

T.P. 4. LA DÉTERMINATION DE L'HÉMOGLOBINE ET DE LA BILIRUBINE

Introduction

Les méthodes de détermination de l'hémoglobine peuvent être groupées comme suit:

- **Méthodes spectrométriques**, basées sur la mesure d'absorption directe de l'oxyhémoglobine et l'hémoglobine réduite, ou après avoir d'abord converti la hémoglobine dans un dérivé stable comme: chlorhydrate d'hématine, carboxyhémoglobine, etc.

- **Méthodes gazométriques** par la saturation de l'hémoglobine avec un gaz (monoxyde de carbone, oxygène) et l'évaluation de la quantité d'hémoglobine par la quantité de gaz fixée.

- **Méthodes basées sur la détermination du fer** de l'hémoglobine. L'hémoglobine contient une quantité définie de fer (0,338%), ce qui permet un calcul exact de la quantité d'hémoglobine.

Le Comité International de Normalisation en Hématologie (ICNH) a recommandé comme une méthode standard pour déterminer l'hémoglobine la méthode qui utilise sa transformation en cyan-méthémoglobine. Cette composée est très stable, a un maximum d'absorption large autour de 540 nm, la loi de Lambert-Beer est respectée, la réaction n'est pas interférée par des protéines du plasma ou de la bilirubine et couvre pratiquement tous les dérivés de l'hémoglobine du sang (oxy-Hb, Hb réduite, carboxy-hémoglobine, Met-Hb), qui peuvent être entièrement convertis en cyan-méthémoglobine.

Partie expérimentale

1. La détermination de l'hémoglobine comme cyan-méthémoglobine

Principe

L'hémoglobine est convertie en cyan-méthémoglobine par un traitement avec du ferricyanure de potassium et de cyanure de potassium, et l'absorption de la lumière de la solution de cyan- méthémoglobine est mesurée à 540 nm.

Réactifs

1. Réactif de Drabkin: 50 mg de cyanure de potassium, 1 g de bicarbonate de sodium et 200 mg de ferricyanure de potassium sont dissous dans l'eau distillée et complétés au volume de 1000 ml avec de l'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,2 - 7,4.
2. Étalon de cyan-méthémoglobine (préparations commerciales). Les détails concernant la concentration du standard et le mode opératoire sont fournis avec le réactif. Les solutions sont conservées pendant un an à +4°C.

Mode opératoire

Pipetez 0,02 ml de sang dans 5 ml de réactif de Drabkin, mélangez et après 20 minutes, mesurez l'absorption à 540 nm, en équilibrant le spectrophotomètre avec du réactif de Drabkin. Le taux d'hémoglobine est exprimé en gramme/100 ml de sang et est obtenu à partir d'une courbe d'étalonnage établie en utilisant la solution d'étalon.

Remarques: Cette méthode permet de détecter toutes les formes de l'hémoglobine et permet des déterminations très exactes et précises. Mais il nécessite un réactif étalon

de cyan-méthémoglobine et le réactif de Drabkin, contenant du cyanure, qui est extrêmement toxique.

Le calcul de la teneur en hémoglobine, en gramme/100 ml, peut être fait sans la courbe d'étalonnage, en mesurant l'absorption de chaque probe analysé et l'absorption de la solution étalon chaque fois.

Calcul

$$\text{gramme hémoglobine/100 ml} = \frac{A_{\text{Probe}}}{A_{\text{Etalon}}} \cdot C_E \cdot \frac{5,02}{0,02} \cdot \frac{1}{1000}$$
$$\text{gramme hémoglobine/100 ml} = \frac{A_{\text{Probe}}}{A_{\text{Etalon}}} \cdot C_E \cdot 0,251$$

où C_S est la concentration de l'étalon en mg%.

En absence d'un étalon de cyan- méthémoglobine, on peut calculer le contenu en hémoglobine à la base du coefficient molaire d'absorption ($\epsilon = 11 \cdot 10^3$) et la masse moléculaire d'une globine (16144).

$$\text{gramme hémoglobine/100 ml} = \frac{A_{\text{Probe}} \cdot 16114}{11000} \cdot 10^{-1} \cdot \frac{5,02}{0,02} = A_{\text{Probe}} \cdot 36,8$$

Ce dernière mode de calcul est permis seulement quand on a un spectrophotomètre avec un pouvoir de résolution très grand. Le coefficient de 36,8 doit être vérifié par chaque laboratoire en utilisant de probe de sang avec un contenu en hémoglobine déterminé à la base de la comparaison avec un étalon de cyan-méthémoglobine.

Valeurs normales

Hommes: 14 – 18 g hémoglobine/100 ml sang.

Femmes: 12 - 16 g hémoglobine/100 ml sang.

Signification clinique

L'hémoglobine diminue en: anémie, maladie de Crohn, insuffisance rénale chronique, glomérulonéphrite chronique, hémoglobinurie paroxystique nocturne, hyperhydratation, infiltration et suppression de la moelle osseuse.

L'hémoglobine augmente en: déshydratation, polyglobulie, polycytémie vera, AVC (accidents vasculaires cérébraux), tumeurs cérébrales, encéphalite.

2. La détermination de la bilirubine sérique

La bilirubine provient du catabolisme de l'hème des hémoprotéines.

La bilirubine dans le sang est présente sous trois formes: non conjuguée, conjuguée et liée de façon covalente à l'albumine. Ces formes ont une solubilité différente dans l'eau et des capacités différentes de réagir chimiquement. La bilirubine non conjuguée a une faible solubilité dans l'eau, tandis que les autres sont des fractions plus solubles.

La bilirubine sérique donne réactions lentes et rapides ; les réactions lentes peuvent devenir plus rapides en présence d'accélérateurs ajoutés au mélange réactionnel. La fraction de la bilirubine qui réagit directement et rapidement en l'absence d'un accélérateur est connue sous le nom de la bilirubine directe et celle qui exige un «accélérateur» pour la réaction est connue sous le nom de bilirubine «indirecte». En fait,

l'accélérateur solubilise la bilirubine non conjuguée et augmente sa disponibilité pour interagir.

La bilirubine directe est la bilirubine conjuguée, la fraction soluble et la fraction delta ; la fraction indirecte est la bilirubine non conjuguée. Lorsque la bilirubine réagit en présence d'un accélérateur, la bilirubine déterminée est la bilirubine totale. Par la détermination de la bilirubine totale et de la bilirubine directe on peut calculer la bilirubine non conjuguée (indirecte) par soustraction.

Bilirubine totale - bilirubine conjuguée = bilirubine non conjuguée

La grande majorité des méthodes pour la détermination des fractions de bilirubine sont basées sur la réaction de la bilirubine avec des sels diazoïque. Les réactions qui se produisent sont représentées dans la Figure 1. Les méthodes basées sur ces réactions diffèrent en fonction du pH.

La bilirubine conjuguée est soluble et réagit directement avec l'acide sulfanilique diazoté. Par conséquent, elle est appelée la **bilirubine directe**.

La bilirubine libre est insoluble dans l'eau et est transportée par la fixation à l'albumine sérique. Il ne réagit pas directement avec le réactif diazoïque (bilirubine indirecte). La réaction est possible qu'après l'ajout d'accélérateurs (l'alcool, la caféine, de l'urée, etc.), qui permettent le développement de la couleur due à les deux composants (directe et indirecte), représentant effectivement la **bilirubine totale**.

L'hémolyse conduit à des valeurs faussement diminuées, car l'absorbance des témoins augmente. Les sérums lipémiques donnent de valeurs faussement élevées en raison des effets de la turbidité. La bilirubine est détruite par la lumière et la chaleur, questions à prendre en compte lors des déterminations.

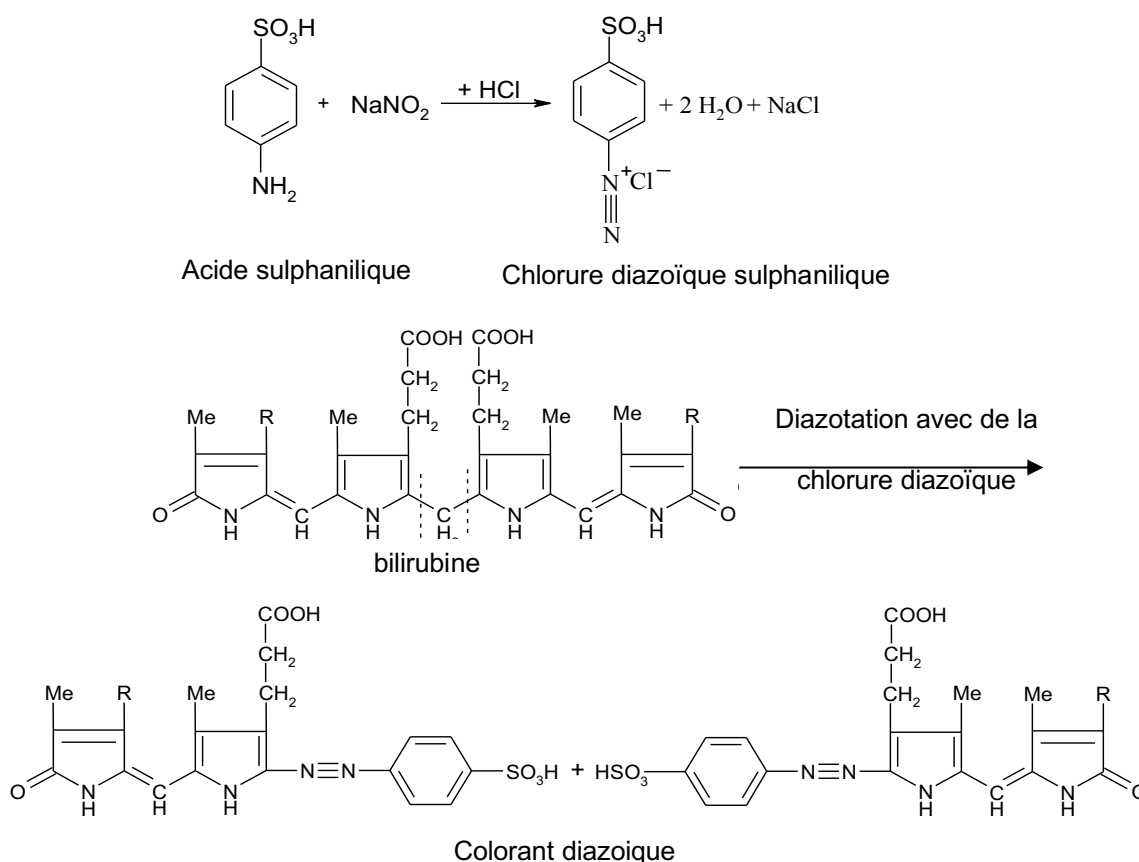


Figure 1. Diazotation de l'acide sulphanilique et son réaction avec de la bilirubine conjuguée et non conjuguée en résultant des azo-bilirubino-dérivées (Me = $-\text{CH}_3$, R = $-\text{CH}=\text{CH}_2$)

A. La méthode de Jendrassik-Grof modifiée

(Version avec de la caféine, l'acétate de sodium et benzoate)

Cette méthode est basée sur la détermination de la bilirubine directe et totale en utilisant la loi de Lambert-Beer et le coefficient d'absorption molaire du colorant azoïque, sans l'utilisation d'étalons.

Principe

La bilirubine forme avec l'acide sulphanilique diazoté un colorant azoïque dont l'absorption de lumière est proportionnelle à la teneur en bilirubine. La bilirubine conjuguée réagit directement avec de l'acide sulphanilique diazoté (bilirubine directe), et la bilirubine totale est déterminée après l'ajout d'un accélérateur et d'une solution de sel Seignette alcalin. La bilirubine indirecte (non conjuguée) est déterminée en calculant la différence.

Réactifs

1. Acide sulphanilique $2,9 \cdot 10^{-2}$ M, acide chlorhydrique 0,17 N (5 g d'acide sulphanilique est dissolu en eau, on ajoute 15 ml acide chlorhydrique concentré et on ajoute de l'eau jusqu'à 1000 ml).
2. Solution de azotite de sodium $7,2 \cdot 10^{-2}$ M (0,5 g azotite de sodium est dissolue en 100 ml eau distillée). La solution peut être conservée pendant un mois à $+4^{\circ}\text{C}$.
3. Accélérateur: a) caféine $1,3 \cdot 10^{-1}$ M, benzoate de sodium $1,56 \cdot 10^{-1}$ M (10 g caféine et 15 g benzoate de sodium sont dissolus en 100 ml eau distillée); b) acétate de sodium 25% en eau distillée. **L'accélérateur est préparé** extemporanément en mélangeant les solutions a et b en proportions égales.
4. Solution Fehling II: tartrate de sodium et potassium $9,3 \cdot 10^{-1}$ M, NaOH 1,9 N (150 g selle Seignette est dissolue en aprox. 600 ml eau distillée, on ajoute 300 ml solution NaOH 25% et on ajoute de l'eau distillée jusqu'à 1000 ml).
5. Chlorure de sodium, solution 0,9%.

Mode opératoire

La détermination est effectuée en quatre tubes notés PT (probe totale), TT (témoin total), PD (probe directe) et TD (témoin direct).

Pipetez en ordre comme dans le tableau suivant:

Réactifs, ml	Bilirubine totale		Bilirubine directe	
	PT	TT	PD	TD
Acide sulphanilique.	0,20	0,20	0,20	0,20
Azotite de sodium	1 goutte	-	1 goutte	-
Accélérateur	1,00	1,00	-	-
Chlorure de sodium	-	-	2,00	2,00
Sérum	0,20	0,20	0,20	0,20
	Mélangez les tubes et lésez les tubes en repos, à la température de la chambre 10-60 minutes		Mélangez les tubes et lésez les tubes en repos, à la température de la chambre exactement 5 minutes. Mesurez l'absorption (A_D) à 546 nm en équilibrant avec le témoin, en cuvette de 1 cm	
Solution Fehling II ml	1,00	1,00		
	Après 5-30 minutes, mesurez l'absorption (A_T) à 578 nm, en équilibrant avec le témoin, en cuvette de 1 cm			

Calcul

$$\text{mg bilirubine totale/100 ml sérum} = E_T \times 11,3$$

$$\text{mg bilirubine directe/100 ml sérum} = E_D \times 14,6$$

$$\text{bilirubine indirecte} = \text{bilirubine totale} - \text{bilirubine directe}$$

Interférences

- L'hémolyse conduit à des valeurs faussement diminuées à cause de l'augmentation de l'absorption du témoin.
- Les sérums lipémiques donnent des valeurs faussement augmentées à cause d'effets de turbidité.
- La bilirubine est détruite par la lumière et la chaleur, aspects que doivent être considérés quant on fait les déterminations.

Valeurs normales

Adultes:

- bilirubine totale : 0,3 - 1,0 mg/dl
- bilirubine directe : jusqu'à 0,3 mg/dl.

Enfants:

- le 1^{ère} jour - jusqu'à 8 mg /dl;
- le 2^{ème} - jusqu'à 12 mg /dl;
- les jours 3-10 - jusqu'à 20 mg /dl;
- après une mois - jusqu'à 1,5 mg /dl.

Signification clinique

La bilirubine directe augmente:

- des causes hépato-cellulaires: hépatite, cirrhose, lésions toxiques, infections sévères, insuffisance cardiaque droite;
- des causes chol statiques: foie gras, abcès hépatique, tumeurs hépatiques, grossesse, ictère obstructif;
- des causes médicamenteuses: indométacine, methyldopa, tétracycline, phénothiazine, estrogènes, st ro ides anabolisants, cytostatiques, tuberculostatiques.

(L'ictère devienne visible quand la bilirubine totale > 2 mg%)

La bilirubine indirecte augmente:

- des causes hémolytiques: anémie hémolytique, résorption d'hématomes, infarctus pulmonaire, saignement intestinale, polycytemia vera, hyperbilirubinémie de shunt.
- des causes hépato-cellulaires: hépatite, cirrhose, lésions toxiques, infections sévères, insuffisance cardiaque droite, ictère juvénile intermittente, hyperthyroïdie, shunt porto-cave, rifampicine, st ro ides;
- des causes chol statiques: foie gras, abcès hépatique, tumeurs hépatiques, grossesse, ictère obstructif (mais beaucoup moins que la bilirubine directe).

B. La méthode de Jendrassik-Grof modifiée avec kit Analyticon

Reactifs

1. R1 : acide sulfanilique, acide chlorhydrique
2. R2 : azotite de sodium
3. R3 : caféine, benzoate de sodium
4. R4 : tartrate de sodium, hydroxyde de sodium

Mode opératoire

A. Bilirubine totale :

Réactifs, μ l	Témoin	Probe
R1	200	200
R2	-	50
R3	1000	1000
Probe	200	200
Melangez, incubez 10 – 60 minutes a 25°C		
Ajoutez :		
R4	1000	1000

Melangez, incubez 5 – 30 minutes a 25°C.

Mesurez l'absorption (A_T) à 578 nm, en équilibrant avec le témoin, en cuvette de 1 cm

Calcul :

$$\text{mg bilirubine totale/100 ml sérum} = E_P \times 10,8$$

B. Bilirubine directe:

Réactifs, μ l	Témoin	Probe
R1	200	200
R2	-	50
Solution NaCl 0,9%	2000	2000
Probe	200	200

Melangez, incubez 5 minutes a 25°C.

Mesurez l'absorption (A_T) à 546 nm, en équilibrant avec le témoin, en cuvette de 1 cm

Calcul :

$$\text{mg bilirubine directe/100 ml sérum} = E_P \times 13,7$$