

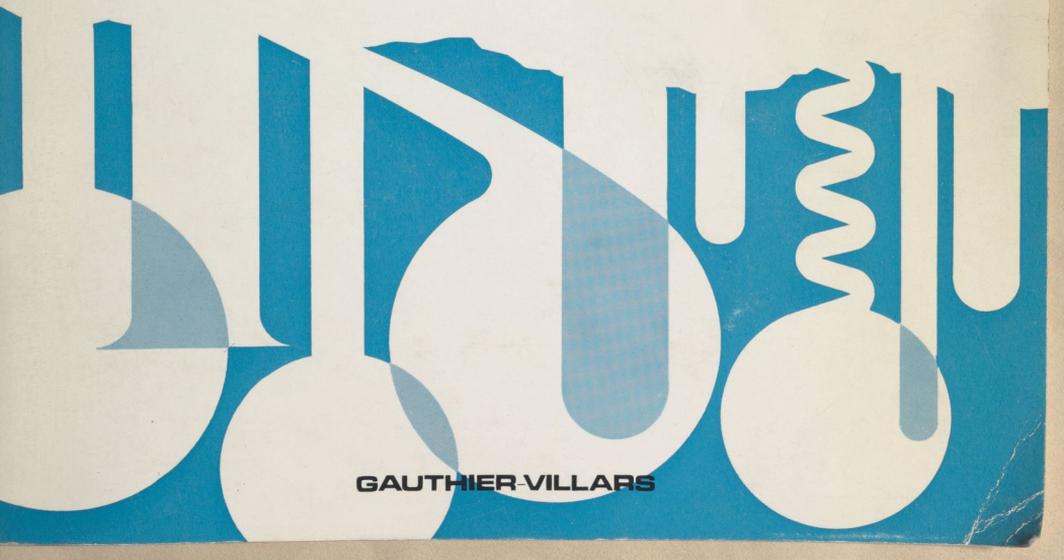
5
6

CHOIX DE TECHNIQUES DE

biochimie clinique

GUY DEVAUX

R. CROCKETT
A. BRACHET-LIERMAIN
E. JOUZIER
A. RUFFIE



GAUTHIER-VILLARS

CHOIX DE TECHNIQUES
DE
BIOCHIMIE CLINIQUE

H° V
27554

FACTEUR DE TERTIÈRE
DE
BIOCHIMIE CLINIQUE

CHOIX DE TECHNIQUES
DE
BIOCHIMIE CLINIQUE

Guy DEVAUX

Professeur

à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Poitiers

R. CROCKETT

Professeur

à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux
Assistant de Biologie des Hôpitaux

A. BRACHET-LIERMAIN

Chef de Travaux

à la Faculté de Médecine et de Pharmacie
de Bordeaux
Assistant de Biologie des Hôpitaux

E. JOUZIER

Maître de Conférences à la Faculté de Médecine
et de Pharmacie de Bordeaux
Attaché de Biologie des Hôpitaux

A. RUFFIE

Assistant à la Faculté de Médecine
et de Pharmacie de Bordeaux
Attaché de Recherche au Laboratoire d'Horonologie
du C. H. U. de Bordeaux

DEUXIÈME ÉDITION REVUE ET AUGMENTÉE

GAUTHIER-VILLARS ÉDITEUR

55, quai des Grands-Augustins, Paris 6^e

1970



© Gauthier-Villars, 1970.

Toute reproduction même partielle, de cet ouvrage est interdite. La copie ou reproduction, par quelque procédé que ce soit : photographie, microfilm, bande magnétique, disque ou autre, constitue une contrefaçon passible des peines prévues par la loi du 11 mars 1957 sur la protection des droits d'auteurs.

AVANT-PROPOS

La pratique de la chimie analytique enseigne rapidement la difficulté du choix — parmi toutes celles qui ont été proposées — d'une bonne technique, bien adaptée au but que l'on veut atteindre.

Et ceci est encore plus vrai en biochimie clinique où les milieux biologiques apportent des difficultés supplémentaires. Aux dosages de plus en plus délicats qui visent à explorer toujours plus en détail les divers métabolismes, s'ajoute un nombre très important d'examen systématiques de routine qui oblige à utiliser des techniques rapides sans pour cela sacrifier précision ou spécificité.

*
* *

Aussi avons-nous réuni dans ce recueil un choix des principales techniques de biochimie clinique. Pour faire ce choix, nous nous sommes basés sur les critères qui nous avaient déjà guidés pour la première édition : valeur propre des méthodes, rapidité et simplicité des techniques et surtout expérience pratique de ces dernières. Les circonstances de notre carrière nous ayant personnellement amené à perdre le contact avec la biochimie clinique pratique, nous avons tenu, pour que cette deuxième édition soit nourrie de la même sève que la première, à nous assurer le concours de quatre anciens internes en Pharmacie des hôpitaux de Bordeaux toujours quotidiennement au contact des réalités du laboratoire. Qu'ils soient amicalement remerciés de leur collaboration.

Depuis 1962, l'évolution de la biochimie clinique a été considérable et s'est traduite à la fois par l'apparition d'examen nouveaux destinés à une exploration plus fine des divers mécanismes biochimiques, et par un bouleversement des méthodes de travail : utilisation de nouvelles techniques, apparition de méthodes rapides, modification des procédés traditionnels, développement de l'automatisation. La présente édition tente de tenir compte de cette évolution, les nouvelles techniques ayant toutefois été introduites avec prudence et toujours sur le critère de l'expérience; c'est dire que nous ne prétendons pas que les méthodes proposées soient les seules valables. Nous avons délibérément écarté les techniques automatiques, non point qu'elles ne constituent pas à nos yeux une voie d'avenir, mais parce que les décrire nous eut amené à reproduire le plus souvent les schémas analytiques préconisés et fournis par la firme Technicon. On peut d'ailleurs supposer une prochaine et importante évolution dans ce domaine de l'automatisation (voir G. DARBON, L'analyse rapide automatique, *Concours médical*, 1969, 91, p. 1855).

Le Professeur R. CROCKETT nous fait bénéficier de ses larges compétences tant théoriques que pratiques dans le domaine de l'exploration du métabolisme lipidique : cholestérol, phospholipides, acides gras estérifiés ou non, triglycérides, etc. Il a tenu à exposer des techniques personnelles parfois inédites pour la mise au point desquelles MM. D. GRENIÉ et J.-B. FOURTILLAN, assistants à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux et internes en Pharmacie des hôpitaux de Bordeaux, lui ont apporté une collaboration particulièrement efficace.

Le Professeur agrégé E. JOUZIER a introduit les ultramicrométhodes particulièrement précieuses pour les explorations pédiatriques et s'est chargé des chapitres ayant trait à l'électrophorèse sur cellogel, à l'aldolase, aux phosphatases alcalines et à la lipoprotéine-lipase.

M^{me} A. BRACHET-LIERMAIN, qui possède une longue expérience dans le domaine de l'exploration de l'équilibre acidobasique et de l'hématose, a rédigé un important chapitre sur ce sujet, rarement traité en détail sur le plan pratique dans les ouvrages classiques, et que nous avons donc pensé utile de développer largement. Elle a également revu ce qui concerne la détermination de la masse sanguine et introduit le dosage de la lactacidémie ainsi que la mesure de la pression osmotique.

M. A. RUFFÉ s'est plus spécialement occupé des problèmes d'hormonologie — qu'il a volontairement limités aux examens courants et aisément réalisables — et a introduit une intéressante étude sur la bilirubine du liquide amniotique.

En dehors des apports précédents, les divers chapitres ont été revus et se sont enrichis d'examens nouveaux (céruléoplasmine, chromatographie des sucres urinaires, acides sialiques, test au cétaïlon, chromatographie des aminoacides urinaires, ornityl-carbamyl-transférase, test à la sueur, etc.).

Comme nous l'écrivions déjà en 1962, en présentant cet ouvrage, nous espérons, non point instruire notre lecteur (nous avons d'ailleurs volontairement éliminé toute considération relative à la recherche), mais simplement lui offrir un recueil où il puisse trouver sans perte de temps les renseignements ordinairement épars utiles à son travail. Le succès rencontré par la première édition nous permet de penser que nous sommes sur la bonne voie, mais c'est avec reconnaissance que nous recevrons critiques et suggestions.

En terminant, il nous est agréable de remercier notre éditeur qui a tenu à assurer à notre ouvrage une présentation soignée, claire et attrayante.

Professeur G. DEVAUX.

EXPLORATION DU MÉTABOLISME HYDRO-MINÉRAL

SODIUM ET POTASSIUM

Le dosage de ces deux éléments est actuellement courant. On dispose de deux types de méthodes :

— Des *méthodes chimiques*, longues, laborieuses, exigeant des quantités importantes de sang. Elles sont actuellement complètement abandonnées et nous avons renoncé à en signaler même les références comme nous l'avions fait dans la première édition.

— Une *méthode physique*, la photométrie de flamme, extrêmement rapide et ne demandant que de très faibles volumes de sang. C'est maintenant la seule méthode digne d'être utilisée dans la pratique journalière.

MÉTHODE PHYSIQUE : PHOTOMÉTRIE DE FLAMME

Principe. — On sait que lorsqu'un atome est excité, c'est-à-dire amené à un niveau d'énergie supérieur, et qu'il retombe à son état primitif, il émet une radiation électromagnétique. Cette excitation peut être obtenue par chauffage dans une flamme : il y a émission d'une série de raies caractéristiques de l'atome, que l'on peut sélectionner à l'aide de filtres interférentiels.

Pour une même température de flamme (en effet, si la flamme est plus chaude, un plus grand nombre d'atomes sera excité, et les raies émises seront plus intenses), l'intensité des raies émises est proportionnelle à la concentration du métal dans la solution.

La lumière émise (et filtrée) agit sur une cellule photoélectrique, et finalement, l'intensité du courant produit, est proportionnelle à la concentration de l'élément à doser.

A. — Macrométhode

Prélèvement. — Le dosage peut être effectué indifféremment sur le sérum ou sur le plasma. Cependant, le fait de décoller les filaments de fibrine avant la centrifugation pour obtenir le sérum, amène parfois une légère hémolyse. Or les hématies contiennent environ 20 fois plus de potassium que le plasma, ce qui peut amener des erreurs très importantes.

Aussi, nous conseillons de prélever 5 ml de sang dans un tube à centrifuger contenant quelques gouttes d'héparine, et de centrifuger ensuite dès que possible pour éviter les échanges entre le plasma et les globules. Si le dosage doit être différé, séparer le plasma.

Bien entendu, il faut proscrire des anticoagulants comme le fluorure de sodium, l'oxalate de sodium ou de potassium, le citrate de sodium, le « Liquoid » (= anétholdisulfonate de sodium), etc.

Réactifs. — Tous les réactifs, et plus spécialement les solutions étalons, *doivent être conservés dans des flacons en polyéthylène* et non dans des récipients en verre; en effet, les silicates du verre cèdent plus ou moins rapidement des ions Na^+ et K^+ à la solution dont le titre s'élève progressivement.

— Eau bidistillée.

— Solutions-étalons.

Selon l'appareil que l'on utilise, le titre des solutions-étalons varie. Nous donnerons ceux que nous utilisons avec un photomètre à flamme de Jouan.

On a montré que la présence de sodium dans le sérum provoquait une erreur par excès dans l'appréciation des raies du potassium.

On doit donc ajouter aux solutions-étalons de potassium une quantité de sodium correspondant à peu près à celle qu'apporte le sérum : avec cette précaution, on retrouve pour la valeur normale de potassium les chiffres obtenus par voie chimique.

— Solution-mère de sodium à $1 \text{ g}/_{100}$: $2,543 \text{ g}/_{100}$ de NaCl pur.

Pour l'usage, on obtient une solution-fille à $20 \text{ mg}/_{100}$ par dilution au 1/50 avec de l'eau bidistillée.

— Solution-mère de potassium à $500 \text{ mg}/_{100}$ (+ $3 \text{ g}/_{100}$ de sodium) :

$0,955 \text{ g}/_{100}$ de KCl pur;

$7,630 \text{ g}/_{100}$ de NaCl pur.

Pour l'usage, on obtient une solution-fille à $5 \text{ mg}/_{100}$ par dilution au 1/100 avec de l'eau bidistillée.

Technique. — Le titre des dilutions que l'on doit faire avant le dosage est variable suivant les appareils. De toutes manières, elles doivent être faites avec le plus grand soin. Pour mesurer l'eau bidistillée, nous conseillons l'emploi d'une burette de précision, à zéro automatique (ou d'un jaugeur Commartin) ainsi, l'erreur due à la verrerie est constante (ce qui n'est pas si on utilise des ballons jaugés). Le liquide à diluer sera mesuré à l'aide de micropipettes.

A titre indicatif, nous utilisons les dilutions suivantes :

Plasma :	Sodium	: Dilution au 1/200. Eau bidistillée.....	20 ml
		Plasma.....	0,1 ml
Potassium :		Dilution au 1/100. Eau bidistillée.....	20 ml
		Plasma.....	0,2 ml

Urines : Sodium : En général, la dilution au 1/200 convient.

Potassium : En général, la dilution au 1/400 convient.

Parfois, il est nécessaire de diluer moins ou davantage.

On étalonne ensuite l'appareil en faisant le zéro avec de l'eau bidistillée et le 100 avec la solution-fille de l'étalon.

Puis on passe les dosages, en prenant soin de rincer abondamment à l'eau bidistillée entre chaque solution.

On se reporte à la courbe d'étalonnage.

Expression des résultats. — Souvent exprimés, encore, en grammes par litre, alors que la notation en milliéquivalents permet de mieux se rendre compte de l'équilibre électrolytique du sujet. C'est donc en milliéquivalents par litre que l'on doit donner les résultats.

Rappelons que le taux en milliéquivalents est donné par la formule suivante :

$$\text{méquiv/l}^{(1)} = \frac{\text{concentration en mg}^0_{/100} \times \text{valence}}{\text{poïds atomique}}$$

(voir table de conversion en milliéquivalents, p. 12).

Un exemple suffira à faire comprendre la supériorité de ce mode d'expression.

Il y a en moyenne dans le plasma :

3,60 g $^0_{/100}$ de chlore;

3,25 g $^0_{/100}$ de sodium.

A première vue, on pourrait dire que la concentration en chlore est plus élevée que celle en sodium. Or, si nous transformons ces valeurs en milliéquivalents, elles deviennent 142 pour le sodium et 100 seulement pour le chlore, ce qui indique que le chlore ne neutralise que les 2/3 du sodium plasmatique.

B. — Ultramicrométhode

Appareillage et réactifs. — Nous utilisons le photomètre à flamme « IL », modèle 143 (R. Delhomme et Cie, 30, boulevard Saint-Jacques, 75-Paris, 14^e). Cet appareil met en jeu un étalon interne de lithium pour l'étalonnage et les mesures et donne d'excellents résultats.

Comme nous l'avons déjà signalé à propos de la macrométhode, tous les réactifs *doivent être conservés dans des flacons de polyéthylène.*

— Eau bidistillée.

— Solution-mère de lithium à 1500 méquiv/l.

Pour l'usage, on obtient une solution-fille à 15 méquiv/l par dilution au 1/100 avec de l'eau bidistillée.

— Solution-étalon de sodium à 140 méquiv/l : 8,19 g $^0_{/100}$ de NaCl pur.

— Solution-étalon de potassium à 5 méquiv/l : 0,372 g $^0_{/100}$ de KCl pur.

Remarque. — Pour préparer la solution-fille de lithium, utiliser de préférence la solution-mère de lithium « IL ». Elle contient en effet un agent mouillant non ionique ainsi qu'un composant protecteur. L'agent mouillant est important pour éviter la mousse et la formation de gouttelettes sur les parois de la chambre d'atomisation. Les établissements Delhomme peuvent également fournir les solutions de sodium et de potassium.

Technique. — Introduire respectivement dans des godets en matière plastique de 2 ml (fournis par Compagnie Technicon-95-Domont) à l'aide d'une micropipette de Sanz :

— 10 μ l de solution-étalon (de sodium ou de potassium);

— 10 μ l de sérum.

(¹) Pour l'abréviation de *milliéquivalent*, nous avons retenu *méquiv*, conforme à l'usage de l'Académie des Sciences dans ses *Comptes-Rendus*, plutôt que *mEq* encore utilisé par de nombreux auteurs.

Ajouter dans chaque godet 2 ml de la solution-fille de lithium à l'aide d'une seringue aspirante et foulante (B. D. Cornall, Becton-Dickinson et C^{ie}) d'un geste brusque de manière à assurer le mélange.

Faire le zéro de l'appareil en utilisant la solution-fille de lithium pure.

Passer l'étalon (de sodium ou de potassium) et amener les lecteurs digitaux à 140 (pour le sodium) et à 5 (pour le potassium).

Passer l'échantillon de sérum à mesurer, préparé comme il vient d'être dit. La lecture est directe en milliéquivalents par litre.

C. — Interprétation

1° RÉSULTATS NORMAUX :

— *Sodium* :

Plasma : 3,10 à 3,45 g/l
soit 135 à 150 méquiv/l.

Urine : Variable suivant l'alimentation.

Le seul intérêt est le contrôle d'un régime désodé strict : s'il est convenablement suivi, la natrurie doit être inférieure à 400 mg par 24 heures.

— *Potassium* :

Plasma : 170 ± 10 mg/l.
soit $5,2 \pm 0,3$ méquiv/l.

Le taux de potassium diminue légèrement après les repas et augmente lors de l'exercice musculaire.

Urine : Variable avec l'alimentation.

Pendant l'élimination est rarement inférieure à 2 g par 24 heures.

2° VARIATIONS PATHOLOGIQUES :

Comme nous l'avons vu, ce sont surtout les variations du sodium et du potassium plasmatiques qui sont intéressantes à considérer.

— *Sodium plasmatique* :

— Augmente dans :

- les états de déshydratation (globale ou limitée au secteur extracellulaire);
- les surcharges salines (par suite d'exsanguino-transfusion ou de rein artificiel);
- les insuffisances cardiaques;
- l'hyperfonctionnement corticosurrénal (primaire ou secondaire);
- l'administration d'hormones cortico-surrénales (minéralo-corticoïdes).

— Diminue dans :

- les déperditions salines,
 - coup de chaleur,
 - vomissements,
 - diarrhées, etc.;
- les insuffisances corticosurrénales.

— *Potassium plasmatique :*

— Augmente dans :

— *tous les états de choc :*

- brûlures,
- hémorragies abondantes,
- infarctus du myocarde,
- syndromes malins;

— les insuffisances surrénales;

les syndromes hémolytiques aigus (en particulier septicémie à *perfringens* ou chroniques).

— Diminue dans :

— *les insuffisances d'apport en potassium :*

- carence alimentaire en potassium,
- vomissements,
- aspiration gastro-intestinale;

— *les pertes de potassium :*

- Par voie digestive; vomissements, diarrhées, traitements cortisoniques, thérapeutique par les résines cationiques.
- Par voie rénale : thérapeutique par les sulfamides inhibiteurs de l'anhydrase carbonique (Acétazolamine ou « Diamox ») et les diurétiques mercuriels; excès d'hormones cortico-surrénales : traitements cortisoniques.
- Par voie extra-rénale : dialyse péritonéale, rein artificiel.

— *les altérations du métabolisme du potassium :*

- états d'alcalose,
- sécrétion exagérée d'insuline,
- excès d'ACTH ou d'hormones surrénales (Stress, maladie de Cushing),
- paralysie périodique familiale de Westphal.

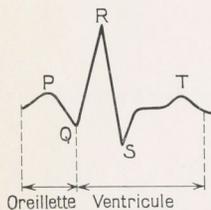
En outre, il est important de connaître les variations de la kaliémie au cours de l'acidocétose diabétique grave :

— Avant tout traitement, il existe une hyperkaliémie.

— Sous l'influence de l'insuline, on observe rapidement une diminution du potassium plasmatique, aboutissant à l'hypokaliémie.

L'excitabilité musculaire dépend, entre autres facteurs, de la valeur de la kaliémie. Ceci est particulièrement vrai en ce qui concerne le myocarde. Il en résulte que *l'hyper comme l'hypokaliémie peuvent entraîner des désordres cardiaques graves.*

A titre indicatif, nous donnons, d'après J.-E. COURTOIS et R. PERLÈS (*Précis de Chimie biologique*, t. I, 1959, Masson éd., Paris), les modifications de l'électrocardiogramme en fonction de la kaliémie :



*Kaliémie normale
ou sub-normale.*

140 à 260 mg/l
soit 3,5 à 6 méquiv/l.



Hypokaliémie modérée.
120 mg/l

soit 3 méquiv/l.
Aplatissement de l'onde T.



Hyperkaliémie moyenne.
280 mg/l

soit 7 méquiv/l.
Allongement des espaces QT
puis PR; apparition d'une
pointe en T.



Hypokaliémie importante.
40 mg/l

soit 1 méquiv/l.
Allongement de l'espace QT.
Naissance d'une onde U.
Dépression de ST.

CHLORE

Pour doser le chlore dans le sang, l'urine, et le liquide céphalo-rachidien, on dispose des méthodes argentimétriques de Mohr et de Charpentier-Volhard, toujours très utilisées et excellentes.

Toutefois, on emploie de plus en plus la méthode mercurimétrique de Schales : en effet, le réactif au nitrate mercurique est stable, et ne présente pas l'inconvénient de noircir les burettes comme le nitrate d'argent. De plus, dans le cas du chlore plasmatique et du chlore sanguin total, cette méthode évite la destruction nitropermanganique, une simple défécation tungstique suffisant. Nous recommandons vivement cette technique pour le sang; dans le cas de l'urine et du liquide céphalo-rachidien, on peut continuer à utiliser les techniques argentimétriques, le virage de la diphénylcarbazonne utilisée comme indicateur dans la méthode mercurimétrique étant moins net avec ces liquides.

I. — DOSAGE DU CHLORE PLASMATIQUE (MACROMÉTHODE) ET ÉTABLISSEMENT DU RAPPORT ÉRYTHROPLASMATIQUE

Références. — O. SCHALES et S. SCHALES, *J. Biol. Chem.*, 1941, **140**, p. 879.

Principe. — En milieu acide (pH inférieur à 3), les ions mercuriques réagissent sur les ions chlore pour donner naissance à des molécules non dissociées de chlorure mercurique. L'indicateur de fin de réaction est la diphénylcarbazonne, qui donne un complexe violet avec Hg^{++} , stable en milieu acide dilué.

Réactifs :

- Tungstate de sodium à 10 %.
- H_2SO_4 , 2/3 N.
- Diphénylcarbazonne : Solution saturée dans l'alcool à 95°. Conserver au réfrigérateur et à l'abri de la lumière.
- HNO_3 voisin de N :
 HNO_3 ($d = 1,38$) : 75 ml (ou 90 ml de HNO_3 , $d = 1,33$).
 Eau distillée : q. s. p. 1000 ml.
- NaCl étalon à 1 g %₁₀₀.
- Nitrate mercurique :

HNO_3 N.....	40 ml
Eau distillée.....	300 ml
Nitrate mercurique.....	3 g. Dissoudre
Eau distillée, q. s. p.....	1000 ml

Titrer la solution avec NaCl à 1 %₁₀₀ et l'ajuster de telle sorte que 1 ml de nitrate mercurique corresponde à 1 mg de NaCl.

On obtient ainsi du nitrate mercurique à lecture directe en NaCl à condition d'opérer sur 1 ml de liquide à doser.

Ce réactif sera à lecture directe en chlore si on opère sur 0,6 ml de liquide à doser

$$\left(1 \times \frac{35,5}{58,5} = 1 \times 0,606 \neq 0,6 \right).$$

Prélèvement. — 5 à 7 ml de sang recueilli sur héparine dans un tube à centrifuger.

Technique :

1° Déterminer l'hématocrite si le rapport érythroplasmatisque est demandé.

2° Chlore plasmatique :

Dans un tube à centrifuger, mesurer :

Plasma.....	1 ml
Eau distillée.....	7 ml
Tungstate de sodium à 10 %.....	1 ml
H_2SO_4 2/3 N.....	1 ml

Agiter et centrifuger.

Mesurer dans un bécher :

Liquide clair.....	6 ml (= 0,6 ml de plasma)
Eau distillée.....	4 ml
Diphénylcarbazoné.....	4 gouttes

Titrer avec le nitrate mercurique jusqu'à virage au violet. Le nombre de millilitres nécessaires est égal au nombre de grammes de chlore par litre.

3° Chlore total :

Dans un tube à centrifuger, mesurer :

Sang total (soigneusement homogénéisé).....	1 ml
Eau distillée.....	6 ml
Tungstate de sodium à 10 %.....	1,5 ml
H ₂ SO ₄ 2/3 N.....	1,5 ml

Agiter et centrifuger.

Continuer le dosage comme dans le cas du chlore plasmatique, en opérant sur 6 ml de liquide clair (= 0,6 ml de sang total).

On obtient le résultat directement, également, en grammes de chlore par litre.

4° Détermination du rapport érythroplasmatique :

— On connaît le chlore plasmatique CIP et le chlore total CIT.

Il convient de calculer le chlore globulaire CIG.

— D'après l'hématocrite, on connaît le volume des globules % = g et celui du plasma % = p

$$CIG = \frac{(CIT \times 100) - (CIP \times p)}{g}$$

$$\text{— Rapport érythroplasmatique} = \frac{CIG}{CIP}$$

Interprétation :

1° Remarques :

Au lieu d'être exprimés en grammes par litre, les résultats peuvent se donner en milliéquivalents par litre :

$$\text{Chlore en méquiv/l} = \frac{\text{Chlore en mg/l}}{35,5}$$

(voir table de conversion en milliéquivalents par litre, p. 12).

2° Résultats normaux :

- Chlore plasmatique : 3,65 ± 0,10 g/l
ou 100 à 105 méquiv/l.
- Chlore globulaire : 1,80 ± 0,10 g/l
ou 50 à 52 méquiv/l.
- Rapport érythroplasmatique : 0,50 à 0,52.

3° Variations pathologiques :

● Chlore plasmatique :

— Diminue dans :

- grandes déperditions salines,
- coup de chaleur,
- sténose du pylore, occlusion intestinale, vomissements de toutes origines,
- diarrhées profuses,
- insuffisance surrénale chronique (maladie d'Addison) ou aigüe;
- régime sans sel avec insuffisance rénale importante.

— Augmente dans certaines acidoses plasmatiques d'origine rénale (= acidose hyperchlorémique).

● Rapport érythroplasmatique : N'apporte que peu de renseignements pratiques complémentaires. La variation de ce rapport semble souvent liée aux phénomènes d'acidose ou d'alcalose.

Acidose : élévation du rapport.

Alcalose : abaissement du rapport.

II. — DOSAGE DU CHLORE PLASMATIQUE (ULTRAMICROMÉTHODE)

Le dosage du chlore plasmatique par ultramicrométhode est basé sur le même principe que celui utilisé pour la macrométhode (Méthode de Schales et Schales).

Appareillage et réactifs. — On utilise le microtitreur Beckmann-Spinco avec agitateur incorporé. (Beckmann-71, Rue Marx-Dormoy-75-Paris, 18^e)

— HNO₃ 0,03 N :

HNO₃ (*d* = 1,38) : 0,2 ml;
Eau distillée, q. s. p. 100 ml.

— *Diphénylcarbazon* : Dissoudre 100 mg de diphénylcarbazon dans de l'alcool à 95° et diluer à 100 ml. Conserver au réfrigérateur et à l'abri de la lumière.

— *Nitrate mercurique* 0,1 N :

HNO ₃ concentré.....	1 ml	
Eau distillée.....	30 ml	
Nitrate mercurique.....	1,6 g.	Dissoudre
Eau distillée, q. s. p.....	100 ml	

— *Lab-Trol* (Biolyon, 6, rue de la Barre, 69-Lyon, 2^e).

Technique. — Utiliser les microgodets fournis avec le microtitreur Beckmann-Spinco.

	Étalon (μ l)	Échantillon à doser (μ l)
Lab-Trol (E).....	10	—
Sérum (X).....	—	10
HNO ₃ 0,03 N.....	80	80
Diphénylcarbazon.....	10	10

Au moyen de la microburette de l'appareil contenant le nitrate mercurique 0,1 N, titrer l'étalon et l'échantillon à doser jusqu'à virage au bleu-violet.

Calculs. — Soient :

T le titre de l'étalon (indiqué par le fabricant sur chaque lot de Lab-Trol, généralement voisin de 100 méquiv);

E le volume de solution de nitrate mercurique consommé par l'étalon;

X celui consommé par l'échantillon à doser.

$$\frac{X}{E} \times T = \text{méquiv de chlore par litre.}$$

Si l'on désire exprimer les résultats en grammes par litre, se reporter à la table de conversion (p. 12).

III. — DOSAGE DU CHLORE URINAIRE

Comme dans le cas du sang, il est commode d'utiliser des solutions à lecture directe.

A. — Technique au nitrate mercurique

Réactifs. — Voir ci-dessus p. 7.

Technique. — Dans un bécher, mesurer :

Urine	: 0,6 ml (ou 1 ml pour avoir le résultat en NaCl).
Eau distillée	: 9,4 ml.
Diphénylcarbazon	: 4 gouttes.
HNO ₃ environ N	: q. s. p. obtenir un pH voisin de 2.

Titrer avec le nitrate mercurique jusqu'à virage au violet; comme nous l'avons dit plus haut, le virage est moins net que dans le cas du sang.

B. — Technique argentimétrique de Mohr

Réactifs :

— Nitrate d'argent à lecture directe en NaCl sur 2 ml :

AgNO ₃ pur	5,814 g
Eau distillée, q. s. p.	1000 ml

— Chromate de potassium : Solution aqueuse saturée.

— CaCO₃ en poudre.

Technique. — Dans un bécher, mesurer :

Urine	: 1,2 ml (ou 2 ml pour avoir le résultat en NaCl).
Eau distillée	: 8,8 ml.
Chromate de potassium	: 2 gouttes.
Ca CO ₃	: une pincée.

Titrer par Ag NO₃ à lecture directe jusqu'à virage du jaune au rouge brique (s'arrêter au moment où l'on perçoit nettement un changement de la teinte jaune initiale).

Le nombre de millilitres de Ag NO_3 nécessaires pour obtenir le virage représente la concentration en grammes par litre de l'urine en chlore (ou en Na Cl si on est parti de 2 ml d'urine).

N. B. — Cette technique argentimétrique de Mohr ne donne que des résultats approchés dans le cas de l'urine : d'après Courtois, les résultats seraient en effet légèrement faussés par excès du fait qu'au pH urinaire et même en milieu neutre, les ions Ag^+ précipiteraient en plus des chlorures, les phosphates et les urates.

C. — Interprétation

Le taux de chlore urinaire varie avec l'alimentation. Pour un sujet d'alimentation normale, l'élimination moyenne en 24 heures est de 6 à 9 g de chlore (soit 10 à 15 g de NaCl), ce qui correspond à 170 à 255 méquiv.

IV. — DOSAGE DES CHLORURES DANS LE LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN

Important : Conventionnellement, dans le cas du LCR, on exprime toujours les résultats en NaCl et non en chlore.

A. — Technique au nitrate mercurique

Technique identique à l'urine : Partir de 1 ml de LCR pour avoir le résultat directement en NaCl .

B. — Technique argentimétrique de Mohr

Réactifs. — Voir ci-dessus au paragraphe « Dosage du chlore urinaire ».

Technique. — Dans un bécher, mesurer :

LCR.....	2 ml
Eau distillée.....	8 ml
Chromate de potassium.....	2 gouttes

Titrer avec le Ag NO_3 à lecture directe jusqu'à ce que l'on aperçoive nettement un changement de coloration par rapport à la coloration jaune initiale : ne pas pousser jusqu'au rouge brique si on ne veut pas dépasser le virage.

Le nombre de millilitres de Ag NO_3 nécessaires pour obtenir le virage représente directement, exprimée en grammes par litre, la concentration du LCR en NaCl .

C. — Interprétation

— *Résultat normal :* Adultes : $7,30 \pm 0,15$ g/l.
Enfants : $7 \pm 0,50$ g/l.

— *Variations pathologiques* (d'après LOISELEUR, *Techniques de laboratoire*, t. II).

- *Augmentation* ($> 7,50$ g/l) par rétention chlorurée.
Néphrites hydropigènes.
Urémie (congestion rénale au cours d'affections variées) : 7,50 à 9 g/l.
- *Diminution* ($< 7,20$ g/l).
Méningite tuberculeuse.

TABLE DE CONVERSION EN MILLIÉQUIVALENTS

D'après COLIN et POLONOWSKI, in *Explorations biologiques en pédiatrie*
(Expansion Scientifique Française, éditeur, Paris).

Sodium		Potassium		Chlore		Réserve alcaline		Protéides	
g/l	méquiv/l	mg/l	méquiv/l	g/l	méquiv/l	vol. %	méquiv/l	g/l	méquiv/l
				2,90	81				
2,50	109			95	82				
55	111			3,00	84				
60	113			05	85				
65	115			10	87				
70	117	70	1,75	15	88				
75	120	80	2	20	89				
80	122	90	2,2	25	91	10	4,5	25	6,4
85	124	100	2,5	30	93	15	7	30	7,3
90	126	110	2,7	35	94	20	9	35	8,5
95	128	120	3	40	96	25	11	40	9,7
3,00	130	130	3,2	45	97	30	13,5	45	10,9
05	133	140	3,5	50	98	35	15	50	12,1
10	135	150	3,7	55	100	40	18	55	13,3

15	137	160	4	60	102	45	20		
20	139	170	4,3	65	103	50	22,5	60	14,6
25	141	180	4,6	70	104	55	25	65	15,8
30	143	190	4,9	75	106	60	27	70	17
35	146	200	5,1	80	107	65	29	75	18,2

40	148	210	5,3	85	108	70	31,5	80	19,4
45	150	220	5,6	90	109	75	34	85	20,6
50	152	230	5,8	95	111	80	36	90	21,9
55	154	240	6,1	4,00	112	85	38	95	23,1
60	156	250	6,4	05	113	90	40,5	100	24,3
65	159	260	6,7	10	115	95	43		
70	161	270	6,9	15	116	100	45		
75	163	280	7,2	20	117	105	47		
80	165	290	7,4	25	119	110	50		
85	167	300	7,7	30	120				
90	169	310	7,9	35	122				
95	172	320	8,2	40	123				
4,00	174	330	8,4	45	125				
05	176	340	8,7	50	126				
10	178	350	8,9	55	127				
		360	9,2	60	129				
		370	9,4	65	131				

Les valeurs sont généralement comprises entre 5 et 6 g/l (60 à 70 %). Très exceptionnellement et temporairement, elles peuvent être supérieures à 6,50 g/l (5 %). Entre 6 et 6,60 g/l, le diagnostic est fait par la formule lymphocytaire qui, dans ces cas à chlore élevé, est pathognomonique.

a. *Méningites aiguës* : Valeurs habituellement comprises entre 6 et 6,80 g (durant l'évolution, exceptionnellement et temporairement quelquefois entre 6 et 6,50 g, mais avec dans ce cas une formule à polynucléaires).

b. *Méningites chroniques* : 7 à 7,20 g/l.

c. *Congestion méningée* : 6,25 g/l en moyenne.

- *Valeurs non modifiées* (7,25 à 7,35).

Myélites, encéphalites (sans participation méningée), scléroses constituées, névroses, psychoses, etc.

RÉSERVE ALCALINE, BICARBONATES

Voir au chapitre « Exploration fonctionnelle de l'équilibre acidobasique », p. 269 et surtout 283 à 292.

MASSE SANGUINE (VOLUME SANGUIN CIRCULANT)

On utilise trois groupes de méthodes qui emploient toutes des substances qui sont supposées ne pas traverser les parois vasculaires après injection intraveineuse.

— *Méthode aux colorants* : Injection de colorants macromoléculaires colloïdaux (bleu de Chicago, bleu Evans, bleu Geigy).

— *Méthode à la polyvinylpyrrolidone* (Subtosan) : Injection d'un haut polymère hydro-soluble, la polyvinylpyrrolidone.

— *Méthode aux éléments marqués* : Injection d'albumine sérique humaine marquée à l'iode 131 ou à l'iode 125, injection d'hématies marquées au chrome 51.

Nous exposerons les méthodes à la PVP et à l'albumine sérique marquée à l'iode 131. Cette dernière, très rapide et d'une exécution particulièrement facile, nécessite un appareillage coûteux du type Volémétron.

A. — Méthode à l'albumine sérique humaine marquée à l'iode 131

L'appareil Volémétron (1) est accompagné d'une notice technique détaillée. Nous nous contenterons donc de décrire schématiquement les différentes étapes de la mesure. On trouvera d'autre part dans la thèse de J. M. CHATEAU (Thèse pour le Doctorat en Médecine : *Mesure du volume sanguin circulant à l'aide de l'albumine humaine marquée à l'iode 131 en réanimation médico-chirurgicale*, Bordeaux, 1968) une étude critique détaillée de la méthode.

Réactifs et matériel de prélèvement. — Les Laboratoires AMES (1) fournissent l'albumine sérique marquée à l'iode 131 en seringues prêtes à l'emploi. Chaque dose contient 5 μ c d'iode 131 à la date indiquée sur le conditionnement et doit être conservée au réfrigérateur (+ 2, + 10°C). Une date limite d'utilisation est également indiquée. Les tubes à prélèvement héparinés sont fournis par le Laboratoire.

(1) Laboratoires AMES, 80, avenue Victor-Hugo, 75-Paris, 16^e, tél. 727-23-79.

Technique. — Toutes les mesures et tous les calculs sont faits automatiquement dans l'appareil où il suffit d'introduire dans les puits de comptage appropriés, successivement la dose d'albumine à injecter, le résidu restant dans la seringue et les échantillons de sang. Le volume sanguin est lu sur un cadran directement gradué en litres.

— Mesure de la dose contenue dans la seringue. Celle-ci est placée dans le puits de comptage correspondant. En 30 secondes l'appareil opère la mesure et l'enregistre dans une mémoire. Éventuellement des doses trop fortes (erreur de dosage) ou trop faibles (vieillessement) sont repérées et ainsi éliminées.

— Prélèvement du sang veineux que l'on introduit dans un tube jaugé à 8 ml et contenant de l'héparine sèche. Ce tube servira de témoin dans le cas où le sujet aurait une radioactivité résiduelle provenant d'une mesure précédente.

Par contre si le malade a subi, dans les semaines qui précèdent une épreuve du type γ -encéphalographie ou scintigraphie qui entraîne l'administration d'iode radioactif à des concentrations élevées, la mesure du volume sanguin circulant par cette technique n'est plus possible.

— Injection immédiate, dans la veine qui a servi au prélèvement de la totalité du contenu de la seringue.

— Prélèvement, au bout de 10 minutes, au bras opposé, de 8 ml de sang placé dans un second tube jaugé.

— Mesure du résidu d'albumine marquée pouvant rester dans la seringue. Celle-ci est introduite dans le puits de comptage comme précédemment.

— Introduction des échantillons de sang dans les puits de comptage correspondants et lecture sur le cadran de mesure de la valeur du volume sanguin circulant exprimé en litres.

Pour la mesure de la volémie chez l'enfant on utilisera la même technique, mais les prélèvements seront réduits à 2 ml et placés dans les tubes jaugés correspondants.

La mesure du volume sanguin circulant demande dans ces conditions environ 1/4 d'heure.

Causes d'erreurs. — Les principales causes d'erreurs tiennent :

— à une injection incomplète de la dose contenue dans la seringue, par perte ou passage en dehors du système vasculaire. Le volume calculé sera alors supérieur à la réalité;

— à une contamination par le produit radioactif des tubes de prélèvement. Les résultats seront alors appréciés par excès ou par défaut selon les tubes contaminés.

Expression des résultats. — Connaissant le volume sanguin et l'hématocrite, on calcule le volume plasmatique et le volume globulaire. Il est commode pour l'interprétation des résultats de les traduire en pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport aux valeurs théoriques, sachant que le volume sanguin total représente environ 1/13 du poids du corps et que l'hématocrite moyen somatique est chez l'homme de 41 % et chez la femme de 38 %.

Exemple : Sujet masculin : 65 kg.

Hématocrite lu : 58 %.

Hématocrite somatique (1), $58 \times 0,9$: 52 %.

(1) Le facteur de correction donnant l'hématocrite somatique à partir de l'hématocrite veineux est en moyenne de 0,9. Il tient compte également de l'emprisonnement d'une certaine quantité de plasma entre les éléments figurés, même après centrifugation prolongée.

	Valeur théorique	Valeur trouvée	%
Hématocrite	41 %	52 %	-
Volume sanguin	5,00 l	6,50 l	+30
- plasmatique (V. P.)	2,95 l	3,10 l	+ 5
- globulaire (V. G.)	2,05 l	3,40 l	+65

Dans cet exemple on constate que c'est l'augmentation du volume globulaire qui est pratiquement en totalité responsable de l'augmentation du volume sanguin circulant (voir p. 16).

Ces résultats peuvent être exprimés sous forme graphique.

Interprétation des résultats :

Volume sanguin augmenté

V. P.	V. G.	
↗	↗	Surcharges transfusionnelles
↗	Normal	Rétention d'eau (œdèmes) Surcharges liquidiennes au cours d'une réanimation médicale
Normal ou ↗	↗	Maladie de Vaquez Insuffisants respiratoires chroniques

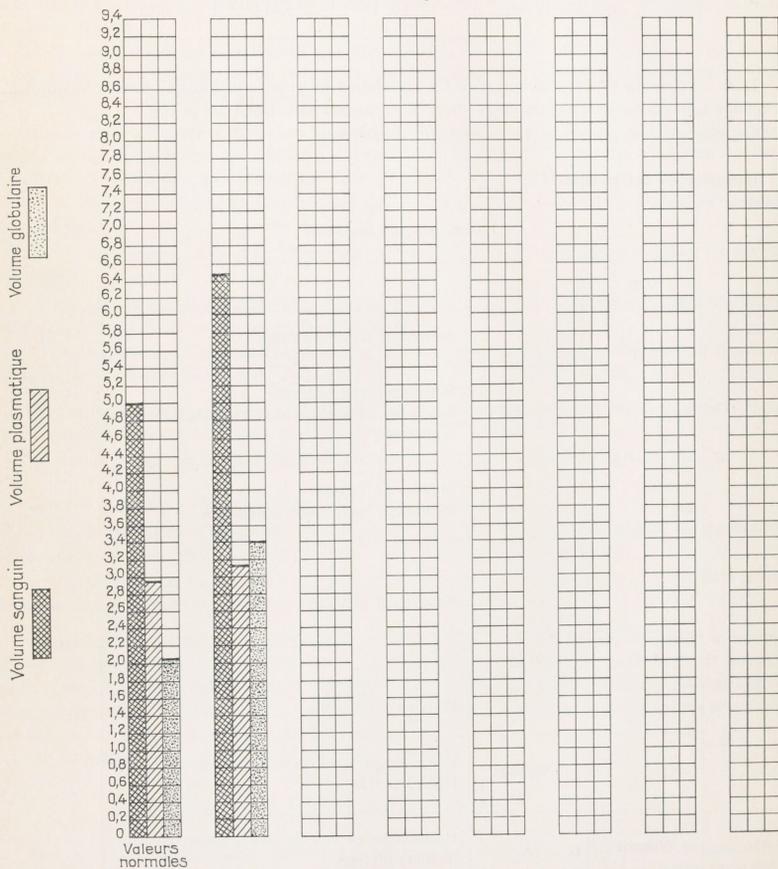
Volume sanguin diminué

V. P.	V. G.	
↘	↘	Hémorragies récentes
↘	Normal	Hémoconcentration des états de choc Déshydratation
Normal	↘	Hémorragies en voie de compensation Anémies diverses

La mesure du volume sanguin circulant est un élément important en réanimation médicale. Elle permet en effet de déceler les hémorragies occultes, d'apprécier les pertes sanguines réelles, les perturbations volémiques diverses (anuriques, états de déshydratation, états de choc, etc.) donnant ainsi la possibilité d'orienter et de préciser la thérapeutique.

VOLUME SANGUIN CIRCULANT

Nom : X... Poids : 65 kg Sexe : masculin



Dates

Hématocrite : 41 %

7.11.69

52 %

B. — Méthode à la polyvinylpyrrolidone

Référence. — P. LABADIE, *Thèse Médecine*, Bordeaux, 1950-51, n° 143, Dactyl.

Réactifs :

- NaOH 0,5 N.
- ZnSO₄ à 10 %.

— Solution de Lugol :

Iode.....	0,50 g
Iodure de potassium.....	1 g
Eau distillée, q. s. p.....	100 ml

— Solution de PVP à 0,02 % :

Faire une dilution à 1 % de PVP 25; prendre ensuite 8 ml de cette dilution et compléter à 100 ml : on obtient ainsi la solution à 0,02 %.

Prélèvement. — Injecter lentement par voie intraveineuse 5 ml exactement mesurés de PVP à 25 % (« Subtosan » à 25 %); comme le liquide est très visqueux, il y a intérêt à réaspirer un peu de sang dans la seringue et à le réinjecter pour administrer la totalité de la dose de PVP. Faire cette opération deux à trois fois.

— 10 minutes *exactement* après, prélever, au bras opposé, 10 ml de sang dans un tube à centrifuger, sur héparine.

Technique :

1° Homogénéiser le sang et en remplir un tube de Wintrobe pour la détermination de l'hématocrite, Centrifuger pendant 30 minutes à 3 000 tr/mn.

2° Centrifuger le reste du sang et introduire dans un tube à essais :

Plasma.....	1 ml
Eau distillée.....	16 ml
NaOH 0,5 N.....	1 ml
Zn SO ₄ à 10 %.....	2 ml

Agiter et filtrer.

Dans un autre tube à essais, mesurer :

Filtrat de défécation.....	10 ml
Solution de Lugol.....	1 ml

Mélanger et laisser la coloration se développer pendant 5 minutes; lire au photomètre à 490 nm cuve de 1 cm, en faisant le zéro de l'appareil avec une dilution de 1 ml de solution de Lugol dans 10 ml d'eau distillée.

Se reporter à la courbe d'étalonnage qui donne le taux de PVP en grammes par litre de plasma.

Calculs :

$$V \text{ plasmatique} = \frac{1,25 I}{n}, n \text{ étant la concentration plasmatique exprimée en g/l.}$$

$$V \text{ total} = V \text{ plasmatique} \times \frac{100}{100 - \text{hématocrite}}$$

V hématies = V total — V plasmatique.

Étalonnage. — Faire les dilutions suivantes :

Solution de PVP à 0,02 % (ml).....	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Eau distillée (ml).....	16,5	16	15,5	15	14,5	14	13,5	13
PVP (g/l).....	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80

Faire subir à ces différentes solutions la même opération de défécation et filtration qu'au plasma et continuer comme précédemment (en effet la présence d'ions en excès modifie la coloration).

Interprétation. — Il est indispensable de savoir que cette méthode ne donne des résultats valables que :

- si le prélèvement est correctement effectué;
- si le malade ne présente pas de troubles circulatoires importants.

Il est très intéressant d'associer la détermination de la masse sanguine aux mesures habituelles des concentrations par litre. Ceci est particulièrement vrai pour les électrolytes (sodium et chlore surtout) : on arrive ainsi à la notion de capital sanguin.

Résultats normaux :

Volume plasmatique	: 55 ± 5 ml	par kilogramme de poids corporel.
Volume globulaire	: 45 ± 5 ml	» » »
Volume de sang total	: 100 ± 10 ml	» » »

Variations pathologiques :

Voir P. LABADIE, *Thèse Médecine*, Bordeaux, 1950-51, N° 143, Dactyl. — P. CAZAL, *La masse sanguine et sa pathologie*, 1955, Masson éd., Paris.

- *Diminue :*
 - dans le choc : hémorragies, brûlures étendues, etc.;
 - dans tous les syndromes de déshydratation globaux ou à prédominance extra-cellulaire.
- *Augmente (hypervolémie) :*
 - dans l'insuffisance cardiaque;
 - dans la maladie de Basedow;
 - pendant la grossesse.

Rappelons que l'exploration complète des différents secteurs hydriques de l'organisme comprend, en plus de la détermination de la masse sanguine, la mesure :

— *de l'eau totale* : On utilise pour cela des substances étrangères à l'organisme, qui diffusent très rapidement dans toutes les cellules et dont la métabolisation et surtout l'élimination sont très lentes.

Exemple : Technique à l'antipyrine : Voir à ce sujet :

J. HAMBURGER et G. MATHÉ, *Le métabolisme de l'eau*, 1952, Flammarion éd., Paris. — M. et G. DELAVILLE, A. GALLI, HIOTTO et A. LICHTWITZ, *Ann. Biol. clin.*, 1952, **10**, p. 391;

— *du liquide extracellulaire* : On injecte une substance qui traverse les capillaires sanguins mais ne pénètre pas dans les cellules.

Exemple : Technique au thiocyanate. Voir à ce sujet :

J. HAMBURGER et G. MATHÉ (*loc. cit.*). — R. CACHERA et M. LAMOTTE, *Sem. Hôp. Paris*, 1950, p. 50.

MESURE DE LA PRESSION OSMOTIQUE

La détermination de la pression osmotique permet la mise en évidence des troubles de la répartition hydroélectrolytique entre les secteurs cellulaires et extracellulaires. Associée à la mesure de la pression osmotique urinaire, elle permet le calcul de la clearance osmolaire et de la clearance de l'eau libre. Cette notion facilite le diagnostic différentiel des diabètes insipides.

La mesure de la pression osmotique se fait par des voies indirectes. La méthode la plus courante consiste à mesurer la température de congélation. L'abaissement du point de congélation d'une solution par rapport au solvant est en effet proportionnelle à la pression osmotique, elle-même directement liée à la concentration en particules (molécules et ions) du corps dissous.

À côté de la pression osmotique globale, il convient de définir la pression osmotique efficace, pression des seuls éléments dont la pénétration intracellulaire est suffisamment faible et lente pour pouvoir exercer une action osmotique franche. Pratiquement il suffit de retrancher de la pression osmotique globale celle qui revient aux substances diffusibles telle que l'urée et le glucose.

On diminuera la valeur trouvée de 16,6 mOsm par gramme d'urée et de 5,5 mOsm par gramme de glucose.

Technique. — Nous ne décrivons pas la technique qui consiste à préparer un mélange réfrigérant et à mesurer la température de congélation à l'aide d'un thermomètre. Elle est peu précise et exige un volume de plasma important.

Il existe actuellement sur le marché différents types d'appareils qui donnent des résultats précis avec un volume d'échantillon réduit.

Nous utilisons l'osmomètre semi-automatique A. C. T. A. (*). Nous nous bornerons à en décrire succinctement les principaux éléments et le principe de fonctionnement. Pour les détails techniques nous renvoyons l'utilisateur à la notice qui accompagne l'appareil.

Appareillage. — L'osmomètre se compose des éléments suivants :

- un système de réfrigération avec circulation d'eau, basé sur l'effet Peltier;
- une thermistance pour la mesure de la température;
- un porte-échantillon constitué simplement par un tronçon de tube plastique coiffant la thermistance;
- un dispositif automatique provoque la cristallisation de l'échantillon après entrée en surfusion;
- un pont de mesure et un dispositif d'étalonnage par emploi de simulateurs (résistances variables);
- un enregistreur graphique de la courbe des températures. La graduation est faite en osmoles, avec trois échelles de mesure : 0-5 Osm, 0-1 Osm, 0-0,5 Osm.

La mise en route de l'appareil après un temps de mise en tension d'une demi-heure au moins nécessite un étalonnage en deux temps.

Étalonnage des simulateurs. — À l'aide de solution étalon. On utilisera de l'eau distillée pour faire le zéro et une solution à 300 mOsm/l (9,45 g de NaCl par litre d'eau distillée).

En principe l'étalonnage des simulateurs devrait être fait une fois pour toutes. Seul le changement de thermistance devrait exiger un nouvel étalonnage. En réalité nous avons constaté qu'il était bon de le vérifier de temps en temps. Nous conseillons aux utilisateurs qui emploieraient l'appareil de façon discontinue de procéder à cette vérification à chaque nouvelle mise en route de l'appareil.

(*) A. C. T. A., 15, rue de Paris, 91-Champlan, tél. 920-81-16.

Étalonnage de l'osmomètre. — Il sera effectué à l'aide des simulateurs étalonnés. Il est très rapidement réalisé.

Mesure. — Elle s'effectue sur le plasma. 0,1 ml de plasma suffit mais comme il est nécessaire de pratiquer la mesure en double, en fait il faut avoir 1 ml de sang à sa disposition. Le sang sera recueilli sur héparine. La quantité d'anticoagulant (dont l'osmolarité varie de 90 à 300 mOsm selon l'origine) doit être le plus réduit possible. Nous conseillons d'utiliser la Liquémine (osmolarité : 300 mOsm). Pour 1 ml de sang la quantité ne devra pas dépasser 0,05 ml. Dans ces conditions pour des valeurs extrêmes d'osmolarité l'erreur maximale est de 1 %. Cet anticoagulant sera mesuré au moment du prélèvement car une évaporation du solvant pourrait entraîner une erreur allant jusqu'à 6 %.

L'appareil étant en position « mesure » il suffit de placer l'échantillon de plasma dans le tube de polyéthylène coiffant la thermistance et de le recouvrir d'une goutte d'huile de vaseline (destinée à éviter l'apport de germes de cristallisation avant le moment prévu). Il faut absolument éviter la présence de bulles d'air si minimes soient-elles, au sein de l'échantillon : elles entraînent une mesure erronée. L'ensemble thermistance et échantillon sont introduits aisément dans le bloc de réfrigération. La mesure, dès lors, est automatique. La courbe des variations de température s'enregistre, la cristallisation est réalisée par l'introduction brutale d'un bâtonnet de bois au sein de l'échantillon en surfusion. La température de congélation s'inscrit sous forme d'un plateau assez bref. La mesure est terminée. L'échantillon est dégagé du bloc de réfrigération, réchauffé manuellement et éliminé. La thermistance est nettoyée avec une compresse imbibée de sérum physiologique puis d'eau distillée et essuyée avec soin. L'appareil est prêt pour une seconde mesure.

La mesure elle-même demande 2 minutes. Par contre, il faut dire que l'étalonnage complet s'avère quelquefois délicat et nécessite plusieurs mesures successives avec les solutions étalons, avant d'obtenir des résultats parfaitement reproductibles.

Interprétation des résultats. — Osmolarité globale, 300 mOsm \pm 10; osmolarité efficace, 290 mOsm \pm 10 qui correspond à un abaissement du point de congélation de 0,56°C.

La pression osmotique est un élément biologique qui, pris isolément, est difficile à interpréter car les phénomènes de déshydratation auxquels il est lié sont complexes.

Associée à d'autres mesures (et en particulier à celles de la masse sanguine et des électrolytes) c'est un élément précieux dans la surveillance de l'hydratation d'un certain nombre de malades (toxicoses, insuffisances rénales et en particulier anuries, plus généralement tout sujet soumis à une réanimation médicale prolongée). La connaissance de la pression osmotique orientera la thérapeutique vers l'administration de solutés hypo, iso ou hypertoniques ou au contraire la restriction aqueuse. L'équilibre hydrique étant souvent chez ces malades, précaire, il sera nécessaire de répéter fréquemment la mesure et c'est la raison pour laquelle l'emploi de ces nouveaux osmomètres est conseillé.

CALCIUM

Le dosage du calcium sérique, urinaire ou fécal, fait appel à l'un des trois groupes de méthodes suivantes :

— Précipitation sous forme d'oxalate et dosage manganométrique de l'oxalate de calcium. Cette méthode est longue et n'est pratiquement pas utilisée. Cependant elle est très précise et constitue la méthode de référence. C'est pourquoi nous la donnerons selon l'excellent protocole opératoire de M. Pradié.

— Précipitation sous forme de chloranilate et dosage colorimétrique après redissolution en milieu acide ou en présence d'EDTA (P. FLEURY, A. DESJOBERT et R. EBERHARD, *Ann. Biol. clin.*, 1955, 13, p. 554). N'ayant pas l'expérience de cette technique nous ne la détaillerons pas.

— Formation d'un chélate de calcium avec le sel disodique de l'acide éthylène-diamine-tétracétique (EDTA), où l'ion Ca^{++} est dissimulé à ses réactifs. Ces méthodes complexométriques sont extrêmement utilisées. En effet, elles sont très rapides et permettent d'éviter la précipitation longue et ennuyeuse. Leur précision satisfaisante est suffisante pour les besoins de la clinique.

Il importe toutefois de bien choisir l'indicateur. La murexide, utilisée dans les premières techniques doit être bannie : en effet, elle n'est pas spécifique, et le virage est délicat à saisir.

Actuellement, les 4 indicateurs qui semblent donner les meilleurs résultats sont :

— le calcon (acide 1-hydroxy-2 naphtylazo)-2 naphthol-4 sulfonique) (R. L. HILLERAND et C. N. REILLEY, *J. Lab. Clin. méd.*, 1957, **50**, p. 498);

— le plasma Corinth B (sel disodique de l'acide 1-hydroxy 4-chloro 2,2-diazobenzène 1,8-dihydroxynaphtalène 3,6-disulfonique). (C. M. SOURDAIS, *Rev. franç. Ét. clin. et biol.*, 1967, **12**, p. 391);

— la calcéine (complexe fluorescéine-acide iminodiacétique) (C. BOHUON et B. FESTY, *Path. et Biol.*, 1959, **7**, p. 131);

— l'indicateur de Patton et Reeder (acide 2-hydroxy-1-(2-hydroxy-4 sulfo-1 naphtylazo-3 naphthoïque).

Nous donnerons ces deux dernières techniques, l'une en macrométhode, l'autre en ultramicro-méthode.

L'emploi des techniques complexométriques pour le dosage du calcium urinaire et fécal impose des précautions particulières que nous discuterons.

I. — CALCÉMIE

N. B. — Dans les régions où l'eau est calcaire, les seringues utilisées pour le prélèvement, ainsi que la verrerie servant au dosage, seront convenablement lavées à l'eau acidulée par de l'acide chlorhydrique, puis très soigneusement rincées à l'eau distillée et bidistillée. La non-observation de cette précaution risque d'entraîner des erreurs importantes.

A. — Macrométhodes

1° TECHNIQUE MANGANIMÉTRIQUE

Référence. — M. PRADIÉ, *Thèse Pharmacie (Université)*, Bordeaux, 1959.

Prélèvement. — 10 ml de sang recueilli dans un tube à centrifuger, sans anticoagulant.

Réactifs :

— Acide trichloracétique à 20 %.

— Solution aqueuse d'oxalate d'ammonium à 20 g/100.

— Solution saturée d'oxalate de calcium, convenablement filtrée sur double papier filtre sans cendres et de mailles très serrées.

— H_2SO_4 au 1/2.

— $KMnO_4$ 0,01 N préparé par dilution extemporanée de $KMnO_4$ 0,1 N dont le titre sera vérifié fréquemment.

— NH_4OH au 1/2.

— Rouge de méthyle à 0,1 % dans l'alcool à 95°.

Technique. — Toute la verrerie doit avoir été nettoyée au mélange sulfochromique, puis rincée à l'eau ordinaire et à l'eau bidistillée.

Défécquer le sérum, par mélange, volume à volume avec de l'acide trichloracétique à 20 %. Filtrer ou centrifuger.

Dans un tube à centrifuger conique, mesurer :

Liquide de défécation.....	4 ml
Oxalate d'ammonium.....	1 ml. Agiter
Rouge de méthyle.....	1 goutte. Agiter

Ajouter NH_4OH au 1/2 goutte à goutte jusqu'à virage au jaune de l'indicateur (pH voisin de 6). Mélanger. Laisser au repos 1 heure, puis centrifuger 15 minutes à 4 000 tr/mn.

Éliminer le liquide surnageant (si on veut faire le dosage du magnésium, le conserver).

Sur le culot, verser 3 ml de solution saturée d'oxalate de calcium en faisant couler le long des parois et en secouant le tube de manière à mettre le précipité en suspension. Centrifuger 15 minutes à 4 000 tr/mn. Jeter le surnageant. Faire un deuxième lavage de la même manière et rejeter le surnageant.

Sur le culot lavé, verser :

H_2SO_4 au 1/2.....	1 ml
Eau bidistillée.....	2 ml

Porter au bain-marie jusqu'à dissolution du précipité (une température supérieure est nuisible, car il y a risque de déshydratation de l'acide oxalique par H_2SO_4). Titrer par $KMnO_4$ 0,01 N avec une microburette au 1/100 jusqu'à teinte rose, la coloration devant persister 1 minute, le tube étant maintenu à 50°C.

Calculs :

$$\text{Calcium en mg/l} = n \text{ ml } KMnO_4 \text{ 0,01 N} \times 0,2 \times 500 \\ = n \times 100.$$

2° MÉTHODE COMPLEXOMÉTRIQUE

Référence. — J. TRONCHET, *Ann. Biol. clin.*, 1958, 16, p. 459.

Réactifs :

— *Complexon III* M/800 :

EDTA disodique dihydraté.....	0,465 g
Eau bidistillée, q. s. p.....	1000 ml

Conserver en flacon de polyéthylène.

— *Étalon de calcium* à 100 mg/l :

$CaCO_3$ RP pour analyses.....	0,250 g
HCl 0,1 N.....	9 ml

Après dissolution de Ca CO_3 , compléter au litre avec de l'eau bidistillée.

— *Solution alcaline de cyanure de sodium :*

Hydroxyde de potassium pur.....	450 g
Cyanure de sodium pur.....	10 g
Eau distillée.....	1000 ml

— *Indicateur de Patton et Reeder :*

Réactif de Patton et Reeder.....	1 partie
Na_2SO_4 anhydre et pur.....	100 parties

Pulvériser finement le sulfate de soude anhydre et y incorporer très soigneusement au mortier le réactif de Patton et Reeder.

Prélèvement. — 7 ml de sang recueilli dans un tube à centrifuger, sans anticoagulant.

Technique. — Dans un bécher de 30 ml, introduire :

Sérum non hémolysé.....	2 ml
Eau distillée.....	10 ml
Solution alcaline de NaCN.....	1 ml
Indicateur.....	4 à 5 mg (= 1 pointe de canif)

Titrer par la solution de complexon III jusqu'à virage du rose au bleu-vert. Soit N ml.

Parallèlement, titrer un témoin obtenu en remplaçant les 2 ml de sérum par 2 ml d'eau distillée. Soit n ml.

$$\begin{aligned} \text{Calcium en mg/l} &= \frac{0,050 \times (N - n) \times 1000}{2} \\ &= (N - n) \times 25. \end{aligned}$$

N. B. — Vérifier la solution de complexon en titrant de la même façon 2 ml de la solution de calcium étalon. On doit trouver un chiffre voisin de 4,0 ml de solution de complexon.

B. — Ultramicrométhode

Nous donnerons la méthode complexométrique utilisant comme indicateur la calcéine. L'emploi du plasma Corinth B comme indicateur donnerait également de bons résultats : nous n'en avons pas une expérience personnelle.

Appareillage et réactifs. — L'appareil utilisé est le microtitreur Beckmann-Spinco déjà signalé à propos de l'ultramicrométhode de dosage du chlore.

— *Solution alcaline de cyanure de potassium :* Diluer une ampoule de titrisol Merck n° 9921 avec de l'eau bidistillée à 80 ml dans une éprouvette graduée après avoir ajouté 30 mg de cyanure de potassium.

— *Solution d'EDTA 0,01 N :*

EDTA disodique dihydraté.....	184,8 mg
Eau bidistillée, q. s. p.....	100 ml

— *Indicateur :*

Calcéine.....	25 mg
NaOH 0,25 N.....	100 ml

— *Lab-Trol* (Biolyon, 6, rue de la Barre, 69-Lyon, 2^e).**Technique.** — Introduire dans des microgodets, fournis avec le microtitreur Beckmann-Spinco

	Étalon (μ l)	Dosage (μ l)
Lab-Trol.....	20	—
Sérum.....	—	20
Solution alcaline de KCN.....	100	100
Indicateur.....	10	10

Titrer par la solution d'EDTA à l'aide du microtitreur jusqu'à coloration violette. (La disparition de la fluorescence verte de la calcéine est plus facile à voir en lumière ultraviolette.)

Calculs. — Soient :

- T la teneur du Lab-Trol en calcium (indiqué par le fabricant pour chaque lot de Lab-Trol);
- E le volume de solution d'EDTA consommé par l'étalon;
- X celui consommé par l'échantillon à doser.

$$\frac{10 \times X \times T}{E} = \text{mg de calcium par litre}$$

C. — Interprétation— **Résultats normaux :**

Adulte : 100 \pm 5 mg/l.
Nourrisson : 90 à 115 mg/l.

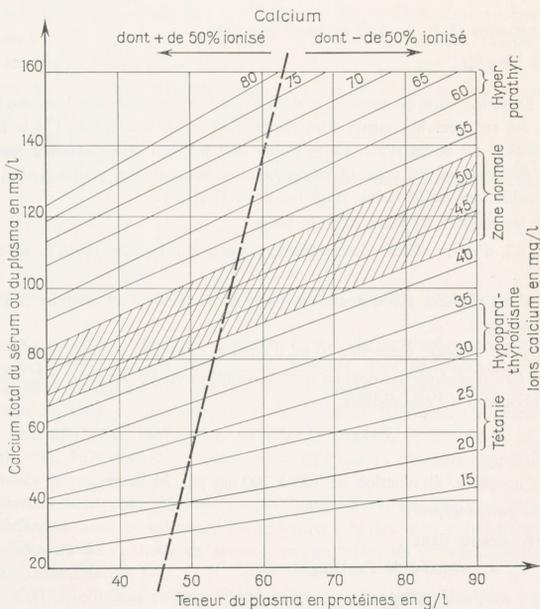
— **Variations pathologiques :**

- Augmentation :
 - Nette (toujours supérieure à 120 mg/l) dans la maladie de Recklinghausen.
 - Modérée dans :
 - le myélome multiple;
 - tout processus ostéolytique actif qu'il soit d'origine tumorale ou infectieuse (ostéomyélite);
 - hypervitaminose D.
- Diminution :
 - Hypoparathyroïdie.
 - Rachitisme grave et hypovitaminose D.
 - Néphrites.
 - États tétaniques.

D. — Calcium ionisé:

Lorsque l'on détermine la calcémie, on sait que l'on dose le calcium total. Mais il est intéressant de connaître le taux de calcium ionisé à qui revient la plus grande part de l'activité biologique du calcium. Le reste du calcium est lié aux protéines pour la partie la plus importante et à l'état de citrates pour une faible part.

Laissant de côté les méthodes physiologiques de détermination du calcium ionisé, nous ne signalerons que la méthode permettant de le déduire du taux de calcium total et du taux de protéines totales. Pour cela, on utilise le nomogramme de Mac Lean et Hastings (*Amer. J. Med. Soc.*, 1935, **189**, p. 601). Dans ce nomogramme, les concentrations en calcium total sont portées en ordonnées, et en abscisse les teneurs en protéines. Le point de coordonnées a_1 et a_1 est porté par une droite correspondant à une valeur déterminée du calcium ionisé.



Teneur du plasma en protéines en grammes par litre.
Nomogramme de Mac Lean et Hastings.

II. — CALCIURIE

La technique manganométrique est également utilisable : nous renvoyons au protocole opératoire décrit ci-dessus.

En ce qui concerne l'emploi des techniques complexométriques directes, on se heurte à quelques difficultés. En effet, le virage est très peu net et s'étale sur plusieurs millilitres, ce qui rend très difficile l'appréciation du point équivalent. On a invoqué, pour expliquer ce phénomène, l'action gênante des ions PO_4^{---} , et on a proposé de les éliminer par passage sur une résine échangeuse d'ions.

De fait, après cette opération, on constate que les virages sont excellents. Malgré cela, il semble que les phosphates ne soient pas les seules substances à incriminer; d'autres composés également retenus par la résine, qui semblent être de nature mucopolysaccharidique, doivent jouer un rôle dans ce phénomène.

Nous donnerons donc la technique de purification de l'urine, renvoyant ensuite au paragraphe « Calcémie » (Macrométhodes) pour le dosage complexométrique lui-même.

Réactifs :

- Résine Amberlite (I. R. A. 401) grosseur moyenne.
- NaOH à 10 g %.

Technique. — La résine, mise en suspension dans l'eau distillée est versée dans une burette de 10 ml dont l'extrémité a été au préalable garnie d'un tampon de coton hydrophile. On la tasse légèrement, en évitant la formation de bulles d'air. Cette résine *doit toujours être conservée sous l'eau distillée*, pour empêcher sa dessiccation qui pourrait entraîner un éclatement des grains et une modification de la structure physicochimique de la résine, d'où baisse de l'activité.

Faire affleurer les niveaux de l'eau et de la résine.

Puis verser 1 ml d'urine. Faire descendre le niveau du liquide jusqu'à affleurement de la résine.

Ajouter 2 ml d'eau distillée. Faire descendre jusqu'à affleurement et attendre 2 à 3 minutes pour que l'échange se fasse bien.

Puis éluer par l'eau distillée. Recueillir 10 ml d'éluat et continuer comme pour le sang.

La résine peut être régénérée par contact avec la solution de NaOH à 10 g %, pendant une nuit, suivi d'un lavage abondant à l'eau distillée.

Interprétation:

- Résultats normaux: élimination de 100 à 200 mg par 24 heures.
- Variations pathologiques:
 - Augmente dans :
 - maladie de Recklinghausen;
 - ostéoporoses;
 - maladie postopératoire, surtout après fracture;
 - hypercalciurie idiopathique;
 - hypervitaminose D.
 - Diminue dans :
 - insuffisance parathyroïdienne;
 - ostéomalacie.

III. — CALCIUM FÉCAL

Le dosage doit être précédé d'une destruction de la matière organique.

Technique. — On calcine donc un poids déterminé de selles par séjour au four à moufle à 400°C. Après refroidissement, les cendres sont dissoutes dans 10 ml de HCl au 1/10. La solution ainsi obtenue est versée dans un ballon jaugé et diluée à un volume connu, avec de l'eau distillée.

Le dosage se fera (soit par manganimétrie, soit par complexométrie) sur une partie aliquote de cette solution.

Interprétation. — Le dosage du calcium fécal ne présente un réel intérêt que si on fait des bilans calciques, c'est-à-dire si, pour un régime à teneur en calcium fixe et bien déterminée, on établit la balance entre les entrées et les sorties. Dans ces conditions, on doit simultanément déterminer la calciurie.

— *Normalement*: Le bilan calcique est nul chez l'adulte (calcium excrété = calcium ingéré) et l'élimination fécale du calcium est comprise entre 500 et 700 mg par 24 heures.

Chez l'enfant et l'adolescent, le bilan calcique est positif; de même chez la femme enceinte.

Il est négatif chez la femme pendant l'allaitement.

— *Variations pathologiques*:

Bilan négatif dans la maladie de Recklinghausen, les ostéoporoses, l'ostéomalacie, la maladie de Paget, etc.

MAGNÉSIUM

De nombreuses méthodes ont été proposées pour le dosage du magnésium dans les milieux biologiques.

La méthode de choix, lorsqu'on possède l'appareillage, est la *spectrophotométrie d'absorption atomique* qui concilie sensibilité et spécificité. L'équipement nécessaire, d'un prix relativement élevé, n'étant pas encore disponible dans la majorité des laboratoires de biologie clinique, nous ne décrivons pas cette méthode; le lecteur intéressé pourra consulter sur ce sujet les références suivantes: F. ROUSSELET et M. L. GIRARD, *Ann. Biol. clin.*, 1967, **25**, p. 987; M. L. GIRARD, F. ROUSSELET et J. DESCUBE, *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, 1966, **262**, série D, p. 2380. Les mêmes raisons d'appareillage nous feront également écarter les méthodes fluorométriques.

Nous éliminerons aussi pour d'autres raisons (longueur, virage imprécis, sensibilité insuffisante ou risque d'interférence avec le calcium), les techniques basées sur la précipitation du phosphate ammoniacomagnésien ou de l'oxinate de magnésium, les méthodes complexométriques et le procédé colorimétrique au jaune thiazol.

Finalement, c'est la technique colorimétrique de Bohuon que nous choisirons: sans exiger d'appareillage coûteux, elle est satisfaisante quant à sa rapidité et à sa spécificité.

Références. — C. BOHUON, *Clin. Chim. Acta*, 1962, **7**, p. 811. — J. P. MAURAT et F. ROUSSELET, *Problèmes actuels de Biochimie appliquée*, 2^e série, 1968, Masson édit., Paris.

Principe. — Le réactif de Mann et Yoe, 1-azo-hydroxy-3-(2.4-diméthylcarboxyanilido)-naphtalène-1'-(2-hydroxybenzène-4-sulfonate de sodium) normalement coloré en bleu vers pH 9-10, prend une coloration rose en milieu hydroalcoolique en présence de traces de magnésium.

Prélèvement. — 5 ml de sang dans un tube à centrifuger sans anticoagulant (la verrerie doit avoir été très soigneusement lavée, rincée à l'eau distillée et séchée avant usage).

Réactifs :

— *Réactif de Mann et Yoe*: Solution à 0,1 % dans l'alcool absolu. Le réactif peut être fourni par Schweizerhall. 68-Saint-Louis.

— *Borate de sodium 0,08 M* :

Na₂ B₄O₇, 10 H₂O..... 3,05 g
Eau distillée, q. s. p..... 100 ml

— *Alcool à 95°*.

— *Solution-mère de magnésium à 1 mg/ml* :

Mg SO₄, 7 H₂O..... 10,123 g
Eau distillée, q. s. p..... 1000 ml

Ajouter quelques gouttes de toluène pour améliorer la conservation.

— *Solution-fille de magnésium à 1 µg/ml* : Diluer extemporanément la solution-mère précédente au 1/1000 avec de l'eau distillée.

Technique. — Dans quatre tubes à essai, selon les indications du tableau suivant, introduire :

	Étalon E ₁ (ml)	Étalon E ₂ (ml)	Dosage (ml)	Témoin (ml)
Eau bidistillée.....	2	1	2	2,5
Étalon de magnésium à 1 µg/ml.....	0,5	1,5	—	—
Sérum dilué au 1/10.....	—	—	0,5	—
Réactif de Mann et Yoe.....	1	1	1	1
Borate de sodium, 0,08 M.....	0,5	0,5	0,5	0,5
Alcool à 95°.....	2	2	2	2

Bien mélanger. Laisser reposer 20 minutes et lire à 505 nm contre le témoin. La coloration est stable pendant 24 heures.

Calcul :

$$10 + 20 \frac{(\text{DO dosage}) - (\text{DO } E_1)}{(\text{DO } E_2) - (\text{DO } E_1)} = \text{mg Mg/l de sérum.}$$

Dans le cas des sérums fortement colorés (sérums ictériques), il est nécessaire de déprotéiniser au préalable :

Sérum ou sang..... 1 ml
H₂ SO₄ N/12..... 8 ml
Tungstate de sodium à 10 %..... 1 ml

Agiter et centrifuger.

Interprétation des résultats :*Taux normaux :*

- Plasma (ou sérum) : 18 à 25 mg/l.
- Hématies : 58 à 65 mg/l. Le dosage du magnésium dans les hématies a été proposé pour avoir une idée du magnésium intracellulaire. En réalité, il semble qu'il ne le reflète que de manière imparfaite.

Variations pathologiques :

- *Le magnésium sérique diminue dans :*
 - coma diabétique;
 - tétanies, rachitisme et spasmophilie infantiles;
 - myxoedème;
 - néphroses lipoidiques;
 - certaines toxémies gravidiques, *delirium tremens*, confusion mentale.
- *Le magnésium sérique augmente dans*
 - les insuffisances rénales, néphrites chroniques, anuries;
 - les hyperthyroïdies.
- *Le magnésium globulaire diminue dans*
 - certaines spasmophilies;
 - l'hyperthyroïdie primitive;
 - les grandes insuffisances hépatiques;
 - les troubles digestifs graves;
 - le *delirium tremens*;
 - les traitements prolongés par les diurétiques.
- *Le magnésium globulaire augmente dans les insuffisances rénales.*

PHOSPHORE MINÉRAL

Nous choisirons l'excellente méthode de Briggs, applicable à la fois au sang et à l'urine, avec en outre une version en ultramicrométhode utilisable sans déprotéinisation préalable.

Références. — J. BRIGGS, *J. Biol. Chem.*, 1924, **59**, p. 255. — M. PRADIÉ, *Thèse Doctorat Pharmacie* (Université), Bordeaux, 1959.

Principe. — Quand on ajoute à une solution d'ions PO_4^{---} , des ions molybdiques et molybdeux, il se développe une coloration bleue extrêmement intense due à la formation d'un complexe phosphomolybdeux-molybdique.

Les ions molybdeux sont créés dans le milieu par réduction partielle d'un réactif molybdique à l'aide d'hydroquinone et de sulfite de sodium.

A. — Macrométhode**Réactifs :**

- Acide trichloracétique à 20 % dans l'eau distillée.
- Solution-mère de phosphore à 1 g/l.

KH_2PO_4 RP	4,394 g
Eau distillée, q. s. p.	1000 ml

— *Solution-fille de phosphore* à 20 mg/l : Préparée par dilution au 1/50 de la solution précédente.

— *Réactif molybdique* :

Dans un bécher de 500 ml, dissoudre :

Molybdate d'ammonium.....	25 g
Eau distillée.....	125 ml

Puis ajouter le mélange refroidi de :

H ₂ SO ₄ pur (<i>d</i> = 1,84).....	75 ml
Eau distillée.....	125 ml

Ce réactif est de bonne conservation.

— *Hydroquinone* à 1 % : Solution aqueuse à préparer au moment de l'emploi. Pour ralentir l'oxydation, on peut ajouter une à deux gouttes de H₂SO₄ pur et garder la solution à la glacière; cependant, malgré ces précautions, elle ne se conserve pas.

— *Na₂SO₃* à 20 % : Solution aqueuse se conservant quelques jours en flacons bien bouchés. Doit cependant être renouvelé très fréquemment.

Prélèvement :

— *Sang* : 6 à 7 ml de sang recueilli dans un tube à centrifuger soit sans anticoagulant, soit sur héparine. Le dosage doit être effectué dans les 2 heures qui suivent le prélèvement (pour éviter l'hydrolyse des esters phosphoriques du sang).

— *Urines* : Urines de 24 heures.

Technique :

A. *Sang* :

Dans un tube à centrifuger, mesurer :

Sérum ou plasma.....	2 ml
Acide trichloracétique à 20 %.....	2 ml

Mélanger. Laisser au repos pendant 10 minutes et centrifuger. Éviter d'interrompre le dosage à cette phase au cas où le milieu acide provoquerait l'hydrolyse des esters phosphoriques.

Dans un tube à essais, introduire dans l'ordre :

Liquide clair surnageant.....	2 ml
Eau distillée.....	5 ml
Réactif molybdique.....	1 ml
Hydroquinone à 1 %.....	1 ml
Na ₂ SO ₃ à 20 %.....	1 ml

Mélanger. Lire après 20 minutes à 700 nm contre un blanc obtenu en remplaçant les 2 ml de filtrat trichloracétique par 1 ml d'eau distillée + 1 ml d'acide trichloracétique à 20 %. Se reporter à la courbe d'étalonnage.

B. *Urines* :

— Diluer l'urine au 1/10 avec de l'eau distillée.

— Puis technique identique au sang en remplaçant les 2 ml de défécac trichloracétique par 1 ml d'urine diluée au 1/10 + 1 ml d'acide trichloracétique à 20 %.

C. *Étalonnage* :

Solution fille de phosphore à 20 mg $\frac{0}{100}$ (ml) ..	1	2	3	4	5	6	0
Eau distillée (ml)	5	4	3	2	1	0	6
Acide trichloracétique à 20 % (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Phosphore (mg $\frac{0}{100}$)	20	40	60	80	100	120	0

Ajouter à tous les tubes : 1 ml de réactif molybdique,
1 ml d'hydroquinone à 1 %,
1 ml de Na_2SO_3 à 20 %.

Lire dans les mêmes conditions que le dosage.

B. — *Ultramicrométhode*

Réactifs. — Nous utilisons le test Schweizerhall (Biochimie Rébert, 1, rue Saint-Antoine, 68-Guebwiller).

— *Solution de métabisulfite-borax* : Dissoudre le contenu du flacon dans 80 ml d'eau distillée. (Conservation : 3 à 4 mois au réfrigérateur.)

— *Solution de sulfite-carbonate* : Dissoudre le contenu d'un flacon dans 100 ml d'eau distillée. (Conservation : 3 à 4 mois au réfrigérateur.)

— *Solution d'hydroquinone-ascorbate sodique* : Dissoudre le contenu d'une capsule dans 10 ml d'eau distillée. (Conservation : 2 à 3 jours au réfrigérateur, mais il est préférable de renouveler cette solution chaque jour.)

— *Solution de molybdate d'ammonium* : Dissoudre le contenu d'une capsule dans 10 ml de $\text{H}_2\text{SO}_4\text{N}$ (Conservation : une semaine à + 4°C en flacon brun.)

— *Lab-Trol* (Biolyon, 6, rue de la Barre, 69-Lyon, 2^e).

Technique :

	Dosage	Blanc	Étalon
Métabisulfite-borax (μl)	200	200	200
Sérum (μl)	20	—	—
Eau distillée (μl)	—	20	—
Lab-Trol (μl)	—	—	20
Molybdate d'ammonium (μl)	50	50	50
Hydroquinone-ascorbate sodique (μl)	50	50	50
Laisser reposer 15 minutes			
Sulfite-carbonate (ml)	0,5	0,5	0,5
Attendre 10 minutes et lire à 578 nm			

Calcul. — Soit T le titre du Lab-Trol en milligrammes par litre de phosphore.

$$\frac{T \times \text{DO dosage}}{\text{DO étalon}} = \text{mg/l de phosphore.}$$

C. — Interprétation

1° *Sang* :

— *Résultats normaux* :

Adultes	: 30 ± 5 mg/l.	} exprimés en phosphore.
Enfants	: moins de 1 an : 55 mg/l	
	: 1 à 10 ans : 50 mg/l	
	: 10 à 18 ans : 45 mg/l	

— *Variations pathologiques* :

Diminue :

- dans l'hyperparathyroïdie (ostéite fibrokystique de Recklinghausen). Cette hypophosphorémie consécutive à l'abaissement du seuil rénal d'élimination ne se manifeste qu'aux premiers stades de la maladie avant toute complication néphritique capable de rétablir des valeurs normales par rétention phosphorée;

- dans le rachitisme et l'ostéomalacie (de façon constante).

Augmente :

- dans les insuffisances rénales (y rattacher les hypervitaminoses D₂);
- dans les hypoparathyroïdies et tubulopathies rénales (syndrome de Toni-Debré-Fanconi).

2° *Urine* :

— *Résultats normaux* :

20 à 40 mg/kg par 24 heures exprimé en P₂ O₅.

Variations avec l'alimentation. Augmente avec les exercices musculaires.

— *Variations pathologiques* :

Diminue : dans maladies infectieuses, pneumonie, tuberculose.

Augmente : dans leucémie, diabète phosphatique, rhumatisme chronique grave.

FER SÉRIQUE

COEFFICIENT DE SATURATION DE LA SIDÉROPHILINE

I. — DOSAGE DU FER SÉRIQUE

Les techniques les plus employées pour le dosage du fer sérique utilisent la coloration rouge que donne le fer ferreux avec l'ortho ou avec la bathophénantroline. Si la méthode à l'orthophénantroline reste excellente, on a tendance à lui substituer actuellement la technique à la bathophénanthroline qui possède une meilleure sensibilité. C'est donc elle que nous décrivons seulement dans la présente édition. Les techniques de spectrophotométrie par absorption atomique, qui sont les méthodes d'avenir pour ce genre de dosage, n'ont pas encore pénétrées de manière courante dans les laboratoires de biochimie clinique à cause du prix élevé de l'appareillage.

Référence. — R. J. HENRY, C. H. SOBEL et N. CHIAMORI. *Clin. Chim. Acta*, 1958, 3, p. 523.

Principe. — Le fer sérique, normalement lié à une β -globuline, la sidérophiline, est ionisé par l'acide trichloracétique à chaud, qui précipite en même temps les protéines; puis le fer est réduit à l'état ferreux par le sulfate d'hydrazine, et dosé colorimétriquement après réaction avec la bathophénantroline.

Réactifs :

Très important : Tous les réactifs doivent avoir été préparés avec de l'eau bidistillée et des produits très purs.

De même, toute la verrerie utilisée (flacons, tubes, entonnoirs, pipettes, etc.) doit avoir séjourné pendant 12 heures au moins dans un bain d'acide chlorhydrique concentré. Elle est ensuite lavée à l'eau distillée, puis bidistillée et séchée à l'abri des poussières et de toute contamination par le fer. Cette verrerie sera exclusivement réservée au dosage du fer sérique.

- Acide trichloracétique à 20 % et à 5 %.
- Solution aqueuse à 50 % d'acétate d'ammonium cristallisé.
- Solution aqueuse saturée de sulfate d'hydrazine.
- Acide chlorosulfonique.
- Hydroxyde de sodium à 10 %.

— *Solution de bathophénantroline* à 50 mg % : Dans un tube à centrifuger conique, introduire 100 mg de bathophénantroline (Laboratoires du Bois de Boulogne, 33, rue Voltaire, 92-Puteaux), puis 0,5 ml d'acide chlorosulfonique prélevé avec précautions (caustique et irritant). Porter à l'ébullition sur la veilleuse d'un bec Bunsen et la maintenir pendant au moins 30 secondes. Refroidir. Ajouter alors 10 ml d'eau bidistillée en prenant grand soin d'éviter les projections : pour cette opération délicate, tenir le tube avec une pince, introduire l'eau très doucement avec une pipette à pointe fine, goutte à goutte le long des parois et en agitant après chaque affusion. Lorsqu'on a ainsi introduit les 3 ou 4 premiers millilitres, l'addition de l'eau bidistillée peut être accélérée.

Le mélange est chauffé au bain-marie bouillant jusqu'à dissolution. Si celle-ci est difficile, on ajoute une trace d'acide chlorosulfonique et on porte à nouveau au bain-marie. La solution est ensuite versée dans un bécher de 250 ml contenant déjà 150 ml d'eau bidistillée. On ajuste à pH 4 avec de la soude à 10 % sous contrôle potentiométrique. Enfin, avec de l'eau bidistillée, on complète à 200 ml dans un ballon jaugé.

Ce réactif est de bonne conservation au réfrigérateur à + 4°C.

— *Solution-mère de fer* à 500 μ g/ml :

Sel de Mohr R. P. ($\text{FeSO}_4, (\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4, 6\text{H}_2 \text{O}$) (non effleuré)	0,875 g
HCl 6 N	0,5 ml
Eau bidistillée, q. s. p.	250 ml

Conservé au réfrigérateur.

— *Solution-fille de fer* à 4 μ g/ml :

Solution-mère de fer à 500 μ g/ml	2 ml
Eau bidistillée, q. s. p.	250 ml
A préparer extemporanément.	

Prélèvement. — 10 à 15 ml de sang prélevé chez le sujet à jeun, au moyen d'une aiguille de *nickel* : recueillir le sang sans l'intermédiaire d'une seringue, directement au sortir de l'aiguille, dans un tube à centrifuger (lavé à HCl comme il a été indiqué ci-dessus) et sans anticoagulant.

Technique. — Centrifuger moins d'une heure après le prélèvement (un contact prolongé sérum-globules entraîne un enrichissement du sérum en fer). Séparer soigneusement le sérum.

Dans un tube à centrifuger, introduire :

Sérum.....	3 ml
Eau bidistillée.....	5,75 ml
Acide trichloracétique à 20 %.....	2,25 ml

Agiter. Porter au bain-marie bouillant pendant 2 à 3 minutes en veillant à éviter tout débordement des protéines.

Refroidir. Centrifuger à 4 000 tr/mn pendant 5 minutes.

	Témoin réactifs (ml)	Dosage (ml)	Étalons (ml)			
			100 $\mu\text{g}\%$	200 $\mu\text{g}\%$	300 $\mu\text{g}\%$	400 $\mu\text{g}\%$
Surnageant de défécation du sérum.....	—	3	—	—	—	—
Solution-fille de fer à 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	—	—	0,25	0,50	0,75	1
Eau bidistillée.....	3	—	2,75	2,50	2,25	2
Acide trichloracétique à 20 %.....	1	—	1	1	1	1
» trichloracétique à 5 %.....	—	1	—	—	—	—
Acétate d'ammonium à 50 %.....	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Solution saturée de sulfate d'hydrazine.....	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Réactif à la bathophénanthroline.....	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40

Mélanger. Laisser au repos pendant 20 minutes et lire à 535 nm en cuve de 2 cm. Construire la courbe d'étalonnage et s'y reporter pour en déduire le résultat du dosage.

Interprétation.

— *Résultats normaux* (d'après M. F. JAYLE et G. SCHAPIRA, *Précis de Chimie physiologique et sémiologique*, p. 122, 1956, Masson éd., Paris).

Homme : $130 \pm 60 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$.

Femme : $120 \pm 60 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$.

Femme enceinte au moment de l'accouchement : $80 \pm 30 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Enfant : — à la naissance : environ $170 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$.

— vers 6 mois : environ $60 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$.

— à deux ans : $95 \pm 30 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$.

— *Variations pathologiques* :

- Diminue dans les anémies ferriprives et les états fébriles.
- Augmente dans :
 - les anémies hémolytiques;
 - l'anémie de Biermer;
 - les ictères par hépatite (normal dans les ictères par rétention);
 - les cirrhoses bronzées;
 - l'hémochromatose;
 - la poliomyélite avec atteinte musculaire (à la 3^e ou 4^e semaine).

PARIS — IMPRIMERIE GAUTHIER-VILLARS

55, QUAI DES GRANDS-AUGUSTINS

180631-70

Dépôt légal, Imprimeur, 1970, n° 1926

Dépôt légal, Éditeur, 1970, n° 1750

ACHEVÉ D'IMPRIMER LE 20 JUILLET 1970

Imprimé en France

Participant d'une démarche de transmission de fictions ou de savoirs rendus difficiles d'accès par le temps, cette édition numérique redonne vie à une œuvre existant jusqu'alors uniquement sur un support imprimé, conformément à la loi n° 2012-287 du 1^{er} mars 2012 relative à l'exploitation des Livres Indisponibles du XX^e siècle.

Cette édition numérique a été réalisée à partir d'un support physique parfois ancien conservé au sein des collections de la Bibliothèque nationale de France, notamment au titre du dépôt légal. Elle peut donc reproduire, au-delà du texte lui-même, des éléments propres à l'exemplaire qui a servi à la numérisation.

Cette édition numérique a été fabriquée par la société FeniXX au format PDF.

La couverture reproduit celle du livre original conservé au sein des collections de la Bibliothèque nationale de France, notamment au titre du dépôt légal.

*

La société FeniXX diffuse cette édition numérique en accord avec l'éditeur du livre original, qui dispose d'une licence exclusive confiée par la Sofia – Société Française des Intérêts des Auteurs de l'Écrit – dans le cadre de la loi n° 2012-287 du 1^{er} mars 2012.

Avec le soutien du

