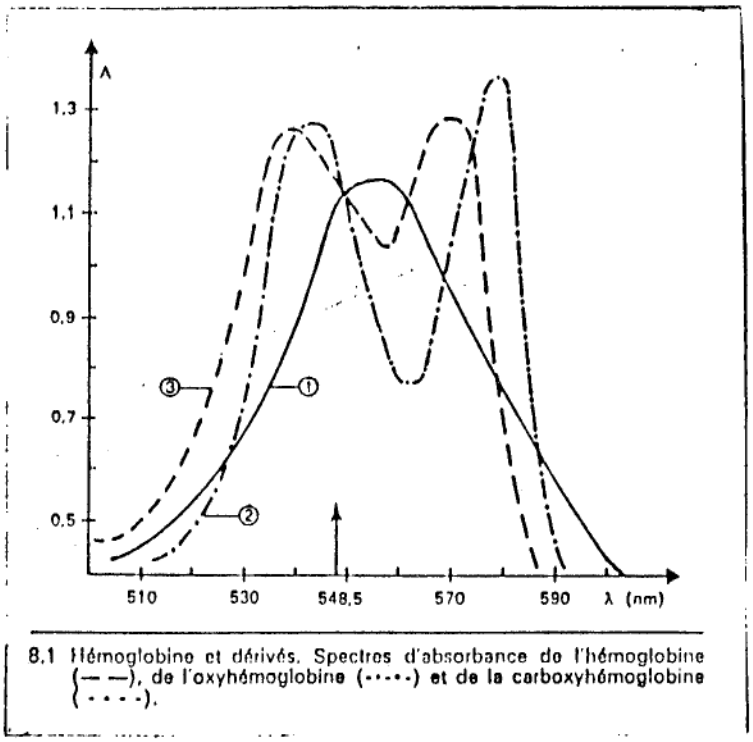
hémoglobine totale. Spectre d'absorption et spectre en dérivée seconde - 650-380 nm.

Fig 5



Bilirubine. Spectre d'absorption et spectre en dérivée seconde de 650 à 380 nm.

Fig 6



8,1 Hémoglobine et dérivés. Spectres d'absorbance de l'hémoglobine (— —), de l'oxyhémoglobine (•••••) et de la carboxyhémoglobine (- - - -).

Fig 3 : Hémoglobine et dérivés - METAIS - Biochimie analytique. Tome 1.

L'étude des spectres que nous avons tracés à l'Uvikon 820 montre pour :

5.4. Hémoglobine totale :

- le spectre d'un hémolysat de globules rouges enregistré entre 600 et 380 nm présente 3 bandes d'absorption vers 575 nm, 540 nm et une bande très nette entre 440 et 400 nm. (fig 5)

L'existence de bandes d'absorption et non de pics s'explique par la présence de différentes formes d'hémoglobine dans l'hémoglobine totale, chacune d'elles absorbant à une longueur d'onde précise.

5.5. <u>Bilirubine</u> :

- la bilirubine étant un produit du catabolisme de l'hémoglobine, il est necessaire de réduire au maximum l'influence de ce composé lors du dosage. La bilirubine absorbe, en effet, dans la bande 490 - 380 nm, avec une zone caractéristique entre 450 et 490 nm - fig 6.

B.I.U. MÉD. GRENOBLE

INTERETS DU DOSAGE D'HEMOGLOBINE DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES

C. INTERETS DU DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES

I. Contrôle de qualité au niveau des centres de transfusion sanguine

La loi impose un taux maximum de 50 mg/l d'hémoglobine pour la commercialisation des plasmas frais congelés.

Il est donc indispensable d'avoir une méthode permettant d'évaluer la teneur en hémoglobine à des taux très bas, de façon précise, compatible avec des dosages en grandes séries.

II. Intérêts en pathologie médicale

2.1. Diagnostic des hémolyses d'origine accidentelles (3)

a) hémolyse bactérienne et parasitaire.

- bactérienne :

Le principal agent bactérien responsable d'hémolyse aux conséquences graves est Clostridium perfringens (C. perfringens). Toute septicémie à C. perfringens peut entrainer une anémie hémolytique qu'il faut surveiller.

- parasitaire :

Lors d'un accès palustre, une anémie en général banal peut apparaître. Lors de la libération des plasmodiums par éclatement du globule rouge, l'hémoglobine se trouve relarguée dans le plasma.

b) hémolyse d'origine toxique.

Les toxiques agissent par altération massive du métabolisme globulaire ou par agression directe de la membrane du globule rouge.

- toxiques professionnels ou accidentels.

L'hydrogène arsénié, l'aniline, le nitrobenzène, le

naphtalène, le plomb, le sulfate de cuivre sont les principaux produits chimiques responsables d'hémolyse importante.

En médecine préventive, il est donc essentiel de surveiller le taux d'hémoglobine des personnels en contact avec ses produits.

- médicaments :

Les sulfamides, les sulfones, la phénylhydrazine et la phénacétine peuvent être la cause d'une hémolyse brutale chez certains sujets.

Le dosage de l'hémoglobinurie est donc indiqué pour prévenir tout risque d'insuffisance rénale aiguë.

- toxines animales et végétales :

Les venins de serpents (vipère, crotale, cobra), les sécrétions organiques d'insectes (araignées, hyménoptères ...), les toxines de certains champignons peuvent entrainer des chocs hémolytiques.

Le taux d'hémoglobine plasmatique aura un intérêt pour évaluer l'étendue de l'agression.

c) hémolyse mécanique.

L'implantation de prothèses cardiaques, de valves, ou de prothèses vasculaires a permis d'augmenter l'espérance de vie de nombreux malades atteints de malformations. La présence d'un"corps"étranger" au sein de l'organisme ne doit pas entrainer la lyse des globules ; le taux d'hémoglobine plasmatique peut alors être considéré comme un marqueur du fonctionnement de cet appareillage.

d) hémolyse immunologique

Lors des conflits immunitaires, la fixation du complexe antigène-anticorps sur le globule rouge entraine sa des-

truction. l'anémie hémolytique néonatale par iso-immunisation foeto-maternelle en est un des exemples les plus typiques connus.

2.2. Surveillance des traitements susceptibles de créer une hémolyse.

a) l'oxygénothérapie hyperbare

Lors du traitement des accidents de décompression, des intoxications au monooxyde de carbone ou des plaie à germes anaérobies, un surdosage en oxygène peut entrainer des lyses globulaires.

Le taux d'hémoglobine plasmatique sera la marqueur de cette lésion.

b) radiothérapie

Les rayonnements utilisés en thérapeutique agressent de façon identique les cellules néoplasiques et les cellules saines. Par la mesure de l'hémoglobinémie et de l'hémoglobine plasmatique, le clinicien pourra juger de l'étendue des effets secondaires de son traitement.

c) hémodialyse

L'épuration extra-rénale est une technique indispensable pour maintenir en vie les insuffisants rénaux aigus en attente de greffe ou non greffables. Ce procédé physique doit être le plus physiologique possible pour éviter d'affaiblir un peu plus les patients.

La mesure de l'hémoglobine plasmatique permet de "tester" différents types de membranes d'hémodialyse afin d'évaluer leur effet mécanique sur les hématies. En effet, le dialyseur ne doit pas altérer les globules rouges lors de leur passage.

Par ailleurs, l'évaluation des dérivés hémoglobini-

ques, après lavage du dialyseur permet d'apprécier le volume de sang résiduel d'un type donné d'appareil. En effet, l'épurateur idéal doit avoir un volume mort le plus faible possible, sinon le patient habituellement anémié verrait son hémoglobinémie chuter.

2.3. Contrôle de qualité en biologie

a)- évaluation d'une nouvelle méthode de dosage au laboratoire :

Par cette technique rapide et précise, il est facile de quantifier l'interférence de l'hémoglobine sur une nouvelle méthode de dosage (exemple : dosage du fer en spectrométrie d'absorption, dosage des carotémïdes...).

b)- validation des résultats :

des taux élevés de potassium sérique ou de LDH peuvent être considérés comme pathologiques si le taux d'hémoglobine plasmatique est normal. On peut ainsi écarter l'interférence d'une discrète hémolyse.

Ces différents exemples montrent que le dosage de l'hémoglobine et que la teneur en hémoglobine plasmatique sont de plus en plus intéressants pour le clinicien. Hier peu demandé en raison du manque de sensibilité, de précision, ce dosage devient aujourd'hui un "outil" apprécié dans différents domaines allant de l'industrie à la médecine.

En médecine, il sera aussi utile à titre prophylactique que thérapeutique. Avec le développement des circulations extra-corporelles en chirurgie cardiaque et la banalisation de l'épuration extra-rénale, il sera le témoin du bon déroulement de ces opérations.

Certes, depuis longtemps les hémolyses et leur évaluation ont pu être diagnostiquées et suivies par le dosage de l'haptoglobine. Toute hémolyse entraine en effet la chute du taux d'haptoglobine par formation d'un complexe haptoglobine-hémoglobine, ce dernier étant dégradé par les macrophages. En évaluant de façon précise le taux d'hémoglobine, marqueur principal et naturel de l'hémolyse, on évite un dosage intermédiaire, source d'imprécision dans l'interprétation, pour poser directement le diagnostic d'hémolyse et envisager ou non un traitement (3, 37, 38).

LES DIFFERENTES METHODES

DE DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE

D. LES DIFFERENTES METHODES DE DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE

I. Transformation de l'hémoglobine en cyanmethémoglobine par la méthode de Drabkin.

Les dérivés hémoglobiniques en présence de cyanure de potassium (KCN) et de ferricyanure de potassium ($Fe(CN)_6 K_3$) sont transformés en cyanmethémoglobine qui absorbe à 540 nm. La limite de détection est de 15 mg/l.

Cette technique est la plus ancienne et la plus classique ; elle sert de référence en Hématologie pour le dosage de l'hémoglobine (9).

Les avantages sont nombreux (48) :

- les réactifs sont réduits à l'utilisation d'une seule solution.
- tous les dérivés de l'hémoglobine sont détectés.
- le maximum d'absorption est stable et bien défini (540 nm).
- la loi de Beer Lambert est respectée même avec un taux d'absorption élevé.
- des solutions stables peuvent être facilement préparées avec de l'hémoglobine cristallisée ou des globules rouges frais.
- la cyanmethémoglobine est un dérivé stable, la lecture faite quelques minutes après addition de sang au réactif pourra être contrôlée quelques jours après en cas de litige.

Cependant, il existe des inconvénients qui ne peuvent être négligés :

- l'utilisation de cyanure de potassium impose des mesures de précaution strictes en raison de sa toxicité.
- la solution de Drabkin est sensible à la lumière. La concentration $\frac{(CN^-)}{\text{tampon}}$ doit être constante.

- la standardisation des étalons par dosage du fer en spectrométrie d'absorption atomique est rendue impossible par l'utilisation de K_3 Fe $(CN)_6$.
- l'automatisation du dosage est délicate, car la vitesse de transformation des dérivés en cyanmethémoglobine est lente (16).

II. Formation d'hématine alcaline D 575.

L'hémoglobine peut être transformée en hématine alcaline par l'eau ammoniacale ou en hématine acide par l'acide chlorhydrique N/10 (coloration brune).

Dès 1947, King (22) et ses collaborateurs avaient noté le manque de fiabilité des techniques basées sur la formation d'hématine acide. Ils développent une méthode basée sur la transformation de l'hémoglobine en cyanhématine alcaline.
La facilité à préparer des solutions étalons est reconnue mais l'inconvénient majeur est la faiblesse de coloration du produit final. En effet, 4 molécules d'hème libèrent 30 % de coloration en moins qu'une molécule d'hémoglobine.

C'est en 1984 que Zander (48) et son équipe proposent la transformation de l'hème, par un détergent alcalin non ionique, en un produit final stable présentant un pic d'absorption caractéristique à 575 nm.
Le dérivé D 575 ainsi obtenu est stable, chimiquement défini, il se forme rapidement (2 mn) quelque soit le type d'hémoglobine concerné. Le détergent apporte à la technique l'avantage de réduire les interférences dues au plasma lui-même et de disperser les micelles lipidiques des sérums lactescents.
La linéarité est vérifiée entre 50 et 250 g d'hémoglobine par litre.

III. Méthodes basées sur les propriétés peroxydasiques du pigment.

3.1. Techniques colorimétriques

Principe général :

L'hémoglobine catalyse l'oxydation d'un chromogène par un péroxyde (H_2O_2 ou péroxydes organiques). L'intensité de la coloration est directement proportionnelle au taux d'hémoglobine.

. pyridine :

Dès 1942, Flind (13) propose une méthode utilisant comme chromogène de la pyridine. En raison du haut pouvoir cancérigène de cette dernière, la méthode est aujourd'hui abandonnée.

. benzidine :

Le dosage en microméthode a été mis au point par Wu (47) en 1923 ; depuis de nombreuses équipes l'ont modifié (Karr - Crosby - Furth Hanks) (21 - 8 - 17).

Crosby et Furth (8) en 1955 proposent :

une lecture à 515 nm

la réalisation de 3 essais par prélèvement.

L'utilisation du mélange méthanol-chloroforme élimine l'interférence des lipoprotéïnes. La sensibilité est telle que des dosages d'hémoglobine entre 20 et 200 mg/l sont possibles. Cependant, des dilutions sont nécessaires afin d'avoir une absorption finale comprise en 0,1 et 0,6.
La présence de bilirubine dans le prélèvement est génante pour le dosage.

Hanks (4) en 1959, améliore la méthode en s'attachant à la qualité du prélèvement et à la qualité de la benzidine (purifiée à l'éthanol). Il préfère la lecture spectrométrique à 700 nm. Le dosage automatisé sera introduit par Spiegel et Tonchen

(41) en 1969.

Les valeurs normales de l'hémoglobine plasmatique sont comprises entre 8 et 46 mg/l par cette méthode.

Tétraméthylbenzidine

Les propriétés cancérigènes de la benzidine ayant été mises en évidence, plusieurs équipes, dont celles de Levinson et Goldman (24), mettent au point une technique basée sur l'utilisation de la tétraméthylbenzidine.Le manque de fiabilité et l'instabilité de la coloration obtenue limitèrent son emploi.

En 1984, Salauze (35)et ses collaborateurs stabilisent la réaction en ajoutant de la déféroxamine. La précision est bonne avec un coefficient de variation de 3 %. Le pourcentage de récupération compris entre 95 et 104 % montre une exactitude excellente. Le seuil de détection est fixé à 0,22 µmole/l.

22' Azino di (3 éthylbenthiazoline 6 sulfonic acid) ou A T B S

Takanayanagi et Renée (42) utilisent l'A T B S comme chromogène. Cette technique offre une linéarité jusqu'à 1 g/l, un minimum détectable de 20 mg/l.

La précision est attestée par un coefficient de variation de 2,39 %, l'exactitude par un pourcentage de récupération de 102 %.

Les valeurs normales de l'hémoglobine plasmatique par la méthode sont comprises entre 0 et 50 mg/l.

La turbidité due à la précipitation des protéïnes plasmatiques et des lipides au pH de réaction (voisin de 2) est éliminée par une centrifugation avant la lecture. De faibles taux d'hémoglobine imposent trois essais par échantillon.

Pour compléter cette étude bibliographique, nous noterons que d'autres chromogènes ont été utilisés tels l'orthotolidine,

le paraaminobenzoate, l'orthodianisidine, le vert malachite, les phénothiazines, le dicarboxidine (1).

Aucune amélioration fondamentale n'est à relever par rapport aux techniques développées.

3.2. Techniques par chimioluminescence

Olson et son équipe (30) ont adapté le phénomène de chimioluminescence à l'hémoglobinométrie.

Le protohème contenu dans les hémoprotéïnes est libéré à pH alcalin, ce dernier exerce ses fonctions catalytiques dans la réaction de chimioluminescence, en présence de luminol et de péroxyde.

L'intensité de la lumière émise est proportionnelle à la concentration en hème.

$$\text{isoluminol} + 2\ R - OOH \xrightarrow[\text{protohème}]{} \text{acide aminophtalic} + N_2 + 2\ ROH + \text{lumière}$$

La méthode est adaptée au dosage de l'hémoglobine dans l'échelle de mesure 0,2 - 400 mg/l ; précision et exactitude sont excellentes.

Le principal inconvénient réside en la nécessité de diluer les échantillons de façon à éviter une surcharge du phototube ; de plus, les conditions expérimentales sont telles que l'isoluminol est utilisé de façon à ne libérer que 5 % de ses possibilités.

IV. Dosage de l'hémoglobine par le fer qu'elle contient.

Selon Metais et ses collaborateurs, l'hémoglobine contenant 0,34 % $(\frac{\text{mole}}{\text{mole}})$ de fer, il est possible d'en évaluer le taux

en connaissant la teneur en fer du prélèvement. Après minéralisation par voie sèche ou humide, les ions ferriques sont dosés par absorption atomique.
Cette technique est malheureusement délicate d'emploi et inadaptée aux grandes séries (verrerie spéciale - lenteur - dosage par excès à la suite de souillure).

V. Méthodes immunologiques.

De part sa composition (protéïque) et sa nature (macromoléculaire), l'hémoglobine constitue un composé particulièrement immunogène. Engler (10) et ses collaborateurs ont mis au point une technique immunologique de dosage.
Les anticorps antihémoglobine A humaine sont synthétisés chez le lapin ; après purification, deux types de dosage immuno-chimique sont envisagés :

. dosage immunonéphélemétrique

L'intensité de la lumière diffusée par le complexe antigène - anticorps est proportionnelle à la quantité de complexe formée, donc à la teneur en hémoglobine.

. dosage par électroimmunodiffusion

Une électroimmunodiffusion est réalisée par la technique de Laurell. Le prélèvement est déposé dans le puit d'une plaque de gélose contenant l'immun-sérum antihémoglobine. La séparation se fait par électrophorèse, la coloration à l'amido - Schwartz met en évidence les "fusées" de précipitation. Le tx d'Hb est proportionnel à la hauteur des pics.

Par immunonéphélémétrie, la courbe d'étalonnage est réalisée pour des valeurs comprises entre 200 et 1500 mg/l. La reproductibilité est excellente, la précision est estimée à 2 %. Le dosage est spécifique, l'interférence de l'haptoglobine est nulle.

Par électroimmunodiffusion, la courbe d'étalonnage est établie entre 50 et 250 mg/l. La reproductibilité est bonne, la précision de l'ordre de 5 %.
La présence d'haptoglobine dans le prélèvement rend le dosage impossible en raison de son interférence.

VI. Méthodes de dosage physique de l'hémoglobine.

Les pigments hémoglobiniques étant naturellement colorés, de nombreuses équipes se sont attachés à développer un dosage de l'hémoglobine par une méthode basée sur des mesures physiques du produit étudié.
La réutilisation possible du prélèvement après lecture, l'absence d'emploi de produits chimiques cancérigènes (benzidine) ou toxiques (cyanure) constituent les deux avantages principaux de ces techniques.

L'apparition de spectrophotomètres avec calculateur intégré de plus en plus performant a permis l'essor de deux méthodologies :

- par mesure directe
- par mesure dérivée.

Les méthodes de dosage par lecture directe :

Spectrométrie classique.

La présence de bilirubine ou de lipides dans les prélèvements constitue la cause principale d'interférence de ce type de dosage. Dès 1953, Shinowara et ses collaborateurs (39) adaptent un principe de mesure basé sur la différence d'absorption à deux longueurs d'onde. Puis les équipes de Levere, Blackney et Khan (33, 4, 19) améliorent le principe, en essayant de corriger l'ab-

sorption due au bruit de fond, en effectuant les lectures à trois longueurs d'onde.
Ces mesures tiennent compte du coefficient d'absorption spécifique à chaque longueur d'onde mais elles nécessitent l'utilisation d'un calculateur car elles sont longues et fastidieuses.
En 1984, Noe (28) met au point un protocole de lecture basé sur la correction d'Allen, il recherche l'absorption spécifique de l'hémoglobine, en éliminant à 380 nm l'absorption des triglycérides et à 470 nm l'absorption de la bilirubine.
Zwart (50) dose l'hémoglobine et ces 5 dérivés principaux par une mesure effectuée à plusieurs longueurs d'onde, un calculateur intégré tenant compte des coefficients d'absorption, rend la mesure plus aisée. Les cooxymètres permettent ainsi les mesures pour de grandes séries mais la sensibilité est faible pour des taux d'hémoglobine bas.

Méthodes par mesure dérivée :

spectrophotométrie dérivée.

Cox (7) en 1982 démontre que l'absorption en dérivée seconde à 577 nm diminuée de l'absorption en dérivée seconde à 561 nm est proportionnelle aux taux d'hémoglobine. La technique est adaptable pour des mesures entre 0 et 1 g/l. Ces travaux seront repris par Sanderink (36) qui, en 1985, et Soloni (40) qui, en 1986, publient ainsi des techniques voisines très sensibles car elles montrent un CV intersérie de 2,9 %.
En 1985, Park (31) réalise un dosage spécifique de la carboxyhémoglobine en utilisant les différentes d'absorption à 4 longueurs d'onde différentes. Cette technique de dérivation très performante permet donc désormais un dosage des dérivés hémoglobiniques dans

la bande 450 - 380 nm.

En 1986, Taulier (43) ajuste une méthode de mesure à trois longueurs d'onde, il corrige ainsi par deux façons, dérivée seconde et lecture à trois longueurs d'onde, les interférences sur le dosage. C'est cette méthode que nous avons étudiée et adaptée sur le spectrophotomètre Uvikon 820 Roche Kontron (R).

Mathématiquement, la dérivée représente la pente d'une tangente en un point donné d'une courbe. Elle sera positive lorsque la courbe est ascendante négative si la courbe est descendante et nulle pour un point correspondant à un maximum ou à un minimum (12).

Pour un spectre d'absorption gaussien, l'intensité obtenue après n dérivation est inversement proportionnelle à la largeur de la bande L, élevée à la puissance n.

$$I^n = K L^{-n}$$

Pour deux espèces A et B en solution, l'intensité obtenue après n dérivation est :

$$\frac{I_A}{I_B} = \left(\frac{L_B}{L_A}\right)^n$$

La dérivée d'une constante étant nulle, l'interférence due au bruit de fond est ainsi supprimée au profit du signal. Il est ainsi possible d'étudier une substance ne donnant qu'un léger épaulement sur un spectre classique en raison soit d'une faible concentration soit d'une absorption importante du bruit de fond.

L'application que nous avons réalisée est entièrement basée sur ce principe.

MATERIEL ET METHODES

E. MATERIEL ET METHODES

I. Matériel

Le spectrophotomètre est un appareil Uvikon 820 couplé à un enregistreur "Recorder 21" tous deux commercialisés par la maison Roche Kontron.

Les micro-pipettes utilisées sont de marques Eppendorf.

Nous travaillons avec des tubes à hémolyse plastiques (CML de 5 ml) et des microcuves à usage unique de 1,6 ml.

Etalons d'hémoglobine:

Les solutions étalons sont préparées par lyse des globules rouges selon la technique suivante :

- le culot de globules rouges est lavé trois fois en eau physiologique puis hémolysé comme suit :

1 volume de globules rouges lavés

1,5 volume d'eau distillée

1 volume de CCL_4

AGITER 3 à 4 minutes dans un tube à centrifuger bouché, au Vortex

Centrifuger à 3 000 - 3 500 tours/mn pendant 20 mn

Recueillir le surnageant

Ajuster le taux d'hémoglobine à 4 % avec de l'eau distillée.

Remarque :

L'utilisation du tétrachlorure de carbone (CCl_4) impose l'emploi de tubes en verre pour l'hémolyse.

- l'hémolysat à 4 % environ est ensuite dosé sur un cooxymètre 2 500 Corning (6).

- l'étude s'interessant à des valeurs comprises entre 0 et 100 mg/l d'hémoglobine, cette solution mère stable au moins 7 j à + 4° C est diluée au 1/400 (en flacon jaugé) dans de l'eau distillée.

- Etalon cyanmethémoglobine
  Hémotrol Bio Mérieux(R) titrant 604 mg/l que nous diluons au 1/6.

- Réactif de Drabkin modifié
  Cyanure de potassium : 50 mg

  Ferricyanure de potassium : 200 mg
  Phosphate monopotassique : 140 mg
  Stérox : 0,5 ml
  Eau distillée Q S P : 1 000 ml

- Bilirubine
  Ultimate (R) Bilirubin calibrator C_8 Beckman titrant 128,3 mole/l - lot N° $C_{60\ 82\ 60}$

II. Prélèvements

2. 1. Sang :

Le sang du patient est recueilli par ponction veineuse à l'aide d'une aiguille à plateau dans un tube hépariné. Les premiers cm^3 de sang étant rejetés afin d'éviter un dosage par excès due à l'hémolyse.

Après centrifugation 10 mn à 3 000 tours/mn, le plasma est immédiatement décanté dans un tube à hémolyse de 5 ml.

2. 2. Urines :

Le dosage sera effectué sur une aliquote d'urine prélevée dans une cantine sèche et transférée dans un tube en plastique (tube à ionogramme urinaire). Une centrifugation à 3 000 tours/mn pendant 10 mn précède le dosage.

2. 3. Dialysat :

Dans le cas de la mesure du volume de sang résiduel (cf : protocole Annexe I), le dyalisat recueilli dans un flacon plastique de 20 ml est préalablement centrifugé avant d'être dosé.

III. Méthodes

L'Uvikon 820 possède 8 canaux programmables indépendants les uns des autres, sur le canal 8 après plusieurs expérimentations, nous avons sélectionné le programme suivant :

Rescale : 1,1

Zéro suppress : 60,0

Time constant : 0,2

Format : A_4

Dérivative : 2/3,5

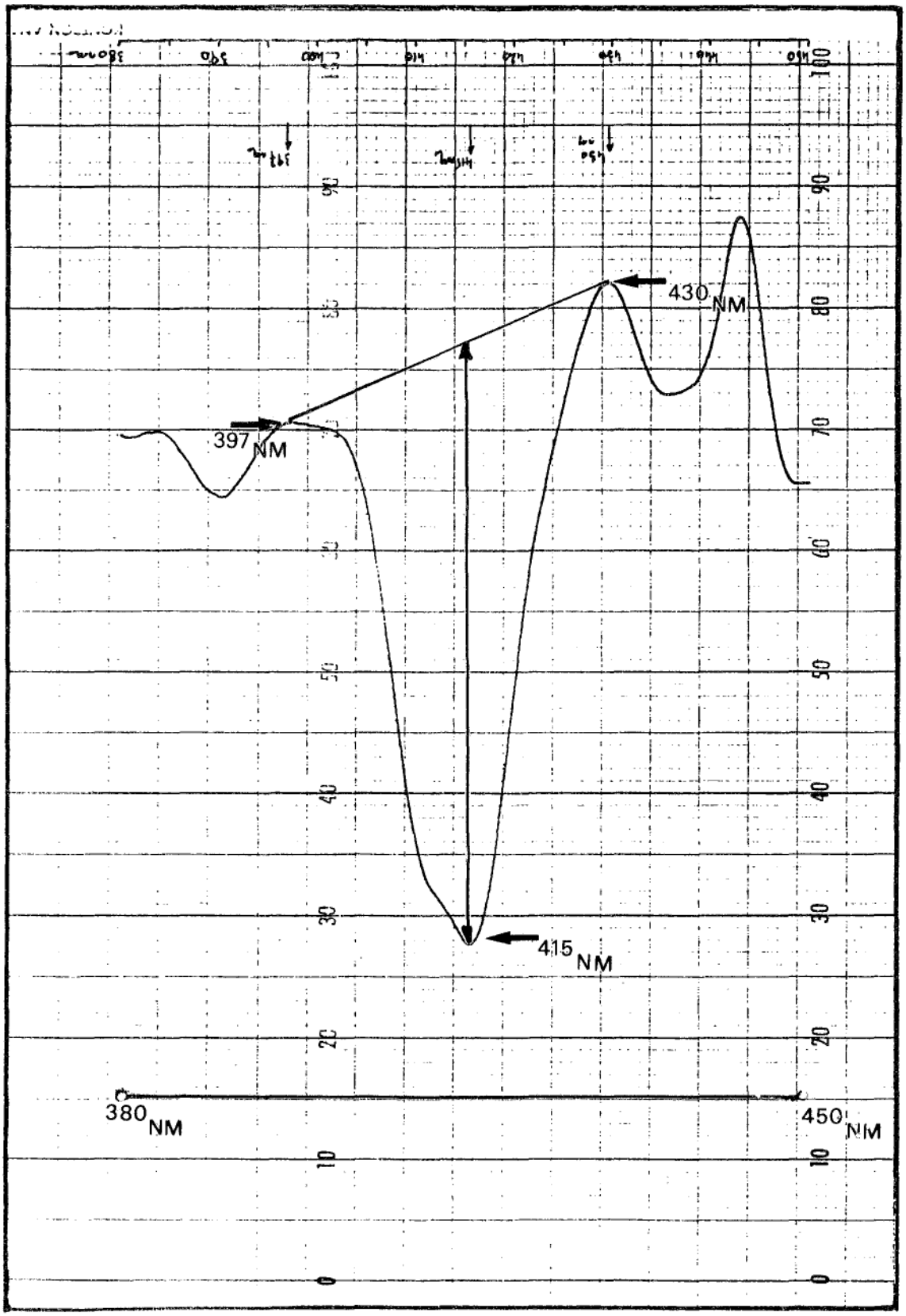
Scan speed : 100

λ scan : 380 - 450

Sbw : 2

L'étude critique du choix du programme sera envisagée avec la partie discussion de ce travail.

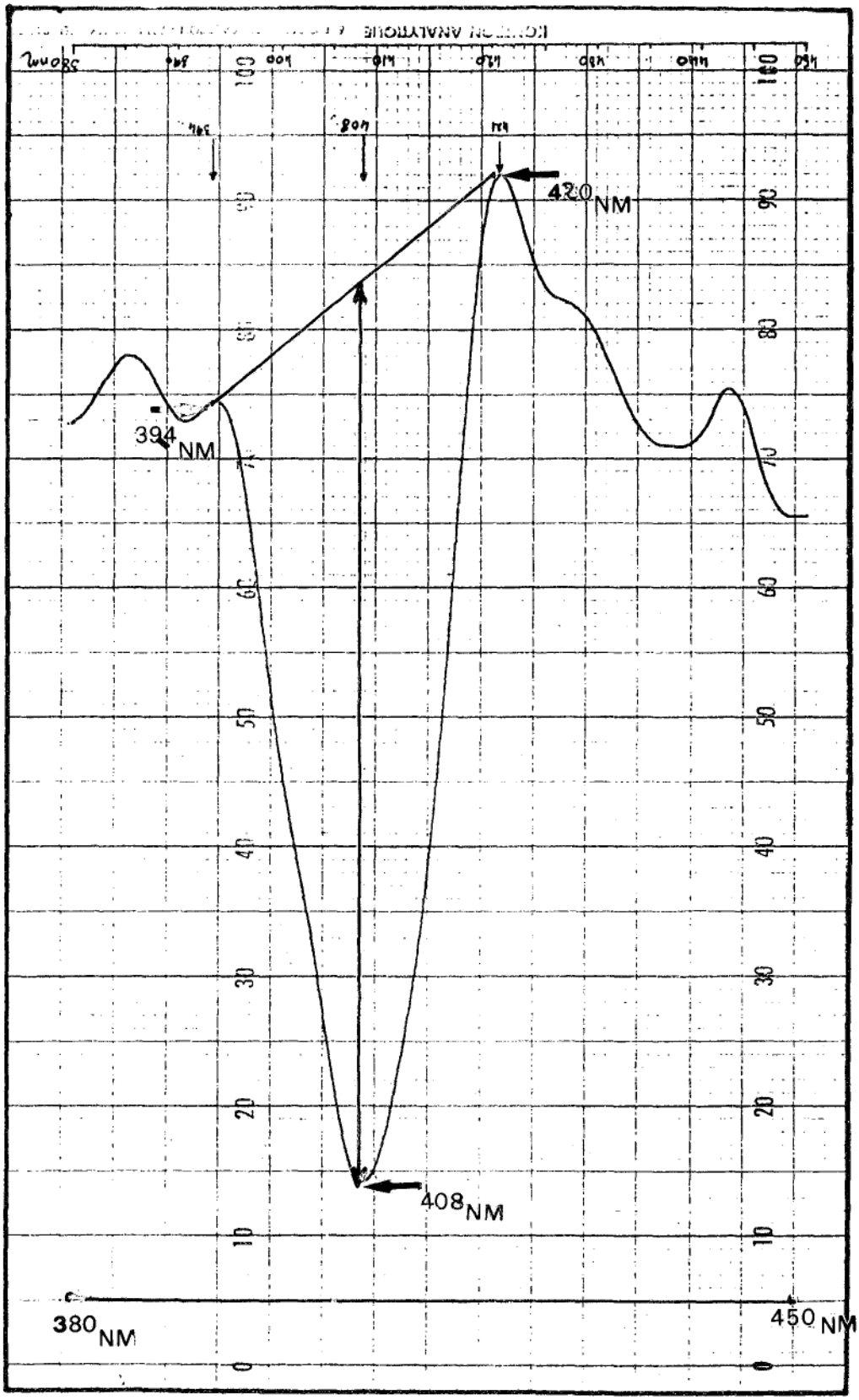
Après avoir fait l'auto-zero sur 2 cuves à usage unique contenant



Cyanmethémoglobine. Spectre dérivée seconde.

Dosage.

Fig 7



Hémoglobine totale. Spectre dérivée seconde

Dosage.

Fig 8

1 ml d'eau distillée, nous traçons les spectres respectifs en dérivée seconde de 1 ml de plasma et de 1 ml d'urine traitée au réactif de Drabkin.

La cuve de référence contenant 1 ml d'eau distillée.

Remarque :

L'échantillon d'urine est préparé de la façon suivante :

2 ml d'urine

5 µl de solution de Drabkin

Incubation 20 mn à température ambiante.

L'échantillon de dialysat est techniqué comme un plasma.

La courbe en dérivée seconde de l'hémoglobine présente 2 maximums vers respectivement 394 et 420 nm, et un minimum vers 408 nm. En utilisant la méthode des tangentes, on mesure la distance entre la droite joignant les 2 maximums et le minimum. Cet intervalle de mesure est proportionnel à la concentration. (fig 8)

La courbe en dérivée seconde de la cyanméthémoglobine montre deux maximums vers 400 et 430 nm, et un minimum vers 415 nm. La distance entre la droite joignant les deux maximums et le minimum est également proportionnelle à la concentration. (fig 7)

Après avoir tracé les courbes d'étalonnage en hémoglobine et cyanmethémoglobine, il suffit de reporter les résultats des mesures sur le graphe pour connaitre la teneur en composé du produit dosé.

RESULTATS

F. RESULTATS

Remarques préliminaires :

Dans cette étude, nous avons utilisés comme système d'unité le mg/l car l'ensemble des travaux publiés et la pratique l'ont conservé, cependant nous rappelons que le système intertional d'unité utilise le Mmole/l.

1 mmole/l d'hémoglobine = 64 456 mg/l

L'ensemble des calculs de probabilité utilisé pour valider la technique a été réalisé sur les lectures brutes (en mm) et non sur leur correspondance en mg d'hémoglobine.

I. Dosage dans le sang et les dialysats

1.1. Evaluation de l'imprécision sur la mesure de l'hémoglobine totale.

1.1.1. Essai de répétabilité

La société française de biologie clinique définit ainsi la répétabilité :

"Expression quantitative de la précision lorsque le même opérateur applique la technique sur le même échantillon, dans le même laboratoire, avec les mêmes appareils et les mêmes réactifs au cours de la même série d'analyses".

Nous effectuons vingt mesures en une seule série, d'une solution diluée au 1/400 d'hémoglobine titrant 38 g/l (tableau I).

L'essai de répétabilité nous conduit aux résultats suivant :

taux d'hémoglobine trouvé : 94,05 mg/l CV = 0,22

taux d'hémoglobine théorique : 95 mg/l

1.1.2. Reproductibilité

Résultats expérimentaux en mm	M	V	6	CV
156 - 156,5 - 156,5 - 156,5 - 157 - 157 - 157 - 157 - 156,5 - 157 - 157 - 157 - 157 - 156,5 - 157 - 157 - 157 - 156,5 - 156,5 - 157 - 156 -	156,7	0,12	0,34	0,22

TABLEAU I

Essai de répétabilité - solution hémoglobine 95 mg/l.

I — Valeurs en mm / jour	J 1	J 2	J 3	J 4	J 5	Moyenne des 5 jours
	180,5 183,5 180,5 183 181 183,5	184 182,5 184,5 182,5 184,5 182,5	182,5 181,5 180,5 181,5 180,5 181,5	180,5 180 180,5 180,5 180 180,5	176 176 175,5 175,5 175,5 176	
M	182	183,4	181,3	180,3	175,8	180,6
V	2,2	1,04	0,57	0,07	0,08	7,72
6	1,48	1,02	0,75	0,26	0,27	2,77
CV	0,81	0,56	0,42	0,14	0,16	1,54

II — Valeurs en mm / jour	J 1	J 2	J 3	J 4	J 5	Moyenne des 5 jours
	45 46 45 45,5 45 45,5	45,5 45 45 45 45 45	44,5 44 44 44 44,5 44	43 42,5 42,5 42,5 42,5 42,5	39,5 39,5 38,5 39 39,5 39,5	
M	45,33	45,41	44,17	42,58	39,25	43,35
V	0,17	0,24	0,07	0,04	0,18	5,55
6	0,41	0,49	0,26	0,20	0,42	2,35
CV	0,90	1,08	0,58	0,48	1,06	5,44

III — Valeurs en mm / jour	J 1	J 2	J 3	J 4	J 5	Moyenne des 5 jours
	10,5 10,5 10,5 10 10,5 10	10 9,5 9,5 9 10 9	9 9 8,5 8 9 8	8 8,5 8,5 8 8,5 8	7 7 7 7 7,5 7,5	
M	10,33	9,5	8,58	8,25	7,08	8,77
V	0,07	0,2	0,24	0,08	0,04	1,32
6	0,25	0,45	0,49	0,27	0,20	1,15
CV	2,50	4,70	5,73	3,32	2,88	13,12

TABLEAU II

Essai de reproductibilité de la solution d'hémoglobine :
I : Hémolysat à 100 mg/l
II : Hémolysat à 25 mg/l
III : Hémolysat à 6,25 mg/l

Définition de la société française de biologie clinique :

"Expression quantitative de la précision lorsque la technique est réalisée dans diverses conditions qui doivent être définies. La reproductibilité intra-laboratoire est calculée dans un même laboratoire à partir des résultats des aliquotes d'un même échantillon, distribuées au hasard dans les séries d'analyses de spécimens de patients (reproductibilité intrasérielle) soit "dans la journée", soit "jour après jour", soit en fonction des séries pendant plusieurs jours consécutifs (reproductibilité intersérielle)".

Nous préparons trois solutions filles d'hémoglobine, et effectuons 10 séries de 3 dosages de chaque solution pendant 5 jours (tableau II).

1.2. Evaluation du domaine d'analyse.

1.2.1. Limite de détection

Si l'on considère que la limite de détection équivaut à trois fois l'écart type (35), intersérie, à 3 mg/l, elle sera de 3 x 0,49 = 1,5 mm, c'est à dire 1,2 mg/l.

1.2.2. Limite de linéarité

Définition :

"Limites de validité à une probabilité donnée de la relation linéaire des valeurs théoriques aux valeurs observées. Elles sont établies à partir de dilutions du produit à mesurer dans une matrice adaptée ou à partir de solutions primaires."

Nous avons démontré que la technique est linéaire entre 0 et 100 mg/l : elle l'est sans doute pour des taux supérieurs d'hémoglobine

Solution titrant / mesure en mm/jour	95 mg/l	47,5 mg/l	24 mg/l	12 mg/l	6 mg/l	3 mg/l
J 1	158 159 157,5	78 77,5 78,5	38 37,5 38	18 17,5 17,5	8 8 8	3,5 3,5 3,5
J 2	160 158 158	79,5 79 79	39 38,5 37	19 19 18,5	9 9 9	4 3,5 3,5
J 3	159 158 159	78 78,5 79	38 38 38,5	18 18 18,5	9 9 9	3,5 4,5 4,5
moyenne en mm	158,5	78,55	38	18,2	8,70	3,9
V	0,625	0,40	0,34	0,32	0,25	0,24
6	0,79	0,63	0,58	0,56	0,50	0,49
CV	0,50	0,80	1,53	3,1	5,77	12,5

TABLEAU III

Etude de linéarité d'une solution aqueuse d'hémoglobine

N° tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9
eau en l	0	250	500	750	1000	1250	1500	1750	2000
Hb à 95 mg/l en l	2000	1750	1500	1250	1000	750	500	250	0
mesure en mm	158	136,5	117	96	77	56,5	36,5	18	0
mg hémoglobine	95	82	71	58	47,5	34,5	22	11	0
mg Théorique	95	83	71	59	47,5	36	24	12	0
% de récupération	100	99	100	98	100	96	91	91	0

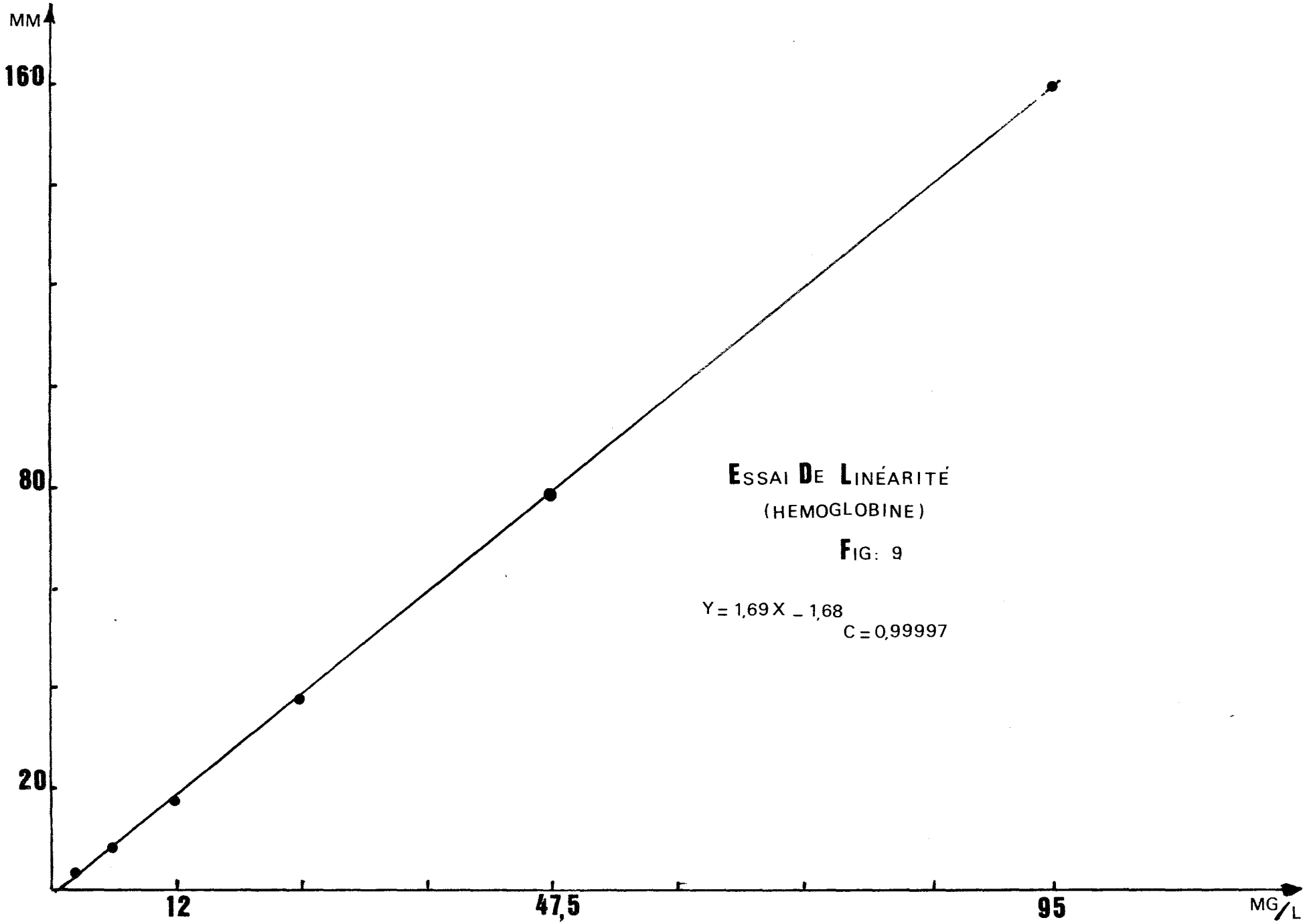
TABLEAU IV

N° tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9
sérum en l	0	250	500	750	1000	1250	1500	1750	2000
Hb à 95 mg/l en l	2000	1750	1500	1250	1000	750	500	250	0
mesure en mm	156	154	134	114	94	75	54,5	34	14*
mg d'hémoglobine	95	84,3	72,3	60,3	48,3	37,3	24,3	12,3	0
mg théorique	95	83	71	59	47,5	36	24	12	0
% de récupération	100	101	102	102	102	104	101	102	0

TABLEAU V

Exactitude de la méthode de dosage de l'hémoglobine :
en milieu aqueux (tableau IV)
en milieu protéïque (tableau V)

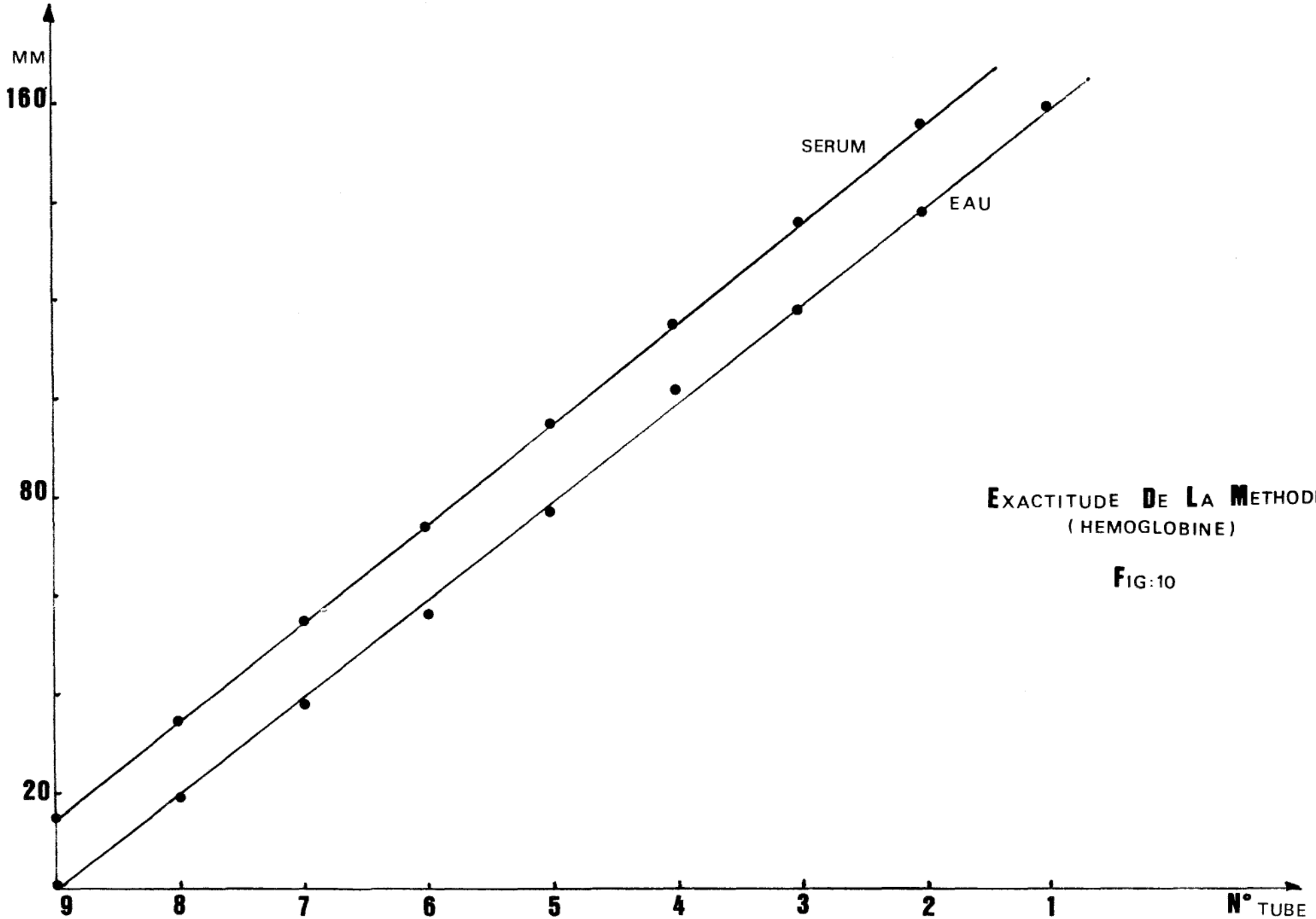
* correspond à la teneur en hémoglobine du pool de plasma. Les résultats sont exprimés en tenant compte de cette correction.



ESSAI DE LINÉARITÉ
(HEMOGLOBINE)

FIG: 9

Y = 1,69 X _ 1,68
C = 0,99997



EXACTITUDE DE LA METHODE
(HEMOGLOBINE)

FIG:10

mais le programme utilisé avec la table traçante est tel que pour des taux supérieurs à 110 mg/l, la mesure n'est plus possible sur le graphe sans changer le programme de calculs de l'appareil (valeur de zéro et expansion).

Nous préparons trois échantillons d'hémoglobine à 95 mg/l et nous réalisons une série de 6 solutions de concentrations décroissantes dans le domaine de mesure souhaité.

Chaque jour pendant trois jours, nous effectuons l'analyse des trois exemplaires de chaque solution (tableau III).

La courbe d'étalonnage est une droite d'équation

$y = 1,69\ x - 1,68$

c : 0,99997

(fig 9).

1.3. Exactitude et application au milieu protéïque

1.3.1. Surcharge d'hémoglobine dans l'eau

(tableau IV)

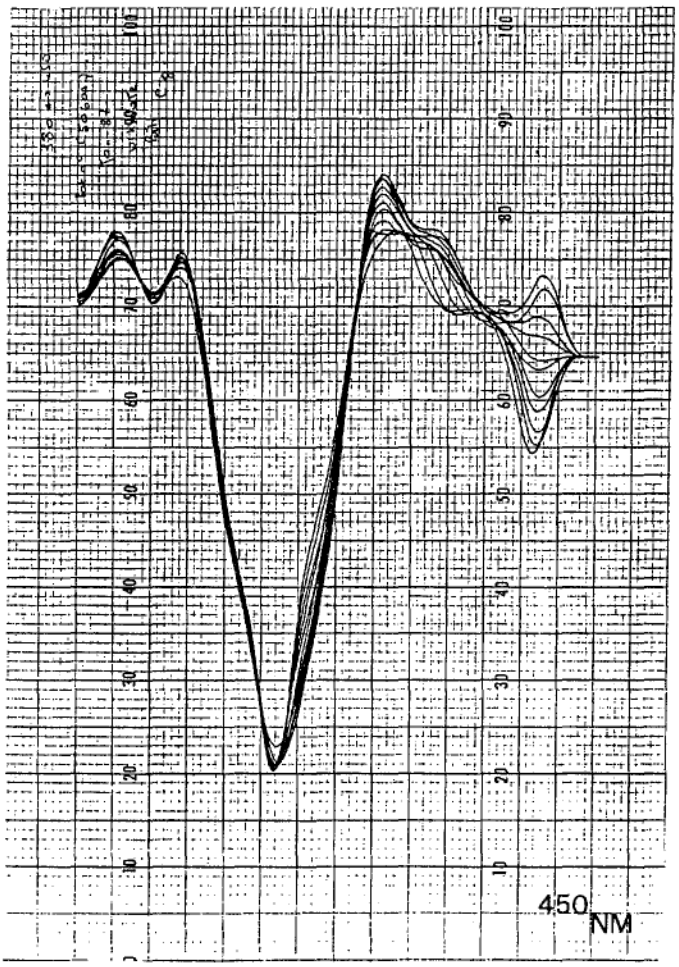
L'ensemble des différentes surcharges d'hémoglobine conduit à un pourcentage de récupération moyen de 97 %.

1.3.2. Surcharges d'hémoglobine dans un pool de plasma

Le pool de plasma est constitué d'une vingtaine de plasma de la série du jour que nous centrifugeons avant de réaliser les ajouts (tableau V).

L'ensemble des différentes surcharges d'hémoglobine conduit à un pourcentage de récupération voisin de 100 %.

Le milieu protéïque ne modifie ~~pas~~ ni les pourcentages de récupération ~~et~~ ni la pente de la droite d'étalonnage préparée en milieu aqueux de façon significative, de ce fait, cette courbe étalon sera utilisable pour les plasmas et les dialysats (fig 10).



Interférence de la Bilirubine sur le dosage de l'hémoglobine

Surcharge de bilirubine sur un sérum.

Fig 11

MESURES EN MM	Valeur moyenne
9 - 8 - 5 - 8 - 7 - 9 - 9 - 11,5 - 10 - 8 9 - 13 - 6 - 8 - 4 - 2,5 - 7 - 2,5 - 7 - 5	7, 4

TABLEAU VI

Hauteur des pics en mm pour des valeurs normales d'hémoglobine dans le plasma

1.4. Sélectivité de la méthode

L'étude des spectres d'absorption montre que dans la bande 450 - 380 nm, la bilirubine, catabolite de l'hémoglobine risque d'influencer le dosage.

L'influence de la bilirubine est étudiée par surcharge d'une solution d'hémoglobine, par de la bilirubine étalon C8 Beckman dosée à 75 mg/l soit 128 µmole.l.

Nous surchargeons par ajouts de 50 µl une solution d'hémoglobine (cf fig 11), jusqu'à obtenir un seuil pathologique significatif.

. La solution d'hémoglobine de départ titre 85,5 mg/l (143 mm mesuré sur le spectre)

. Après 7 ajouts de 50 µl, la déviation est de 151 mm soit 90,25 mg/l

. Une solution de bilirubine à 45 µmole/l entraine une erreur par excès de 5,6 %

1.5. Valeurs normales

Les valeurs normales du taux d'hémoglobine plasmatique sont établies à la suite du dosage de vingt plasmas prélevés chez des patients venant en consultation externe et supposés indemnes de maladies hémolytiques (tableau VI).

Valeurs normales : 0 - 5 mg/l

II. Dosage de l'hémoglobine dans l'urine.

2.1. Evaluation de l'imprécision sur la mesure de la cyanmethémoglobine.

2.1.1. Essai de répétabilité
****

Nous effectuons 20 mesures en une seule série d'une

Résultats exprimés en mm	m	v	6	CV
181 - 181 - 181 - 181 - 180,5 - 179,5 - 180 - 180 - 179 - 180 - 180,5 - 180 - 180,5 - 180,5 - 180 - 181 - 181,5 - 180 - 181 -	180,45	0,39	0,63	0,35

TABLEAU VII

Essai de répétabilité - solution de cyanmethémoglobine 101 mg/l

I — valeurs en mm / jour	J 1	J 2	J 3	J 4	J 5	Moyenne des 5 jours
	84,5 86 84 85,5 83,5 84	85,5 86 85,5 85,5 84,5 84,5	85 85 85,5 85,5 85,5 85,5	85,5 84,5 85,5 85 84,5 84,5	84 83 83,5 83 83,5 83	
M	84,58	85,25	85,33	84,91	83,33	84,68
V	0,94	0,375	0,06	0,24	0,17	0,85
6	0,97	0,612	0,257	0,49	0,41	0,92
CV	1,15	0,72	0,30	0,57	0,49	1,09

II — valeurs en mm / jour	J 1	J 2	J 3	J 4	J 5	Moyenne des 5 jours
	20 19,5 20 20 20 20	20 19,5 20 20 20 20	20 19,5 19,5 19,5 19,5 19,5	20 19 20 19 20 19	19 19,5 18,5 18 18,5 18,5	
M	19,91	19,92	19,58	19,50	18,67	19,51
V	0,04	0,04	0,04	0,30	0,27	0,34
6	0,2	0,2	0,20	0,55	0,52	0,60
CV	1,02	1,02	1,04	2,80	2,77	2,97

III — Valeurs en mm / jour	J 1	J 2	J 3	J 4	J 5	Moyenne des 5 jours
	3,5 4,0 3,5 4,0 4,0 4,0	4 4 4 4 4 4,5	3,5 4 3,5 4 3,5 4	3,5 3,5 4 4 3,5 4	4 3,5 3,5 3 3,5 3,5	
M	3,23	4,08	3,75	3,75	3,5	3,78
V	0,06	0,04	0,075	0,075	0,1	0,098
6	0,26	0,20	0,27	0,27	0,32	0,31
CV	6,74	4,99	7,30	7,30	9,04	8,27

TABLEAU VIII

Essai de reproductibilité de la solution de cyanmethémoglobine

I : solution à 50 mg/l
II : solution à 11,5 mg/l
III : solution à 3,12 mg/l

Solution titrant / mesure en mm/jour	101mg/l	50 mg/l	25 mg/l	12,5 mg/l	6 mg/l	3 mg/l
J 1	182 183 182	91,5 93 92	44,5 45 45,5	21 21 22	9,5 9 10	4 4,5 4,5
J 2	180,5 181 181	91,5 90,5 90,5	44,5 43 44,5	21 20,5 20,5	9,5 9 9	4 3,5 3,5
J 3	182,5 181,5 182,5	91,5 89 91,5	45,5 44 44,5	21,5 21 20,5	9,5 9,5 9	4 4 4
moyenne en mm	181,8	91,2	44,55	21	9,33	4
V	0,69	1,26	0,59	0,25	0,125	0,125
6	0,83	1,12	0,77	0,50	0,35	0,35
CV	0,46	1,23	1,72	2,38	3,79	8,83

TABLEAU IX

Etude de linéarité d'une solution aqueuse de cyanmethéloglobine.

100 mg/l	50	25	12,5	6	3
182	91,5	44,5	21	9,5	4
183	93	45	21	9	4,5
182	92	45,5	22	10	4,5
180,5	91,5	44,5	21	9,5	4
181	90,5	43	20,5	9	3,5
181	90,5	44,5	20,5	9	3,5
182,5	91,5	45,5	21,5	9,5	4
181,5	89	44	21	9,5	4
182,5	91,5	44,5	20,5	9	4
m = 181,8 v = 0,69 6 = 0,83 cv = 0,46	m = 91,2 v = 1,26 6 = 1,12 cv = 1,23	m = 44,55 v = 0,59 6 = 0,77 cv = 1,72	m = 21 v = 0,25 6 = 0,5 cv = 2,38	m = 9,33 v = 0,125 6 = 0,35 cv = 3,79	m = 4 v = 0,125 6 = 0,35 cv = 8,83

Linéarité - solution de cyanhémoglobine $\frac{604}{6}$ mg/l

TABLEAU IX bis

solution diluée au 1/6 de cyanmethémoglobine titrant 604 mg/l (tableau VII).

L'essai de répétabilité nous conduit aux résultats suivants :

taux d'hémoglobine trouvé : 100 mg/l CV = 0,35

taux d'hémoglobine théorique : 101 mg/l

2.1.2. Essai de reproductibilité
****

Nous préparons trois solutions filles d'hémoglobine, et effectuons 10 séries de 3 dosages de chaque solution pendant 5 jours (tableau VIII).

2.2. Evaluation du domaine d'analyse

2.2.1. limite de détection
****

D'après les références citées pour l'hémoglobine totale, elle équivaut à trois fois l'écard type intersérie à 3 mg/l soit 3 x 0,35 = 1,05 mm soit 1 mg/l.

2.2.2. limite de linéarité
****

Nous préparons trois échantillons de cyanmethémoglobine à 101 mg/l et nous réalisons une série de 6 solutions de concentrations décroissantes dans le domaine de mesure souhaité (1 - 101 mg/l). Chaque jour, pendant trois jours, nous effectuons l'analyse des trois exemplaires de chaque solution (tableau IX).

La courbe d'étalonnage (tableau IX bis) est une droite d'équation

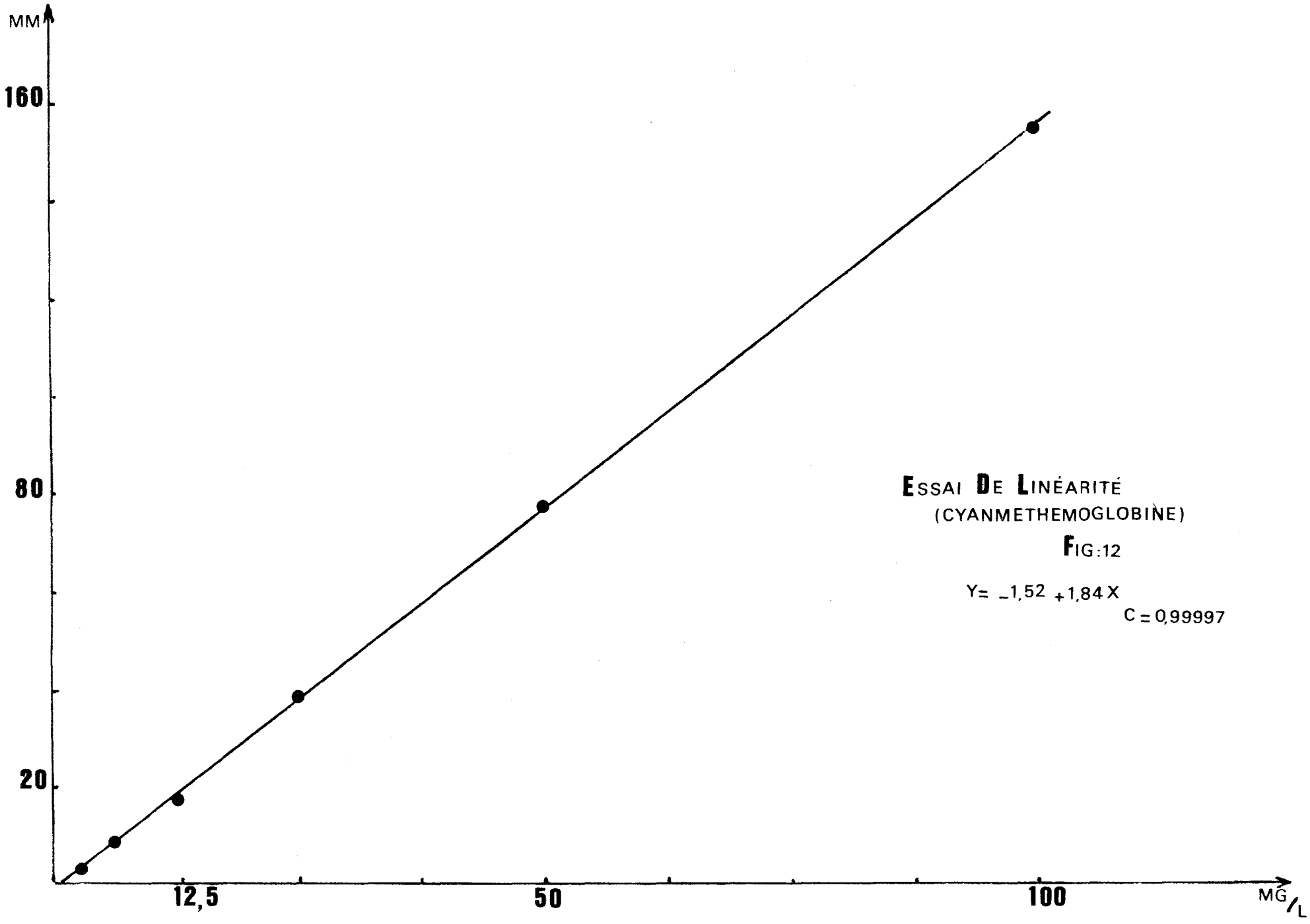
$y = 1,52 + 1,84 x$

c : 0, 99997

Fig 12.

2.3. Exactitude du dosage.

2.3.1. dans l'eau
****



Essai De Linéarité
(CYANMETHEMOGLOBINE)

Fig:12

$Y = -1,52 + 1,84X$

$C = 0,99997$

N° tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9
eau en l	0	250	500	750	1000	1250	1500	1750	2000
cyanHb en l (101mg/l)	2000	1750	1500	1250	1000	750	500	250	0
mesure en mm	182	159	136	114	91	68,5	45,5	21,25	0
mg cyan Hb	101	88	75,5	63	50,5	38,0	25	11,75	/
mg théorique	101	87,5	75	62,5	50	37,5	25	12,5	/
% de récupérat°	100	100	101	101	100	101	100	94	/

TABLEAU X

N° tube	1	2	3
cyan Hb 101 mg/l en l	125	250	500
Urine	875	750	500
mesure en mm	28	47	87
mg cyan Hb	15,5	26	49
mg Théorique	15	25	50
% Extract°	103	104	98

TABLEAU XI

Exactitude de la méthode de dosage de la cyanméthémoglobine :
- en milieu aqueux (Tableau X)
- en milieu urinaire (Tableau XI)

Nous réalisons des surcharges de cyanmethémoglobine dans l'eau (tableau X).

L'ensemble des différentes surcharges conduit à un pourcentage de récupération moyen de 100 %.

2.3.2. Dans l'urine

Nous vérifions que l'urine, milieu aqueux, n'influe pas par ses autres composants sur le dosage.

Les surcharges sont réalisées par une solution étalon de cyanmethémoglobine titrant 604 mg/l diluée au 1/6 (tableau XI).

Le pourcentage de récupération moyen s'élève à 101 %.

D I S C U S S I O N

G. DISCUSSION

I. Choix des conditions de dérivation.

La dérivation est une fonction mathématique qui met en valeur les rapides changements de direction de la courbe et supprime les faibles variations.

Dans son étude, Taulier (42) rappelle qu'un des avantages de la spectrométrie dérivée réside dans l'amplification des bandes étroites par rapport aux bandes larges.

Pour une bande spectrale de largeur à mi-hauteur L, présentant une absorbance I à une longueur d'onde donnée, l'intensité In du signal obtenu après n dérivations est :

$$I_n = K \times \frac{I}{L^n} \quad (1)$$

Pour deux bandes correspondant aux substances A et B, le rapport des intensités est fonction du rapport des valeurs L_A et L_B.

$$\left(\frac{I_A}{I_B}\right)_n = \frac{I_A}{I_B} \times \left(\frac{L_B}{L_A}\right)^n \quad (2)$$

L'hémoglobine vers 410 nm présente une bande d'absorption étroite, alors que le spectre de la coloration propre de l'urine ou du plasma s'étend sur une zone plus large.

L'augmentation de l'ordre de la dérivée favorise donc la mesure du signal obtenu pour l'hémoglobine aux dépends de celui du fond coloré.

Choix de l'ordre de la dérivée :

Il est nécessaire, pour deux raisons principales, de limiter la valeur de l'ordre de la dérivée.

a) si l'intensité relative du signal se trouve amplifiée (formule (2)), sa valeur absolue diminue (formule (1)) et devient impossible à mesurer avec précision.

b) l'irrégularité de la ligne de base liée aux fluctuations de l'intensité lumineuse ou de l'amplification électronique représente le bruit de fond de l'appareil.
Ce phénomène présente une largeur de bande voisine, très faible, par dérivation, il va être d'autant plus augmenté.
Le rapport signal/bruit de fond diminue rapidement lorsque l'ordre de la dérivée augmente.

La dérivée seconde donne une intensité de mesure suffisante pour l'hémoglobine et une pente très faible pour le bruit de fond (42). cette dérive résiduelle de la ligne de base peut être corrigée par la méthode des tangentes.

Choix de la largeur de la bande et de la vitesse de déroulement du spectre.

Selon Sanderink (36), la résolution du spectre en dérivée seconde dépend de la largeur de bande et de la vitesse de déroulement du spectre. Nous nous sommes fixés après différents essais une fente (sbw) de 2 nm et une vitesse de 100 nm/mn.

Choix de la fenêtre de lissage :

Le système de calcul qui ne connait pas l'équation de la courbe à dériver doit procéder par analyse successive des différentes positions du spectre en appliquant la formule générale de la dérivation. Il faut donc choisir une fenêtre de lissage représentant la portion

sur laquelle le système de calculs, analyse la courbe et trace la dérivée.

Comme le rappelle Ficheux (12) :

- une fenêtre de lissage trop petite risque de surcharger le spectre et de conduire à une mauvaise reproductibilité.
- une fenêtre trop large risque d'éliminer des pics parmi lesquels le ou les pics caractéristiques de la substance à doser et donc de perdre en qualité de résolution.

L'appareil permettant de choisir une fenêtre entre 0,2 et 4 nm, le spectre original étant relativement plat, divers essais nous ont conduit à choisir un intervalle de 3,5 nm.

Réglages annexes :

- Expansion : "rescale"

L'expansion en ordonnée sur l'enregistreur des valeurs photométriques est fixé à 1,1 ce qui correspond à une expension maximale pour 100 mg/l d'hémoglobine.
Ainsi, ns ns limitons pour le dosage de forts taux d'hémoglobine, mais des traces de dérivés hémoglobiniques seront facilement détectées.

- Décalage de zéro : "zero suppress"

Le décalage de zéro est fixé à 60 %, car cette correction nous permet d'exploiter sans problème le spectre en dérivée seconde d'un prélèvement ayant un taux d'hémoglobine à 100 mg/l.

- Constante de temps : "time constant"

La constante de temps indique le temps demandé pour atteindre 98 % de la valeur pleine échelle à mesurer. En fixant 0,2 s, nous rendons le dosage plus rapide.

- Format :

Nous utilisons le format A_4, l'appareil enregistreur sélectionne un spectre tracé dans la norme 21 cm x 29,7 cm. Le calculateur détermine lui-même et met en mémoire l'expension des longueurs d'onde sur le papier, la vitesse de déroulement du papier et la distance entre deux spectres.
Le programme ainsi sélectionné nous permet d'obtenir une bonne sensibilité, une bonne reproductibilité et une excellente linéarité qui permet grâce à un domaine de mesure étendu de réaliser rapidement de grandes séries d'analyses.

II. Comparaison de la spectrophotométrie dérivée et la correction d'Allen.

Comme Taulier l'a montré dans son étude (43), le dosage par cette technique de l'hémoglobine dans les liquides biologiques est bien corrélé avec une méthode de référence utilisant la correction d'Allen (technique à la cyanmethémoglobine).
l'utilisation d'un procédé mathématique (la dérivation) améliore la qualité des résultats, il diminue de façon considérable l'importance du bruit de fond.
La correction de l'absorption du bruit de fond par la méthode de la lecture à trois longueurs d'onde sous-entend que l'absorption "parasite" est linéaire dans la zône de mesure considérée.

III. Méthode de dosage de l'hémoglobine plasmatique par spectro-

métrie dérivée.

Les critères d'évaluation de cette méthode sont excellents. En utilisant les recommandations de la Société Française de Biologie Clinique, nous avons trouvés les résultats suivants (cf chapitre "résultats" page 28) :

- essai de répétabilité : C V = 0,22 pour un taux d'hémoglobine de 95 mg/l
- essai de reproductibilité : C V moyen pour l'ensemble des trois gammes
  1,4 % intra série
  6,8 % inter série
- limite de détection : 1,2 mg/l
- linéarité : Y = 1,69 x - 1,68 cc = 0,99997

Exactitude :

% de récupération en milieu aqueux (91 % - 100 %)
en milieu protéïque (100 % - 102 %)

Sélectivité :

Celle-ci est satisfaisante comme le montre l'étude des principales interférences que nous discuterons dans le paragraphe suivant.

Evaluation de l'imprécision sur la mesure :

* répétabilité :

La technique utilisée nous offre une répétabilité parfaite avec un coefficient de variation égal à 0,22 % ce qui, contrairement aux méthodes les plus perfectionnées reposant sur les propriétés peroxydasiques de l'hémoglobine (42), nous autorise à

à ne réaliser qu'un seul dosage par prélèvement même lorsque le taux d'hémoglobine est faible.

* reproductibilité :

. l'étude de la reproductibilité est excellente, car le coefficient de variation moyen intra-série ne dépasse pas 1,5 %.

. le coefficient de variation inter-série est plus élevé, cependant, il reste inférieur à 5,5 % pour des taux d'hémoglobine de 95 mg/l ou 25 mg/l.

A partir d'une concentration de 6,25 mg/l, le CV est de 13,12 %. L'explication de ce résultat médiocre peut s'expliquer par une mauvaise conservation des solutions diluées des différents liquides biologiques. En effet, le CV intra-série pour ces échantillons reste lui constamment inférieur à 6 %.

Il faut éviter absolument de stocker pendant plusieurs jours à + 4° C les prélèvements en vue du dosage de l'hémoglobine.

* évaluation du domaine d'analyse

La limite de détection est remarquable (1,2 mg/l) ; toute hémolyse pourra donc être diagnostiquée aisément. Comme nous l'avons déjà écrit, la linéarité est parfaite dans le domaine d'analyse que nous nous sommes fixés (1,2 - 100 mg/l). Parmi les différentes méthodes de dosage de l'hémoglobine, la méthode à l'hématine (22, 48) ne permet pas de travailler à d'aussi faibles concentrations.

Le dosage n'impose aucune dilution préalable contrairement à la méthode proposée par Wu (47), spectrophotométrie directe de la cyanmethémoglobine ou l'absorbance devait être obligatoirement comprise entre 0,1 et 0,6.

* exactitude

Le pourcentage de récupération voisin de 100 % soit en milieu aqueux soit en milieu protéïque est un atout supplémentaire de la méthode par dérivation pour l'évaluation du taux d'hémoglobine dans les liquides biologiques.

* sélectivité

Les travaux de Amazon (2) ont prouvés qu'il était possible de doser un mélange de bilirubine et d'hémoglobine, en utilisant la même plage de longueur d'onde que nous avons testée.
Dans notre étude, nous avons étudié l'influence d'une concentration de bilirubine de 45 µ mole/l, ce qui représente déjà un taux pathologique très significatif.
L'erreur observée par excès était d'environ 5,6 % ; au niveau d'un C T S, ce plasma serait obligatoirement inutilisable et rejeté, car toute bilirubinémie haute doit entrainer un examen clinique du donneur.
En pathologie médicale, cette surévaluation artificielle des résultats d'hémoglobine due à la présence de grande quantité de bilirubine n'aura que peu d'influence, les valeurs normales d'hémoglobine plasmatique étant suffisamment basses.
La seule réserve à émettre sera pour le plasma des ictères hémolytiques tel celui du nouveau-né où la bilirubine peut atteindre 220µ mole/l.

Les travaux de Soloni (40), effectués sur la même bande spectrale, ont montré que la présence de lipides dans le plasma n'influe pas sur la valeur des résultats. En effet, les lipides d'après ces auteurs entrainent soit une légère, augmentation soit une augmentation constante de l'absorption due au bruit de fond, or la méthode par dérivation ne tient compte que des brusques variations de l'absorbance.

Valeurs normales.

L'étude des différents protocoles de mesure montre un abaissement très net de la valeur normale de l'hémoglobine plasmatique, due à l'augmentation de la spécificité des différentes techniques.
500 mg/l est considéré comme la limite supérieure acceptable par la méthode de Drabkin, par dérivation, un taux compris entre 0 et 5 mg/l est considéré comme physiologique.
Il est important de signaler que la qualité du prélèvement est fondamentale car toute hémolyse iatrogène fausse le dosage.

Praticabilité.

La technique a une praticabilité parfaite.
- le passage du sérum, directement, est un atout m a j e u r car il apporte un gain de temps comparé aux techniques immunologiques et une sécurité car dans les techniques colorimétriques, il faut tenir compte de la vitesse de développement de la réaction colorée.
- le coût de l'analyse est nul.
- le temps de préparation de l'analyse est négligeable comparé à celui imposé par les techniques immunologiques, colorimétriques voire d'absorption atomique.
- l'absence d'emploi de réactifs toxiques ou cancérigènes est un atout majeur en terme de médecine du travail.
- l'adaptation aux grandes séries est facilitée par l'absence de l'emploi de réactifs. Ces analyses se réalisent rapidement, environ 1 mn par dosage.

IV. Méthode de dosage de l'hémoglobine urinaire par spectrophotométrie dérivée.

Les caractéristiques de la méthode sont les suivants :

- essai de répétabilité : CV = 0,35 %
- essai de reproductibilité : CV moyen pour l'ensemble des trois gammes d'échantillons.
  intra-série = 2,6 %
  inter-série = 4,11 %
- limite de détection : 1 mg/l
- linéarité : y = 1,52 + 1,84 x cc = 0,99997
- exactitude : % de récupération
  * en milieu aqueux :(94 - 101)%
  * dans l'urine :(98 - 104)%

Comme le démontre Taulier (43) dans son étude, la transformation de l'hémoglobine en cyanmethémoglobine est nécessaire. Elle permet l'obtention d'une seule forme d'hémoglobine urinaire, la cyanmethémoglobine, et élimine l'interférence des porphyrines.

Les tests de validation sont bons mais on notera un CV intra-série plus élevé, la dispersion plus importante étant sans doute liée à la réaction chimique utilisée. Le CV inter-série plus faible peut s'expliquer par la stabilité de la cyanmethémoglobine formée. L'ajout de réactif rend la praticabilité moins bonne.

CONCLUSIONS

H. CONCLUSIONS

Cette étude nous a permis d'illustrer les qualités inhérentes à la spectrophotométrie dérivée et d'adapter sur un appareil polyvalent une méthode de dosage de l'hémoglobine dans les liquides biologiques.

La spectrométrie dérivée a révélé de nombreux avantages par rapport à la spectrophotométrie classique qui fournit seulement après des corrections plus ou moins complexes des résultats entachés d'erreurs systématiques.

Les principales qualités sont :

- la simplicité de mise en oeuvre
- l'exactitude
- la précision
- la sensibilité
- la rapidité
- l'absence d'emploi de dérivés toxiques.

Ce principe mérite donc d'être mieux connu dans le domaine de la biologie clinique où il peut apporter des solutions élégantes à certains problèmes difficilement solubles classiquement (dosage des coproporphyrines par exemple).

A l'avenir, il serait intéressant d'élaborer une méthodologie simple et pratique par dérivée seconde adaptée au dosage des différents dérivés héminiques (myoglobine...). La bande spectrale 650 - 550 nm devra être exploitée afin de s'affranchir définitivement de l'interférence de la bilirubine.

B I B L I O G R A P H I E

I. BIBLIOGRAPHIE

(1) AHLQUIST D.A., SCHWARTZ S.
Use of leuco dyes in the quantitative colorimetric micro-determination of hemoglobin and other heme compounds.
Clin. Chem. 1971, 21/3 (362-369).

(2) AMAZON K., SOLONI F., ARKADI M.
Separation of bilirubin from hemoglobin by recording derivative spectrophotometry.
Am J. Clin. Pathol. 1981, 75, (519-523).

(3) BERNARD J., LEVY J.P., VARET B.
Abrégés d'hématologie.
6ème édition, 41-52 ; 64-68.

(4) BLAKNEY G.B., DINWOODIE A.J.
A spectrometric scanning technique for the rapid determination of a plasma hemoglobin.
Clin. Biochem., 1975, 8, (96-102).

(5) CLAUVEL DE MENDONCA M., APPEL M., PERNOLLET J.C., SCHWARTZ K.
A sensitive method for automated estimation of plasma haemoglobin levels.
Clin. Chimica Acta, 1972, 39, (149-159).

(6) CORNING MEDICAL
Manuel d'instruction.
Co. oxymetrie 2 500 corning.

(7) COX C., BURET J.
Dosage de l'hémoglobine plasmatique par spectroscopie en

dérivée seconde.
Ann. Biol. Clin. 1982, 40, (409-542).

(8) CROSBY W.H., FURTH W.F.
A modification of the benzidine method for measurement of hemoglobin in plasma and urine.
Blood, 1956, 11, (380-383).

(9) Dosage de l'hémoglobine dans le sang (méthode spectrophotométrique).
Extrait du formulaire pharmaceutique du service de Santé des Armées.
Revue française des laboratoires - Novembre 1987.

(10) ENGLER R., POINTIS J., RONDEAU Y., JUDON C., WAKS M;
Détermination immunochimique de l'hémoglobine humaine dans les liquides biologiques.
Clinica Chimica Acta, 1977, 77, (159-165).

(11) ENGLER R.
Hémolyse et protéïnes plasmatiques.
Annales de biologie clinique, 1981, 39, (193-196).

(12) FICHEUX H., LEVILLAIN P.
La spectrophotométrie dérivée : application au dosage des coproporphyrines dans des milieux colorés.
Revue française des laboratoires, Novembre 1987, 165, (51-55).

(13) FLINK E.B., WATSON C.J.
A method for the quantitative determination of hemoglobin and related heme pigments in feces, urine and blood plasma.

J. Biol. Chem., 1942, vol. 146, (171-178).

(14) GANTZER M.L., SELGREN S.F.
Effect of type of detergent and detergent concentration in a solution assay for hemoglobin.
Clinical Chemistry, 1982, vol 28, N°7, (1627).

(15) GOLDMAN J., LEVINSON S., LAWRENCE E.
Centrifugal analyser and manual method for assaying plasma hemoglobin using tetramethyl benzidine.
Clinical Chemistry, 1982, Vol 28, N°7, (1627).

(16) GROFF W.A., KAMINSKI A., CUCINELL S.A.
Simultaneous determination of methemoglobin and total hemoglobin by a continuous flow method.
Clinical Chemistry, 1974, 20/9 (1116-1120).

(17) HANKS G.E., CASSELL M., RAY R.N., CHAPLIN H.
Further modification of the benzidine method for measurement of hemoglobin in plasma.
J. Lab. Clin. Med., 1960, 56, (486-498).

(18) HUNTER F.T., MORTON GROVE RASMUSSEN, LAMAR SOUTTER,
A spectrophotometric method for quantitating hemoglobin in plasma or serum.
Am. J. Clin. Patho., 1950, 20, (429-433).

(19) KAHN S.E., WATKINS B.F., BERMES W.E.
An evaluation of a spectrophotometric scanning technique for measurement of plasma hemoglobin.
Annals of clinical and laboratory science, 1981, vol 11, N°2, (126-131).

(20) KAPLAN J.C., LABIE D.
Les methémoglobinémies.
Encyclopédie médico-chirurgicale - Paris -
Sang, 1983, 13007, D 10-12

(21) KARR W.G., CHORNOCK F.W.
Determination of hemoglobin in plasma (visual colorimetry)
J. Clin. invest. - 1947, 26, (685-686).

(22) KING E.J., GILCHRIST M.
Determination of haemoglobin.
Determination by a cyan haematin method.
Lancet, 1947, 11, (201).

(23) LEVERE R.D., SWERDLOW F.
Measurement of human plasma hemoglobin by difference spectrophotometry.
J. Lab. Clin. Med., 1971, vol 77, (168-176).

(24) LEVINSON S., GOLDMAN J.
Measuring hemoglobin in plasma by reaction with tetramethylbenzidine.
Clinical Chemistry, 1982, vol 28, N°3, (471-474).

(25) MASAKATSU S., YOSHIDA A., HAGA M.
Methemoglobin in blood as determined by double Wavelenght spectrophotometry.
Clinical Chemistry, 1982, vol 28, N° 3, (508-511).

(26) METAIS P.
Hémoglobines précurseurs et dérivés.
Biochimie clinique - Tome 1, Chap. 8, (123-127).

(27) METAIS P.

Anomalies du métabolisme des protéïnes et des acides aminés.

Biochimie Clinique - Tome 2, Chap. 8 (211-215).

(28) NOE D.A., WEEDN V., BELL W.R.

Direct spectrophotometry of serum hemoglobin. A allen correction compared with a three wavelenght polychromatic analysis.

Clinical Chemistry, 1984, vol 30, N° 5, (627-630).

(29) O'HAVER T.C., GREEN G.L.

Numeritical error analysis of derivative spectrometry for the quantitative analysis of mixtures.

Analytical Chemistry, 1976, vol 48, N°2, (312-318).

(30) OLSSON T., BERGSTROM K., THORE A.

A sensitive method for determination of serum hemoglobin based on iso-luminol chemiluminescence.

Clinica Chimica Acta, 1982, 122, (125-133).

(31) PARKS J., WORTH HGJ.

Carboxyhemoglobin determination by second derivative spectroscopy.

Clinical Chemistry, 1985, Vol 31, N°2, (279-281).

(32) RENEE J.J., MASSEYEFF M.F.

Méthode spectrophotométrique spécifique de détermination de l'hémoglobine plasmatique et/ou sérique.

Utilisation du chromogène 2.2' azino di 3 (éthylbenzo-thiazoline sulfonate 6).

Annales Biologie Clinique, 1985, 43, (251-254).

(33) POYART C., GIRARD F., BURSAUX E., BOHN B.
Bases structurales des propriétés fonctionneles de l'hémoglobine.
Annales de Biologie Clinique, 1981, 39, (213-222).

(34) ROSS D.G., GILFILLAN A.C., HOUTON D.E.
Evaluation of hemoglobin screening methods in prospective blood donnors.
Vox Sanguinis, 1986, 50, (78-80).

(35) SALAUZE D., LAINE G., LACROIX C., GOULLE J.P.
Méthode manuelle de dosage de l'hémoglobine plasmatique par la tétramethylbenzidine et la déféroxamine.
Ann. Biol. Clin., 1984, 42, (237-239).

(36) SANDERINK G.J., HERMAN J.M.
Quantitative measurement of plasma hemoglobin by second derivative spectrophotometry.
Clinica Chimica Acta, 1985, 146, (65-73).

(37) Shim Bong Sop and Dae Myuing Jue.
Simple spectrophotometric determination of haptoglobin level in serum.
Clinica Chimica Acta, 1984, 136, (145-153).

(38) Shim Bong Sop and Dae Myuing Jue.
Simple spectrophotometric determination of haptoglobin Haemoglobin complex in haemolysed samples.
Scand J. Clin. Lab. Invest., 1986, 46, (45-51).

(39) SHINOWARA G.Y.
Spectrophotometric studies on blood serum and plasma.

The physical determination of hemoglobin and bilirubine.
Am. J. Clin. Patho., 1954, Vol 24, (696-710).

(40) SOLONI F. G. - MARCIA T., CUNNINGHAM M.T., AMAZON K.
Plasma hemoglobin determination by recording derivative spectrophotometry.
American Journal of Clinical Pathology, 1986, Vol 85, N°3, (342-347).

(41) SPIEGEL H.E., TONCHEN A.E.
An automated method for the measurement of plasma hemoglobin.
1969, Vol 15, N° 9, (864-869).

(42) TAKAYANAGI M., YASHIRA T.
Colorimetry of hemoglobin in plasma with 22' Azino di (3 ethybenzthiazoline 6 sulfonic acid).
Clinical Chemistry, 1984, Vol 30, N°3, (357-359).

(43) TAULIER A., LEVILLAIN P., LEMONNIER A.
Intérêt de la spectrophotométrie dérivée pour le dosage de l'hémoglobine plasmatique et urinaire.
Ann. Biol. Clin., 1986, 44, (242-248).

(44) VAN KAMPEN E.J., ZIJLSTRA W.G.
Haemoglobinometry : from estimation to reference method.
J. Clin. Chem. Biochem., 1981, Vol 19, (517-519).

(45) WEISER W.E., PARDUE H.L.
Evaluation of multiwavelenght derivative spectra for quantitative applications in clinical chemistry.
Clinical Chemistry, 1983, Vol 29, N°9, (1673-1677).

(46) WOLF H.U., LANG W., ZANDER R.

Alkaline haematin D 575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemiglobin method.

Standardisation of the method using pure chlorohaemin.

Clinica Chimica Acta, 1984, 136, (95-104).

(47) WU H.

Studies on hemoglobin. An ultra micro method for the determination of hemoglobin as a peroxidase.

J. Bioch. 2, 1923, Vol 2, (189-194).

(48) ZANDER R., LANG W., WOLF H.U.

Alkaline haematin D 575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemiglobin method.

Description of the method.

Clinica Chimica Acta, 1984, 136, (83-93).

(49) ZIJLSTRA W.G., VAN KAMPEN E.J.

Spectrophotometry of haemoglobin.

The standard haemiglobin cyanide method and after.

J. Clin. chem. Clin. Biochem., 1981, Vol 19, (521-523).

(50) Zwart A., BUURSMA A., VAN KAMPEN E.J., ZIJLSTRA W.G.

Multicomponent analysis of hemoglobin derivatives with a reversed optics spectrophotometer.

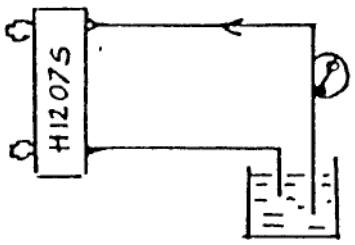
Clinical Chemistry, 1984, Vol 30, N° 3, (373-379).

ANNEXES

PROTOCOLE DE LA MESURE DU VOLUME SANG RESIDUEL

1) Mesurer la concentration d'hémoglobine sur un échantillon de sang du patient
(par exemple HbS = 8,7 g/100 ml avec Hématocrite = 27 %)
HbS = ...g/l ou mg/ml

2) Après restitution au patient, faire recirculer à l'aide de l pompe à sang pendant 10 minutes dans le dialyseur et les lignes
1 litre d'eau déminéralisée



- Vider totalement le circuit et MESURER le volume recueilli (en général, moins d'l litre à cause de l'U.F. pendant la recirculation).

- Faire analyser la concentration en hémoglobine Hbv dans un échantillon pris dans le volume d'eau recueilli.

- Le volume de sans résiduel est égal à :

$$VR\ ml. = \frac{V \times Hbv}{HbS}$$

V en ml
Hbv en mg/ml
HbS en mg/ml

Remarque : Si la mesure de la concentration en hémoglobine du du sang du patient a été faite récemment, il n'est pas nécessaire d'en effectuer une nouvelle.

Evaluation du ... residuel (Dialyseur) après restitution

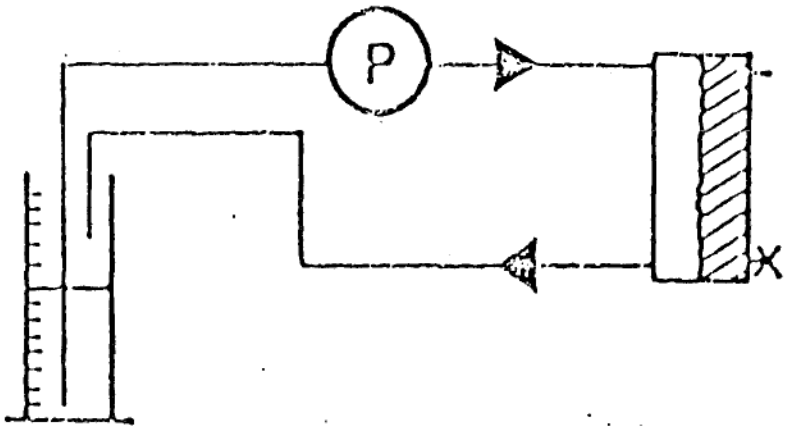
Mode opératoire :

. Au lit du patient :

Matériel :

- une pompe à sang ;
- des lignes à sang avec un corps de pompe correspondant, propres ;
- éprouvette graduée de 1 litre ;
- de l'eau déminéralisée.

Montage :



Manipulation :

- prélever 2 ml de sang "artériel" en fin de dialyse ;
- débrancher et restituer le sang selon la procédure normale. Noter le volume de liquide utilisé pour la restitution ;
- déconnecter les lignes "dialysat" et vider le compartiment dialysat de l'hémodialyseur ;
- déconnecter les lignes "sang" de l'hémodialyseur et connecter les tubulures propres ;
- faire circuler 700 à 1 000 ml d'eau déminéralisée de l'éprouvette dans le compartiment sang de l'hémodialyseur pendant 10 minutes environ ;
- récupérer la totalité de l'hémolysat contenu dans les tubulures et dans l'hémodialyseur.
- noter le volume (V) ;
- homogénéiser le contenu de l'éprouvette et prendre un échantillon (E_1).

b. Au laboratoire :

Matériel :

- verrerie de laboratoire ;
- spectrophotomètre ;
- ammoniaque à 0,8 p. 100.

Manipulation :

- hémolyse du sang de référence : bien homogénéiser le sang, le diluer au 1 : 100 avec de l'eau déminéralisée : échantillon (E_2) ;

- mesure de l'hémoglobine : mettre dans des tubes à essais les réactifs suivants :

REACTIFS	TUBES	
	Témoin	Echantillons
NH_4OH 0,8 %	1 ml	1 ml
Eau déminéralisée	1 ml	-
Hémolysat	-	1 ml

- agiter ;

- lire la densité optique des échantillons (E_1 et E_2) contre le témoin à 540 nm.

Calcul :

- Volume de sang résiduel $= \frac{D.O.\ (E_1) \times V}{D.O.\ (E_2) \times 100}$

TABLE DES MATIERES

K. TABLE DES MATIERES

A. INTRODUCTION p. 1

B. HEMOGLOBINE ET SES DERIVES p. 2

I. Définition et Structure p. 2 - 3

II. Biosynthèse de l'hémoglobine p. 3

2.1. Synthèse de l'hème p. 3

2.2. Synthèse de la globine p. 4

III. Catabolisme de l'hémoglobine p. 4

IV. Stabilité p. 5

4.1. In vivo p. 5 - 6

4.2. In vitro p. 6 - 7

V. Caracteristiques spectrales de l'hémoglobine et ses dérivés. p. 7

5.1. Carboxyhémoglobine p. 7

5.2. Oxyhémoglobine p. 7

5.3. Cyanmethémoglobine p. 7 - 8

5.4. Hémoglobine totale p. 8

5.5. Bilirubine p. 9

C. INTERET DU DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES p. 10

I. Contrôle de qualité au niveau des centres de transfusion sanguine p. 10

II. Intérêts en pathologie médicale p. 10

2.1. Diagnostic des hémolyses d'origne accidentelle. p. 10

a) Hémolyse bactérienne et parasitaire p. 10

- bacterienne p. 10

- parasitaire p. 10

b) Hémolyse d'origine toxique p. 10

- toxiques professionnels ou accidentels p. 10 - 11

- médicaments p. 11

- toxiques animales p. 11

2.2. Surveillance des traitements susceptibles de créer une hémolyse. p. 12

a) oxygénothérapie hyperbare p. 12

b) radiothérapie p. 12

c) hémodialyse p. 12 - 13

2.3. Contrôle de qualité en biologie p. 13

a) évaluation d'une méthode p. 13

b) validation des résultats p. 13 - 14

D. LES DIFFERENTES METHODES DE DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE p. 15

I. Transformation de l'hémoglobine en cyanmethémoglobine par la méthode de Drabkin. p. 15 - 16

II. Formation d'hématine alcaline D 575 p. 16

III. Méthodes basées sur les propriétés péroxydasiques du pigment. p. 17

3.1. Techniques colorimétriques p. 17 - 19

3.2. Techniques par chimioluminescence p. 19

IV. Dosage de l'hémoglobine par le fer qu'elle contient. p. 19 - 20

V. Méthodes immunologiques. p. 20 - 21

VI. Méthodes de dosage physique de l'hémoglobine. p. 21 - 23

E. MATERIEL ET METHODES p. 24

I. Matériel. p. 24 - 25

II. Prélèvements. p. 25

2.1. sang p. 25 - 26

2.2. urine p. 26

2.3. dialysat p. 26

III. Méthodes. p. 26 - 27

F. RESULTATS p. 28

Remarques préliminaires. p. 28

I. Dosage dans le sang et les dialysats. p. 28

1.1. Evaluation de l'imprécision sur la mesure de l'hémoglobine totale p. 28

1.1.1. Essai de répétabilité p. 28

1.1.2. Reproductibilité p. 28 - 29

1.2. Evaluation du domaine d'analyse p. 29

1.2.1. limite de détection p. 29

1.2.2. limite de linéarité p. 29 - 30

1.3. Exactitude et application au milieu protéïque p. 30

1.3.1. Surcharge d'hémoglobine dans l'eau p. 30

1.3.2. Surcharge d'hémoglobine dans le plasma p. 30

1.4. Sélectivité de la méthode p. 31

1.5. Valeurs normales p. 31

II. Dosage de l'hémoglobine dans l'urine. p. 31

2.1. Evaluation de l'imprécision sur la mesure de la cyanmethémoglobine p. 31

2.1.1. Essai de répétabilité p. 31 - 32

2.1.2. Essai de reproductibilité p. 32

2.2. Evaluation du domaine d'analyse p. 32

2.2.1. Limite de détection p. 32

2.2.2. limite de linéarité p. 32

2.3. Exactitude du dosage p. 32

2.3.1. Surcharge de cyanmethémoglobine dans l'eau p. 32 - 33

2.3.2. Surcharge de cyanmethémoglobine dans l'urine p. 33

G. DISCUSSION p. 34 - 42

H. CONCLUSION p. 43

I. BIBLIOGRAPHIE p. 44

J. ANNEXES p. 52

K. TABLE DES MATIERES p. 55

BIBLIOTHÈQUE INTERUNIVERSITAIRE GRENOBLE MÉDECINE-PHARMACIE

AUTORISATION D'IMPRESSION

de la Thèse dont l'intitulé est :

Dosage de l'Hémoglobine dans les liquides biologiques par spectrophotométrie dérivée

candidat : M Adaptation d'une méthode sur un spectrophotomètre UVIKON 820 (Roche Kontron)

CADOUX Bernard

VU

GRENOBLE, le 4 février 1988

Le Président du Jury

VU

GRENOBLE, le 9.02.1988

Le Président de l'Université ~~Scientifique, Technologique et Médicale de~~ GRENOBLE

Université Joseph Fourier

Le Président

J.J. PAYAN

UNIVERSITE SCIENTIFIQUE, TECHNOLOGIQUE et MEDICALE de GRENOBLE

CADOUX Bernard

Dosage de l'hémoglobine dans les liquides par spectrométrie dérivée ; Adaptation d'une méthode sur un spectromètre Uvikon 820 (Roche Kontron).

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplome d'état de Docteur en Pharmacie - Grenoble 1988.

RESUME

La spectrométrie dérivée permet de simplifier considérablement le dosage de l'hémoglobine dans les milieux biologiques fortement colorés. Cette technique autorise une détermination quantitative directe, sans étape préalable d'adjonction de réactifs.

MOTS CLES :

- Spectrométrie dérivée
- Hémoglobine
- Milieux biologiques colorés
- Dosage direct

JURY :

Monsieur le Professeur A. FAVIER Président

Monsieur G. DESCH : Docteur es sciences pharmaceutiques

Monsieur C. BOUJET : Docteur es sciences pharmaceutiques

DATE DE SOUTENANCE : 24 MARS 1988