

Protocole d'analyse toxicologique et biochimique

À partir de la IIème année Pharmacie, Médecine Générale et Médecine Dentaire

DOSAGE DE LA METHEMOGLOBINE SANGUINE

Extrait de : Loghin F., Popa D., Kiss B. Analyse et évaluations toxicologiques, Editura Medicală Universitară « Iuliu Hațieganu » Cluj-Napoca, 2004, p.113-114.

METHODE D'EVELYN MALLOY

PRINCIPE DE LA METHODE :

La méthémoglobine est une hémoglobine dont le fer est à l'état ferrique. Elle est incapable de fixer l'oxygène de façon réversible et donc de fonctionner comme pigment respiratoire. A l'état normal, moins de 1% de l'hémoglobine totale (Hb) est sous forme de méthémoglobine (MetHb), mais ce pourcentage augmente sous l'action de dérivés tels que nitrites, chlorates, dérivés de l'aniline et du nitrobenzène, sulfamides, etc., substances qualifiées de méthémoglobinisantes.

Le dosage de la méthémoglobine sanguine est basé sur l'absorption spectrophotométrique de la méthémoglobine à 630 nm, alors que l'oxyhémoglobine et la cyanométhémoglobine n'absorbent que très peu la lumière à cette longueur d'onde. L'opération comporte le dosage de la méthémoglobine d'une part et celui de l'hémoglobine totale d'autre part. L'addition de KCN dans une partie de l'hémolysat d'un échantillon sanguin transforme toute la méthémoglobine présente en cyanométhémoglobine. L'absorbance de l'hémolysat est mesurée à 630 nm, avant et après addition de KCN. La différence entre ces deux absorbances est proportionnelle à la quantité de méthémoglobine présente.

Dans une autre partie de l'hémolysat de l'échantillon, l'addition de ferricyanure de potassium convertit toute l'hémoglobine présente en méthémoglobine. La mesure de l'absorbance avant et après addition de KCN permet de connaître le taux d'hémoglobine totale.

Le résultat est exprimé en pourcentage de méthémoglobine par rapport à l'hémoglobine totale de l'échantillon.

REACTIFS :

- tampon phosphate M/20, pH 6,6
- solution aqueuse de ferricyanure de potassium
- solution aqueuse de KCN, 5g/100 ml (très toxique), neutralisée par un volume égal d'acide acétique à 12%

MODE OPERATOIRE :

a) Préparation de la solution d'hémoglobine

Dans un tube à centrifuger, introduire : 0,2 ml de sang total bien homogénéisé (prélevé sur héparine ou EDTA) et 5 ml d'eau distillée. Agiter, attendre 10 minutes, puis ajouter 5 ml de tampon phosphate pH 6,6. Centrifuger pendant 5 minutes à 4000 tours/minute pour éliminer les stromas globulaires. Le surnageant doit être limpide.

b) Lectures spectrophotométriques

Lire contre une cuve témoin contenant 3 ml de tampon phosphate M/40 (tampon phosphate M/20 dilué au ½ avec de l'eau distillée).

	Tube A	Tube B
Surnageant	3 ml	3 ml
Ferricyanure de K à 5%	1 goutte	0
Eau distillée	0	1 goutte
	Mélanger. Lecture à 630 nm après 5 minutes.	
KCN 5%	1 goutte	1 goutte
	Mélanger. Lecture à 630 nm après 5 minutes.	

L'absorbance due à la méthémoglobine initialement présente dans le sang est :

$A_{1B} - A_{2B}$ (A_{1B} est l'absorbance de la solution B, première lecture, A_{2B} est l'absorbance de la solution B, deuxième lecture)

L'absorbance due à la méthémoglobine totale provenant de l'oxydation de l'hémoglobine et de l'oxyhémoglobine par le ferricyanure de K d'une part et de la méthémoglobine initialement présente dans le sang d'autre part est :

$A_{1A} - A_{2A}$ (A_{1A} est l'absorbance de la solution A, première lecture, A_{2A} est l'absorbance de la solution A, deuxième lecture).

Le rapport : $[(A_{1B} - A_{2B}) / (A_{1A} - A_{2A})] \times 100$

exprime la quantité de méthémoglobine dosée pour 100 parties de pigments hémoglobiques totaux.

REMARQUES PRATIQUES IMPORTANTES :

Il est interdit de jeter le contenu sanguin de chaque cuve après dosage dans l'évier car il risque avoir des émanations d'acide cyanhydrique pouvant

provoquer des intoxications graves. Il faut jeter le contenu des cuves ainsi que l'hémolysat dans un bocal contenant de l'eau de javel concentrée. Si une goutte de cyanure tombe sur la paillasse, si la cuve est renversée ou si les doigts sont souillés de sang cyanuré, essuyer ces surfaces immédiatement avec un kleenex et le jeter dans le bocal prévu. Rincer ensuite ces surfaces soigneusement avec de l'eau.

INTERPRETATION DES RESULTATS :

Chez les sujets normaux, le taux de méthémoglobine est inférieur à 1%. Elle apparaît dans un grand nombre d'intoxications par : chlorate de potassium, nitrites, aniline, nitrobenzène, orthotoluidine, acétanilide, antipyrine, phénacétine, sulfamides, chloroquine, prilocaïne, etc. La mort survient pour une teneur en méthémoglobine de 66% de l'Hb totale.

EXPLOITATION DU DOCUMENT

I. Dans la première partie recensant le matériel requis à la réalisation des épreuves et traitant de la préparation de la solution d'hémoglobine:

1. Dans le tableau ci-après, complétez les pointillés avec les termes correspondant aux images. Référez-vous à la liste ci-dessous :

tube à centrifuger, tubes à essai, tube de prélèvement du sang sur EDTA, échantillons de sang total, globules rouges, hémolysat, oxyhémoglobine, ferricyanure de potassium, tampon phosphate, pipettes, centrifuge, spectrophotomètre UV-Vis, cuves de spectrophotomètre, spectre UV-Vis, calculatrice.



.....


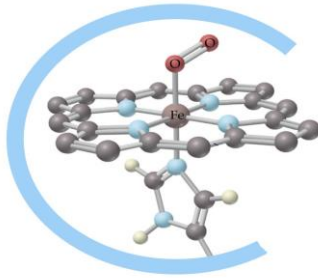


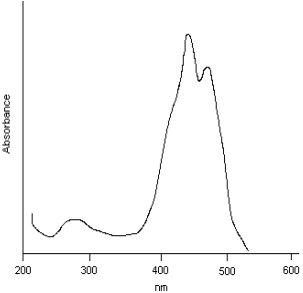


genedirex.com



.....

.....

aparatemasura.wordpress.com

 <p>.....</p> <p>.....</p> <p>hannainst.ro</p>	 <p>.....</p> <p>.....</p> <p>patofisio.wordpress.com</p>
 <p>.....</p> <p>.....</p> <p>eonet.ne.jp</p>	 <p>.....</p> <p>.....</p> <p>fldlabo.com</p>
 <p>.....</p> <p>...</p> <p>austincc.edu</p>	 <p>.....</p> <p>.....</p> <p>boeco.com</p>
 <p>.....</p> <p>.....</p> <p>fr.123rf.com</p>	 <p>.....</p> <p>.....</p> <p>fr.fotolia.com</p>

 <p>.....</p> <p>.....</p> <p>solostocks.fr</p>	 <p>.....</p> <p>.....</p> <p>sks-science.com</p>
 <p>.....</p> <p>.....</p> <p>cdiscount.com</p>	 <p>.....</p> <p>.....</p> <p>maxisciences.com</p>
 <p>.....</p> <p>french.alibaba.com</p>	

2. Précisez toutes les étapes de la préparation de la solution d'hémoglobine à partir de l'extrait suivant en utilisant le pronom indéfini ON. Réécrivez le texte et reproduisez la même information en nominalisant les verbes. Faites une liste chronologique des actions successives.

« Dans un tube à centrifuger, introduire : 0,2 ml de sang total bien homogénéisé (prélevé sur héparine ou EDTA) et 5 ml d'eau distillée. Agiter, attendre 10 minutes, puis ajouter 5 ml de tampon phosphate pH 6,6.

Centrifuger pendant 5 minutes à 4000 tours/minute pour éliminer les stromas globulaires. Le surnageant doit être limpide. »¹

- a. On prélève le sang
- b.
- c.
- d.
- e.
- f.
- g.
- h.
- i.
- j.

3. Élaborez des phrases avec les constructions ci-dessous en utilisant le pronom indéfini ON :

a) prélever sur

.....
.....

b) diluer avec

.....
.....

c) centrifuger à

.....
.....

d) éliminer par

.....
.....

4. Rédigez maintenant une seule phrase complexe constituée de quatre phrases simples faite sur le modèle de 3 a), b), c) et d). Mettez en évidence la chronologie des faits en utilisant les marqueurs de temps *tout d'abord, après, ensuite, enfin*. Vous pouvez aussi remplacer le pronom indéfini ON par la construction impersonnelle IL FAUT.

¹ Extrait de : Loghin F., Popa D., Kiss B. *Analyse et évaluations toxicologiques*, Editura Medicală Universitară « Iuliu Hațieganu » Cluj-Napoca, 2004, p.113-114.

.....
.....
.....
.....
.....

II. Lexique médical / pharmaceutique :

1. Faites la différence entre :

- a) sang total :
- b) hémolysat :
- c) hémoglobine :
- d) oxyhémoglobine :
- e) méthémoglobine :
- f) cyanméthémoglobine :
- g) carbohémoglobine :
- h) carboxyhémoglobine :

2. Donnez deux synonymes pour les globules rouges :

.....

3. Pour le sang il y a deux radicaux spécifiques : *hém(o)*, *hémat(o)*, et pour le taux sanguin il y a le suffixe *-émie*. Indiquez trois termes médicaux dans lesquels entrent ces unités de sens.

<i>hém(o)</i>	<i>hémat(o)</i>	<i>-émie</i>

4. Remplissez les cases vides du tableau en donnant les définitions des termes suivants :

a. cyanose [cyan(o) (gr.) = bleu]	
b. érythrose	
c. méthémoglobinémie	

d. hyperlipidémie	
e. hypocalcémie	
f. hypoxie	
g. hémocrite	
h. hypoxémie	
i. hémogramme	
j. hématomèse [<i>emesis</i> (gr.) = vomissement]	
k. hémoptysie [<i>ptysis</i> (gr.) = crachat]	

III. Dans la partie relative au mode opératoire :

1. Le terme de *mode opératoire* désigne :

- a) une analyse qualitative spectrométrique
- b) un dosage sanguin
- c) une méthode de diagnostic hématologique
- d) une méthode de traitement

2. La notion de *dosage spectrophotométrique* indique un type d'analyse quantitative. Associez dans le tableau ci-dessous les méthodes d'analyse aux appareillages ou aux réactifs appropriés (choix multiples) :

1. chromatographie sur couche mince	A. électrodes
2. distillation	B. ampoule à décanter
3. volumétrie	C. hélium
4. extraction par des solvants	D. réfrigèrent descendant
	E. cuve chromatographique

organiques 5. cristallisation 6. spectrophotométrie 7. chromatographie en phase gazeuse 8. gravimétrie 9. électrophorèse 10. chromatographie liquide haute performance 11. analyses immunochimiques	F. four et creuset G. phase mobile liquide H. burette I. anticorps J. cellule photoélectrique K. indicateur L. entonnoir à filtre
--	---

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

3. Les mesures de sécurité et de protection du travail sont particulièrement importantes dans les laboratoires. Précisez quelques règles générales apprises aux laboratoires chimiques que vous devez y appliquer. Décrivez les vêtements et les accessoires que vous devez y porter.

.....

 ...

4. Concernant le paragraphe intitulé *Interprétation des résultats* :

a) Quel est l'élément à comparer pour arriver à un diagnostic plausible ?

.....

b) Quelles sont les valeurs seuil qui permettent d'établir le diagnostic et le pronostic à risque mortel ?

.....

IV. Lisez le texte suivant qui fait référence aux maladies associées à la méthémoglobinémie :

« La MetHb est une forme d'hémoglobine dans laquelle le fer se trouve sous forme oxydée Fe^{3+} (ferrique), ce qui l'empêche de fixer l'oxygène (O_2) d'où l'apparition de la cyanose. La MetHb se définit par un taux supérieur à 1 %. L'augmentation de la MetHb est soit d'origine toxique (agents oxydants : nitrites, nitrates, chlorates...), de loin la cause la plus fréquente, soit due à une hémoglobine anormale (Hb M), soit consécutive à un déficit enzymatique (NADH-cytochrome b5 réductase ou cytochrome b5 réductase) responsable de méthémoglobinémie congénitale récessive (MCR). Le rôle de la NADH-cytochrome b5 réductase (EC. 1.6.2.2) est de réduire la méthémoglobine physiologiquement formée (environ 3% de l'hémoglobine totale tous les jours) (figure 1).

La MCR décrite en 1959 par Scott et Griffith a été initialement observée chez les esquimaux et les indiens d'Alaska. Il s'agit d'un déficit congénital enzymatique en NADHcytochrome b5 réductase, maladie génétique rare à transmission autosomique récessive. Cette enzyme existe sous deux formes : une forme microsomiale d'expression ubiquitaire et une forme soluble exclusivement érythrocytaire.

Deux formes biologiques et cliniques sont à distinguer : la MCR de type I, bénigne, caractérisée par un déficit enzymatique limité aux érythrocytes (déficit de la forme soluble uniquement) et une cyanose bien tolérée, et la MCR de type II, sévère, avec un déficit en NADH-cytochrome b5 réductase généralisé à tous les types cellulaires (déficit de la forme microsomiale et soluble) et une symptomatologie neurologique marquée (encéphalopathie avec arriération mentale). À la naissance, rien ne différencie ces deux formes, le tableau typique est progressivement constitué entre 3 et 9 mois. L'évolution est favorable sous traitement (à vie) dans le cas de la MCR de type I ; en revanche, dans le cas de la MCR de type II, les enfants atteignent rarement l'âge de 10 ans (décès par fausse-route fréquent).

Le traitement préventif implique la contre-indication de tous les médicaments oxydants (primaquine, Nivaquine®, phénylhydrazine, sulfamides, xylocaïne...) et repose sur l'administration de produits anti-oxydants et activateurs des voies accessoires de réduction de la MetHb (acide ascorbique 500-1 000 mg/j, riboflavine 20-60 mg/j, bleu de méthylène si nécessaire) permettant de maintenir un taux de MetHb inférieur à 10 %. Ce traitement

n'est envisageable que dans la MCR de type I puisque dans la MCR de type II le contexte neurologique prédomine par rapport à la MetHb et la cyanose. »²

Au regard du texte précédent, indiquez si les phrases ci-dessous sont vraies ou fausses.

1. La méthémoglobinémie congénitale récessive est due à une hémoglobine anormale. **V/F**
2. Le bleu de méthylène peut être utilisé en thérapie des patients avec méthémoglobinémie pour régénérer l'hémoglobine. **V/F**
3. La forme la plus grave de la méthémoglobinémie congénitale récessive peut être diagnostiquée prénatale. **V/F**
4. Les populations avec un déficit enzymatique en NADH-cytochrome b5 réductase sont plus sensibles aux médicaments oxydants tels que primaquine, phénylhydrazine, sulfamides, etc. **V/F**
5. La méthémoglobinémie congénitale récessive de type II touche surtout le cerveau. **V/F**
6. La cyanose, le signe caractéristique de la méthémoglobinémie, est due à une incapacité de l'organisme d'utiliser l'oxygène qui est présent au niveau cellulaire. **V/F**

V. Apprenez à utiliser le langage médical spécialisé.

Au lieu de :	Dites :
Il a la peau bleue due à une accumulation sous-cutanée de sang.	
Il a froid et ses extrémités sont bleues.	
Il vomissait du sang.	

² Source : Schwartz L, Franck P, Debruille C, Olivier JL, Vigneron C. *Méthémoglobinémie congénitale récessive : une cause rare de cyanose du nouveau-né*, Ann Biol Clin (Paris). 2005;63(3): 314-316.

Ce matin il a craché du sang.	
Ce médicament détruit les globules rouges.	
Il a une baisse des globules rouges à cause d'un manque de fer.	
La méthémoglobinémie congénitale récessive induit des troubles du cerveau.	
Le cœur est très sensible à une insuffisance d'oxygène au niveau du sang.	