

Département de Pharmacie

PROJET DE FIN D'ETUDES/THESE D'EXERCICE

N° D'ORDRE :

Présenté (e) et soutenu (e) publiquement
Le : 18 Juin 2018

En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

Thème

Interférences de l'hémolyse en biochimie

Réalisé (e) par :

AOUDIA AMEL

BECHIRI MELISSA

LAHLOUH LYSA

Composition du Jury :

DAHMANI	Dalila	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Présidente de jury
AMIRAT	Kahina	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Promotrice
BOUAKIZ	Sarah	Résidente	Faculté de Médecine	UMMTO	Co-promotrice
BELKAID	Nawal	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Examinatrice

Remerciements



Nos remerciements s'adressent en premier lieu au bon Dieu tout puissant, de nous avoir donné la force et la volonté pour réaliser et accomplir à terme ce travail.

*Nos profonds remerciements s'adressent en deuxième lieu à notre chère promotrice **Dr AMIRAT Kahina** maitre assistante en Biologie clinique CHU TO d'avoir accepté de nous encadrer, pour sa disponibilité, ses conseils, son dévouement et surtout sa patience tout au long de ce travail.*

*Nous remercions également notre chère copromotrice **Dr BOUAKIZ Sarah** résidente en biochimie CHU TO pour ses encouragements, ses conseils et sa bonne humeur tout le long de notre travail.*

*Nous adressons également nos remerciements à notre présidente du jury **Dr DAHMANI Dalila** Maitre assistante en biochimie et chef de service de biochimie CHUTO. Nous avons eu la chance de travailler dans votre laboratoire et d'apprécier votre qualité de travail et vos valeurs humaines.*

*Au **Dr BELKAID Nawal** maitre assistante en biochimie CHU TO, nous vous remercions vivement pour l'aide compétente que vous nous avez apporté dans notre pratique.*

*Nos remerciements au **Dr BOURSSOUTI Mourad** résident en analytique pour son aide précieuse notamment pour l'exploitation statistique des données, nous vous prions de trouver ici l'expression de notre respect et notre profonde reconnaissance.*

*Nous tenons à remercier **Dr SMADEHI, Dr BELKADI** ainsi que l'équipe du laboratoire de biochimie pour votre aide et gentillesse.*

*Nous remercions également le **Dr ARSLANE Manel**, le **Dr DJEDDOU Meriem** et le **Dr KEMACHE Amine** pour leurs précieux conseils et leur gentillesse.*

*Nos remerciements vont également au **Dr KESSAL Fatma** et au **Dr MAMOU Marzouk** pour nous avoir accompagnés tout au long de notre cursus universitaire.*

Enfin, nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet de fin d'études.

Dédicace

A ma très chère Mère

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu n'as jamais cessé de me soutenir et de m'encourager durant tout mon cursus. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A mon très cher Père

Aucune dédicace ne saurait exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as toujours su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

A mes très chers frères Laziz et Karim

Je vous dédie ce travail en témoignage de l'amour et de la gratitude pour l'épaule inconditionnelle que vous représentez pour moi. Pour votre gentillesse et votre serviabilité. Je ne saurais exprimer mes sentiments fraternels et chers que j'éprouve pour vous. Que Dieu vous protège et consolide les liens sacrés qui nous unissent, et vous réserve le meilleur avenir et beaucoup de bonheur.

A Soulef

Je te dédie ce mémoire pour ton amour et ton soutien dans les moments difficiles. Toi qui a toujours occupé une place de sœur, que Dieu vous garde et vous protège.

A tout les membres de ma famille

Mes tantes et leurs maris, mes cousins et cousines, j'ai beaucoup de chance de vous avoir à mes côtés, et je vous souhaite beaucoup de bonheur et de réussite. Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection la plus sincère.

A mes binômes Amel et Melissa

Je vous dédie ce travail quand a réalisé ensemble avec tout les moments agréables que nous avons partagé malgré les difficultés que nous avons rencontré et surmontées ensemble.

A mes amies

Je dédie aussi ce mémoire à tous mes amis (Yasmin ; Meriem ; Lamia ; Celia ; Karima) et à toute personne qui m'ont encouragée ou aidée toute au long de mes études

LISA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes parents. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler .que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A ceux que j'aime beaucoup et qui m'ont soutenu tout au long de ce projet mes frères Zinedine et Abdelhak.

A ma belle sœur Leila et sa future princesse Alicia

*A mes grands-mères, mes oncles, mes tantes, et toute la famille **AOUCHA**.*

A mes grands parents décédés et hadj Amarouche et Saïd.

A mes binômes et copines depuis toujours Melissa et Lysa ainsi qu'à notre chère petite sœur Lamia et à tout ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

Je vous dis à tous Merci.

Amel

Dédicaces



*Avec un énorme plaisir, un Cœur ouvert et une immense joie je dédis ce modeste travail
À mes très chers, respectueux et magnifiques parents qui ont garni mes chemins avec force et
lumière, et qui ont sacrifié leur vie pour mon instruction, mon bien et ma réussite, puisse le
bon dieu vous donner santé, bonheur et longue vie .*

À ma chère sœur Lamia et mon cher frère. Yamine

À mes très chers grands parents.

*À mon oncle et mes tantes qui m'on soutenus tout au long de ma vie surtout ma très chère
tante Kenza*

À mes cousins et mes cousines.

À mes très chères copines Amel et lysa.

Et à toutes personnes qui ont participé de près ou de loin à ma réussite et mon bien.

Melissa

Table des matières

Liste des abréviations	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures.....	viii
INTRODUCTION	1
OBJECTIFS	2
PARTIE THEORIQUE	3
Chapitre I : Généralités sur le globule rouge	3
1. Définition	3
2. Biosynthèse du globule rouge.....	3
3. Structure et constituants du GR.....	4
3.1. Structure	4
3.2. La membrane du globule rouge	5
3.2.1. Constituants de la membrane érythrocytaire	5
3.2.2. Rôle de la membrane érythrocytaire	8
3.3. Le contenu intra-érythrocytaire	8
3.3.1. L'hémoglobine	8
3.3.2. Autres constituants du globule rouge.....	9
4. Physiopathologie de l'hémolyse	10
4.1. Définition de l'hémolyse	10
4.2. Différents types d'hémolyse	10
4.2.1. Hémolyse physiologique	10
4.2.2. Hémolyse pathologique	12
Chapitre II : Interférences en biochimie	14
1. Définition de l'interférence	14
2. Mécanismes d'interférences.....	14
2.1. Effet pré-analytique	14
2.2. Interférences de détection et interférences spectrales (interférences physiques)	14
2.3. Interférences chimiques	15

Table des matières

3.	Les principales interférences en biochimie	15
3.1.	Hémolyse.....	15
3.1.1.	Définition.....	15
3.1.2.	Différents types d'hémolyses	16
3.1.3.	Principales causes de l'hémolyse in-vitro.....	16
3.1.4.	Interférence de l'hémolyse avec les analyses biologiques.....	20
3.1.4.1.	Interférences d'apport	20
3.1.4.2.	Interférences chimiques.....	20
3.1.4.3.	Interférences physiques	20
3.2.	Interférence due à la bilirubine.....	21
3.2.1.	Définition de l'ictère (jaunisse).....	21
3.2.2.	Origine de l'échantillon ictérique	21
3.2.3.	Interférence d'un échantillon ictérique avec les analyses de laboratoire	22
3.2.3.1.	Interférence spectrale.....	22
3.2.3.2.	Interférence chimique.....	23
3.3.	La lipémie.....	23
3.3.1.	Définition.....	23
3.3.2.	Origine d'un échantillon lipémique.....	24
3.3.3.	Interférence de la lipémie avec les analyses	25
3.3.3.1.	Interférence physique	25
3.3.3.2.	Interférence optique	25
3.3.3.3.	Interférence immunologique.....	25
4.	Autres interférences.....	27
4.1.	Influence de l'anticoagulant.....	27
4.2.	Influence des médicaments	27
4.3.	Influence de l'alimentation	27
5.	Les normes SFBC	28
6.	Quelques données de la littérature	29

Table des matières

PARTIE PRATIQUE	31
CHAPITRE I : Matériel et Méthodes	31
1. Description de l'étude.....	31
2. Rappel des objectifs	31
3. Population d'étude.....	31
4. Matériel	31
4.1. Matériel biologique	31
4.1.1. Critères de recueils	31
4.1.2. Critères d'inclusion et d'exclusion	32
4.1.2.1. Critères d'inclusion.....	32
4.1.2.2. Critères d'exclusion.....	32
4.2. Matériel non biologique	33
5. Méthodes.....	33
5.1. Paramètres étudiés.....	33
5.2. Intérêt clinique des paramètres étudiés.....	33
5.3. Automates utilisés	33
5.3.1. ARCHITECT <i>ci</i> 4100 (ABBOTT®)	33
5.3.2. Analyseur d'électrolytes 9180 AVL ROCHE®.....	35
5.3.3. Gazomètre ABL 800®.....	36
5.4. Principes de dosage des paramètres analysés par l'Architect <i>ci</i> 4100 (ABBOTT®)	37
6. Protocole expérimental	42
6.1. Contrôle de qualité	42
6.2. Préparation du pool de plasmas.....	42
6.3. Préparation de l'hémolysât.....	42
7. Analyses statistiques	43
CHAPITRE II : Résultats	44
1. Présentation des résultats – études statistiques	44
2. Résultats	45

Table des matières

2.1.	Glucose.....	45
2.2.	Acide urique	46
2.3.	Urée	47
2.4.	ASAT.....	49
2.5.	ALAT.....	50
2.6.	GGT	52
2.7.	PAL.....	53
2.8.	Bilirubine totale	55
2.9.	Bilirubine directe	56
2.10.	LDH.....	58
2.11.	Potassium	59
2.12.	Sodium	60
CHAPITRE III : Discussion		63
CONCLUSION		68
BIBLIOGRAPHIE.....		70
ANNEXES.....		75

Liste des abréviations

°C	: Degré Celsius
ADP	: Adénosine di phosphate
Ag	: Antigène
AK	: Adénylate kinase
ALAT	: Alanine amino transférase
ALKP	: Phosphatase alcaline humaine
AMP	: Adénosine mono phosphate
AMY	: Amylase
ASAT	: Aspartate amino transférase
ATP	: Adénosine tri phosphate
ATP ase	: Adénosine tri phosphatase
BFU-E	: Erythroid Burst-Forming Units
BIC	: Bilirubine conjugué
BIT	: Bilirubine Totale
Ca⁺⁺	: Ion calcium
CFU-E	: Erythroid Colony-Forming Units
CHT	: Cholestérol
CK	: Créatine kinase
Cl⁻	: Ion chlorure
CPK	: Créatine phosphokinase
CRP	: Proteine C réactive
CO₃⁻	: Ion carbonate
CR	: Créatinine
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards institute
CV	: Coefficient de variation
Fe	: Fer
G	: Glucose
g/l	: Gramme par litre
G6PD	: Glucose-6-phosphate déshydrogénase
G-6-PDH	: Glucose 6 phosphate déshydrogénase
GGT	: Gamma glutamyl transaminase
GLD	: Glutamate déshydrogénase
GOD	: Glucose oxydase
GR	: Globule rouge
GTP	: Glutamate déshydrogénase
H	: Heure
Hb	: Hémoglobine
HDL	: Lipoprotéine de haute densité
H₃PO₄	: Acide phosphorique
H₂O₂	: Peroxyde d'hydrogène
H₂O	: Eau
HCO₃⁻	: Ion Bicarbonate
HEDTA	: Hydroxyethyl-éthylène tetracetic diamine
ISE	: Electrode sélective d'ion
K⁺	: Ion de Potassium
LDL	: Lipoprotéine de basse densité
LAC	: Lactose

Liste des abréviations

LIP	: Lipides
LDH	: Lactate déshydrogénase
Mmol	: Milli mole
MDH	: Malate déshydrogénase
Mg²⁺	: Magnésium
mg/L	: Milligramme par litre
N°	: Numéro
Na+	: Ion Sodium
NaCl	: Chlorure de sodium
NAD	: Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	: Nicotinamide adénine dinucléotidereducit
Nm	: Nanomètre
Min	: Minute
O₂	: Oxygène
OH⁻	: Ion Hydroxyde
P	: Phosphore
PAL	: Alcaline phosphatase
Ph	: Potentiel hydrogène
PK	: Pyruvate Kinase
PLP	: Pyridoxal-phosphate
P-NPP	: p-nitrophenyl phosphate
POD	: Peroxydase
PT	: Protéines totales
TBHB	: Acide 2-4-6- tribromo-3-hydroxy benzoïque
TG	: Triglycérides
TGP	: Pyruvate de glutamate transaminase
TGO	: Glutamate oxaloacétate transaminase
VLDL	: Very low density lipoprotein (lipoprotéine de très basse densité)
µl	: Microlitre
µm	: Micromètre
µmol/L	: Micro mole par litre
4AAP	: 4 Amino antipyrine
2,3DPG	: 2,3 DiPhosphoGlycérate

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableaux	Désignation	Page
1.	Les principales variations des paramètres biochimiques lors de l'hémolyse, l'ictère et de l'augmentation de la turbidité.	26
2.	Les paramètres étudiés sur l'automate Architect Ci4100®.	38
3.	Tableau récapitulatif du protocole expérimental.	43
4.	Données du fournisseur pour chaque paramètre.	44
5.	Les résultats du glucose obtenus après ajout de l'hémolysât.	45
6.	Les résultats de l'acide urique obtenus après ajout de l'hémolysât.	46
7.	Les résultats de l'urée obtenus après ajout de l'hémolysât.	47
8.	Les résultats des ASAT obtenus après ajout de l'hémolysât.	49
9.	Les résultats des ALAT obtenus après ajout de l'hémolysât.	50
10.	Les résultats de la GGT obtenus après ajout de l'hémolysât.	52
11.	Les résultats de la PAL obtenus après ajout de l'hémolysât.	53
12.	Les résultats de la Bilirubine totale obtenus après ajout de l'hémolysât.	55
13.	Les résultats de la Bilirubine directe obtenus après ajout de l'hémolysât.	56
14.	Les résultats de l'LDH obtenus après ajout de l'hémolysât.	58
15.	Les résultats du Potassium obtenus après ajout de l'hémolysât.	59
16.	Les résultats du Sodium obtenus après ajout de l'hémolysât.	60
17.	Sens de l'influence de l'hémolyse sur les différents paramètres étudiés.	67

Lise des figures

Liste des figures

<i>Figure</i>	<i>Désignation</i>	<i>Page</i>
1.	Schéma de l'érythropoïèse.	4
2.	Schéma du globule rouge.	4
3.	Structure de la membrane érythrocytaire.	6
4.	Disposition tridimensionnelle des différentes protéines de la membrane du Globule rouge vue au microscope optique.	7
5.	Structure tétramérique de l'hémoglobine.	9
6.	Rapport de concentration des différents paramètres dans les érythrocytes et dans le sérum.	10
7.	Schéma de l'hémolyse.	13
8.	Aspect d'un sérum hémolysé.	16
9.	L'hémoconcentration due au transfert de plasma et de molécules de petite taille de l'espace intravasculaire à l'espace interstitiel.	17
10.	De gauche à droite, les effets d'une durée de centrifugation de plus en plus longue.	19
11.	Aspect d'un sérum ictérique.	22
12.	Interférences liées à un échantillon ictérique.	23
13.	Aspect d'un sérum lipémique.	24
14.	Interférences liées à un échantillon lipémique.	25
15.	Architect Ci41000. ABBOTT®	34
16.	Analyseur d'électrolyte 9180 AVL ROCHE ®	35
17.	Principe de mesure de l'AVL ROCHE ®	36
18.	Gazomètre ABL 800 ®.	37
19.	Représentation graphique du rapport de la glycémie en fonction des concentrations d'hémoglobine.	45
20.	Représentation graphique de différence de la glycémie en fonction des concentrations d'hémoglobine.	45
21.	Représentation graphique du rapport de l'acide urique en fonction des concentrations d'hémoglobine.	46
22.	Représentation graphique de différence de l'acide urique en fonction des concentrations d'hémoglobine.	47

Lise des figures

23.	Représentation graphique du rapport de l'urée en fonction des concentrations d'hémoglobine.	48
24.	Représentation graphique de différence de l'urée en fonction des concentrations d'hémoglobine.	48
25.	Représentation graphique du rapport des ASAT en fonction des concentrations d'hémoglobine.	49
26.	Représentation graphique de différence des ASAT en fonction des concentrations d'hémoglobine.	50
27.	Représentation graphique du rapport des ALAT en fonction des concentrations d'hémoglobine.	51
28.	Représentation graphique de différence des ALAT en fonction des concentrations d'hémoglobine.	51
29.	Représentation graphique du rapport de la GGT en fonction des concentrations d'hémoglobine.	52
30.	Représentation graphique de différence de la GGT en fonction des concentrations d'hémoglobine.	53
31.	Représentation graphique du rapport de la PAL en fonction des concentrations d'hémoglobine.	54
32.	Représentation graphique de différence de la PAL en fonction des concentrations d'hémoglobine.	54
33.	Représentation graphique du rapport de la bilirubine totale en fonction des concentrations d'hémoglobine.	55
34.	Représentation graphique de différence de la bilirubine totale en fonction des concentrations d'hémoglobine.	56
35.	Représentation graphique du rapport de la bilirubine directe en fonction des concentrations d'hémoglobine.	57
36.	Représentation graphique de différence de la bilirubine directe en fonction des concentrations d'hémoglobine.	57
37.	Représentation graphique du rapport de l'LDH en fonction des concentrations d'hémoglobine.	58
38.	Représentation graphique de différence de l' LDH en fonction des concentrations d'hémoglobine.	58
39.	Représentation graphique du rapport Du potassium en fonction des concentrations d'hémoglobine.	59
40.	Représentation graphique de différence Du potassium en fonction des concentrations d'hémoglobine.	60
41.	Représentation graphique du rapport du sodium en fonction des concentrations d'hémoglobine.	61
42.	Représentation graphique de différence du sodium en fonction des concentrations d'hémoglobine.	61

INTRODUCTION

La biologie médicale est un élément déterminant dans le parcours de soin des patients. Elle permet grâce à des analyses effectuées sur des prélèvements biologiques d'orienter le clinicien voire de poser parfois le diagnostic de certaines pathologies.

Cette discipline est soumise à des procédures strictes de contrôle de qualité quotidiennes et évolue actuellement à différents niveaux : structures et fonctionnement du laboratoire, automatisation et robotisation des phases pré-analytiques et analytiques, assurance et management de la qualité...

Une équipe multidisciplinaire veille avec beaucoup de rigueur au bon fonctionnement des laboratoires d'analyses médicales tant sur le plan organisationnel que sur le plan qualité des résultats transmis aux prescripteurs. Mais malgré ces efforts, cela n'a pourtant pas permis de s'affranchir d'éventuelles erreurs.

Actuellement la part la plus importante des erreurs concerne la phase pré-analytique : (préparation du patient avant le prélèvement, le prélèvement proprement dit, le transport au laboratoire, l'enregistrement des échantillons biologiques et les étapes de prétraitement notamment la centrifugation et l'aliquotage). Plusieurs anomalies au décours de cette phase pré-analytique pourraient concourir à obtenir des échantillons biologiques hémolysés.

La prévention des erreurs médicales est l'un des enjeux majeurs de la prise en charge des patients, l'hémolyse, le caractère ictérique ou lactescent d'un échantillon plasmatique peuvent interférer avec la mesure d'un analyte. Ces variables pré-analytiques peuvent donc conduire à des erreurs de mesures difficiles à mettre en évidence et à contrôler.

L'hémolyse représente une des interférences les plus fréquentes en biochimie clinique ; ainsi la mesure de certains paramètres sur des échantillons hémolysés peut entraîner un résultat erroné conduisant à de mauvaises interprétations, un mauvais diagnostic et une prise en charge inappropriée du patient.

Nous nous sommes intéressés dans notre travail à l'étude de l'interférence de l'hémolyse sur quelques paramètres biochimiques réalisés sur l'analyseur de biochimie ARCHITECT ci 4100 (ABBOTT ®) et l'analyseur d'électrolytes 9180 AVL ROCHE®.

OBJECTIFS

- ❖ Déterminer l'influence de l'hémolyse sur certains paramètres biochimiques (glucose, acide urique, PAL, GGT, urée, bilirubine totale, bilirubine directe, LDH, ASAT, ALAT, Ca^{2+} , Na^+ et K^+)
- ❖ Fournir des recommandations pour minimiser l'hémolyse in-vitro.

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I : Généralités sur le globule rouge

1. Définition

Le globule rouge, appelé aussi hématie ou érythrocyte est une cellule anucléée chez l'homme et les mammifères, produite essentiellement dans la moelle osseuse à partir de la cellule souche totipotente[1].

Les principales fonctions des érythrocytes sont le transport de l'oxygène, du dioxyde de carbone et l'élimination des protons formés lors du métabolisme tissulaire grâce à sa propriété de déformabilité qui lui permet le passage dans des capillaires de diamètre inférieur au sien. Quant au métabolisme érythrocytaire, il est assez réduit mais assure la protection de l'hémoglobine et de la membrane contre l'oxydation [2].

2. Biosynthèse du globule rouge

L'érythropoïèse est l'ensemble des mécanismes qui concourent à la formation des érythrocytes afin de compenser les pertes physiologiques et l'élimination des globules rouges vieillissants (hémolyse physiologique).

Des cellules contenant de l'hémoglobine embryonnaire apparaissent dans le mésoblaste dès la 3^{ème} semaine de gestation et à partir du 2^{ème} mois elles se localisent dans le foie et la rate, puis la synthèse devient médullaire [1].

Au cours de sa maturation, les précurseurs perdent peu à peu leurs organites. Le dernier précurseur est le réticulocyte qui a expulsé son noyau mais possède encore quelques mitochondries et corps de Golgi, donnant à la fin un globule rouge mature dépourvu de noyau, de mitochondrie et de ribosome ce qui explique sa brève survie cellulaire (environ 120 jours) [4] (Figure01).

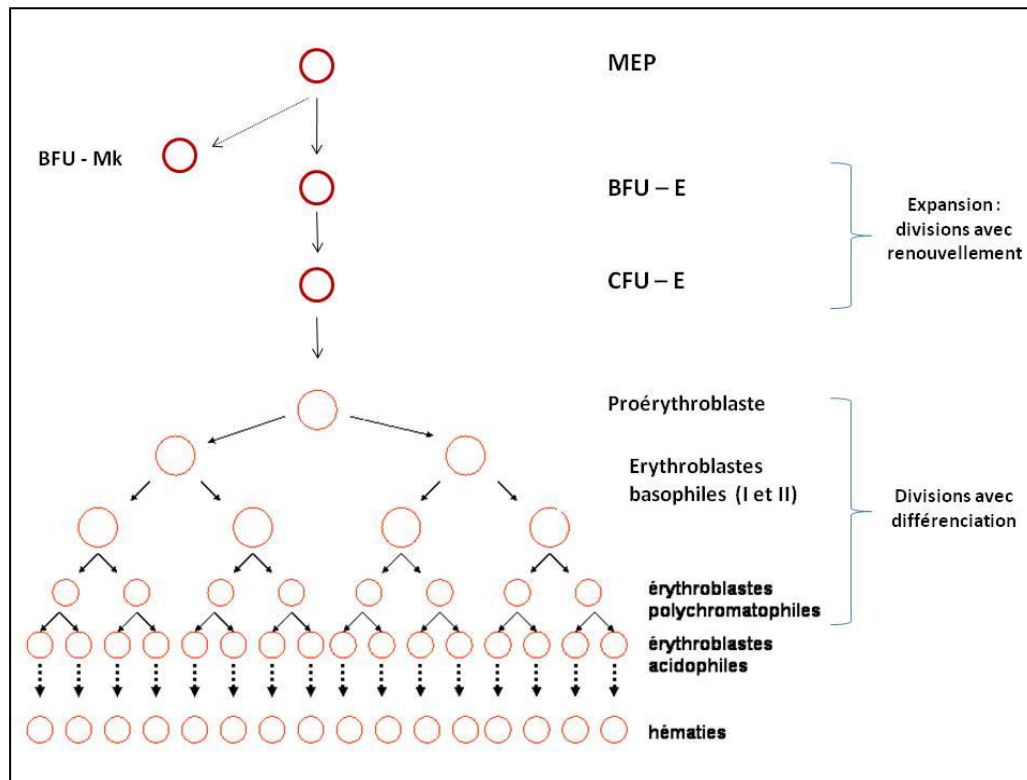


Figure 01:Schéma de l'érythropoïèse [3].

3. Structure et constituants du GR

3.1.Structure

L'érythrocyte se présente sous forme d'un disque biconcave; d'un diamètre de 7 à 8 μ m

Et d'épaisseur moyenne de 1,92 μ m. Il est doué d'une grande déformabilité qui lui permet de franchir des capillaires d'un diamètre inférieur au sien [4].

Le globule rouge est un exemple parfait des relations étroites qui existent entre une structure protéique et une fonction biologique. Sa structure est relativement simple une membrane entourant une solution d'hémoglobine, sa forme disque biconcave facilite les échanges gazeux [5].

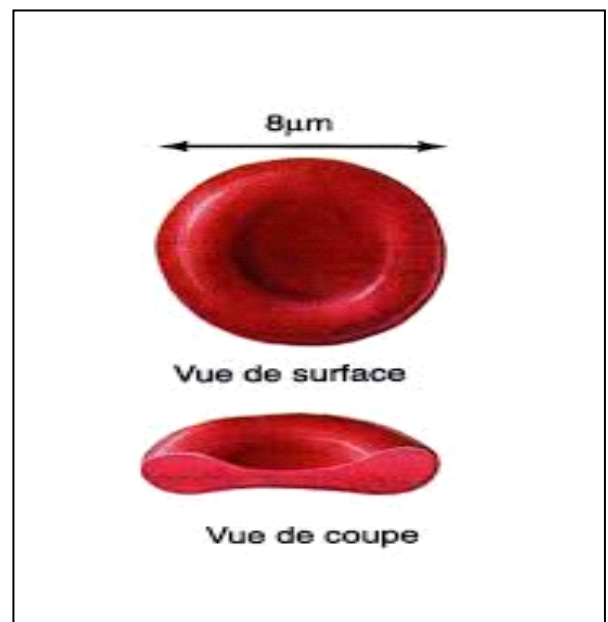


Figure 02:Schéma du globule rouge [6]

3.2. La membrane du globule rouge

3.2.1. Constituants de la membrane érythrocytaire

La membrane érythrocytaire assure au globule rouge sa forme biconcave, sa plasticité et sa déformabilité. Elle porte également des déterminants de groupes sanguins et représente un modèle idéal pour l'étude de la structure et des fonctions des membranes cellulaires.

Elle représente une mosaïque fluide constituée d'une matrice lipidique disposée en une double couche dans laquelle flottent et se déplacent des protéines globulaires. Les composants glucidiques, lipidiques et protéiques ne se répartissent pas d'une manière équivalente sur les faces externes et internes de la membrane[7](Figure3).

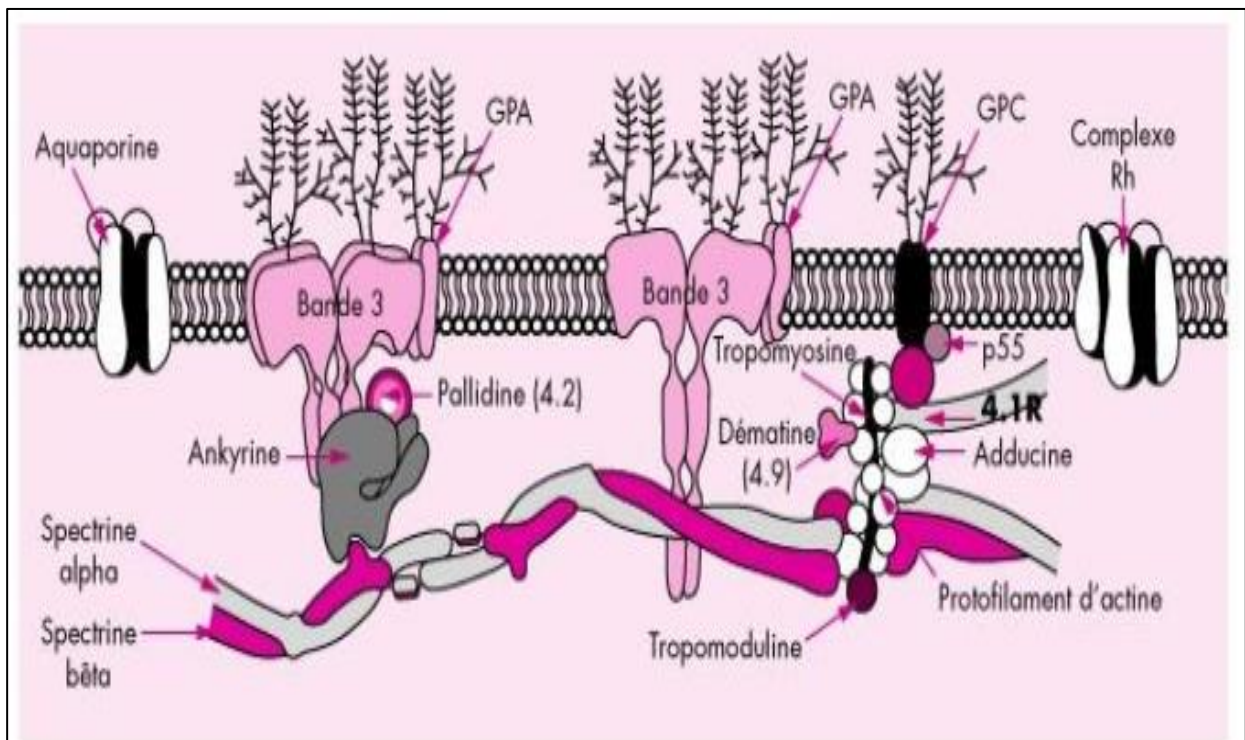


Figure 03 : Structure de la membrane érythrocytaire [8].

Les principaux lipides sont les phospholipides déposés de manière asymétrique dans la double couche, à savoir les choline-phospholipides (phosphatidyl-choline et sphingomyéline) dans le feuillet externe et les aminophospholipides (phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine) dans le feuillet interne.

Les autres constituants lipidiques sont le cholestérol non estérifié (25%) et les glycosphingolipides (11%). Ces derniers, exclusivement localisés dans le feuillet externe sont des récepteurs [5].

Les protéines membranaires sont réparties en 2 catégories en fonction de leur situation :

- ❖ **Les protéines transmembranaires (ou intégrées) :** ce sont la protéine 3, la Glycophorine et la Glycophorine C.
- ❖ **Les protéines extra-membranaires :** elles tapissent la face cytoplasmique de la membrane se sont des protéines structurales constituant le cytosquelette : spectrine, ankyrine et protéine 4,1 .le réseau formé par ces protéines est responsable de la forme biconcave du globule rouge[9].

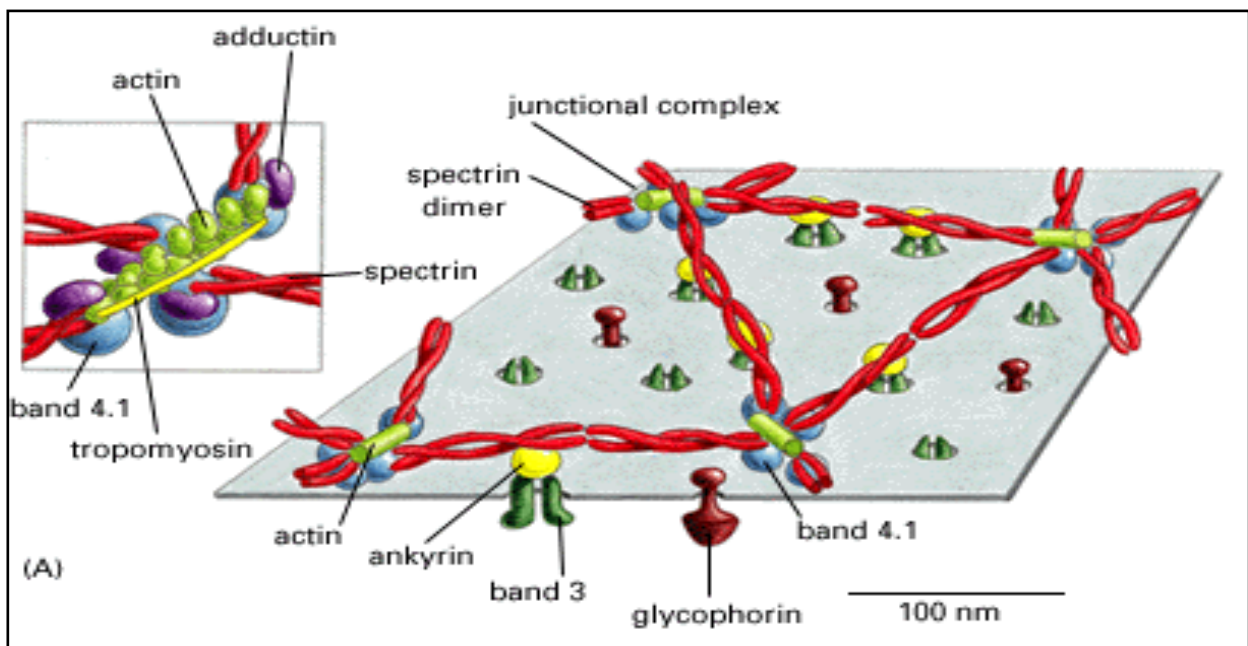


Figure 04 : Disposition tridimensionnelle des différentes protéines de la membrane du Globule rouge vue au microscope optique [10].

3.2.2. Rôle de la membrane érythrocytaire

- Rétention des molécules de l'hémoglobine
- Les échanges transmembranaires : l'eau, les anions (les chlorures et bicarbonates), les cations, glucose et les acides aminés [5].
- ✓ **L'eau** : traverse rapidement et passivement la membrane à travers les pores.
- ✓ **Les anions** : les chlorures et bicarbonates traversent passivement la membrane érythrocytaire mais moins vite que l'eau.
- ✓ **Les cations** : la pénétration nécessite un mécanisme actif, l'énergie étant fournie par l'ATP.
- ✓ Les concentrations de K^+ et Na^+ intracellulaires sont maintenues grâce aux pompes Na^+/K^+ rejetant le Na^+ ayant pénétré dans le globule rouge et maintenant le K^+ à l'intérieur du GR.
- ✓ **Le glucose** : la pénétration du glucose est facilitée par un transporteur qui est la perméase.
- ✓ **Les acides aminés** : la pénétration des acides aminés est variable d'un acide aminé à un autre.

3.3. Le contenu intra-érythrocytaire

3.3.1. L'hémoglobine

En 1862 le physiologiste Allemand Hoppe Syler a donné le terme hémoglobine pour désigner le pigment respiratoire qui donne sa couleur rouge aux hématies et qui transporte l'oxygène contenu dans le globule rouge [11].

L'hémoglobine humaine est une métalloprotéine tétramérique constituée de deux parties : une partie protéique (globine formée de deux sous-unités α -globine et deux sous-unités non α) et une partie non protéique (constituée de la protoporphyrine et du Fer) [12] (Figure 5)

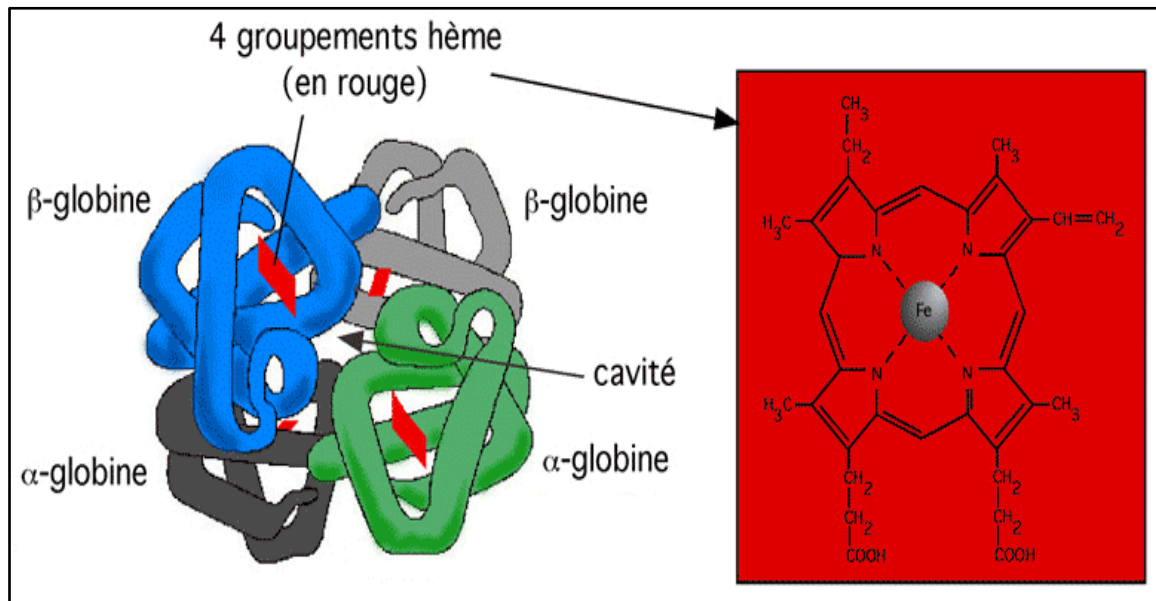


Figure 05 : Structure tétramérique d l'hémoglobine [13].

3.3.2. Autres constituants du globule rouge

L'analyse du contenu cellulaire révèle la présence :

- ❖ D'eau à 70% ;
- ❖ D'enzymes telles que la LDH, les transaminases (ASAT, ALAT) et la phosphatase acide ;
- ❖ De constituants minéraux à l'état ionisé ; les érythrocytes sont très riche en potassium K^+ , ils contiennent environ 90mmol/l. Ils contiennent aussi une fine concentration en magnésium (Mg^{2+}) et de chlorures (Cl^-) ;
- ❖ De constituants organiques : créatinine, acide urique, glucose et urée à de faibles concentrations (Figure 06)[14]. (Annexe I)

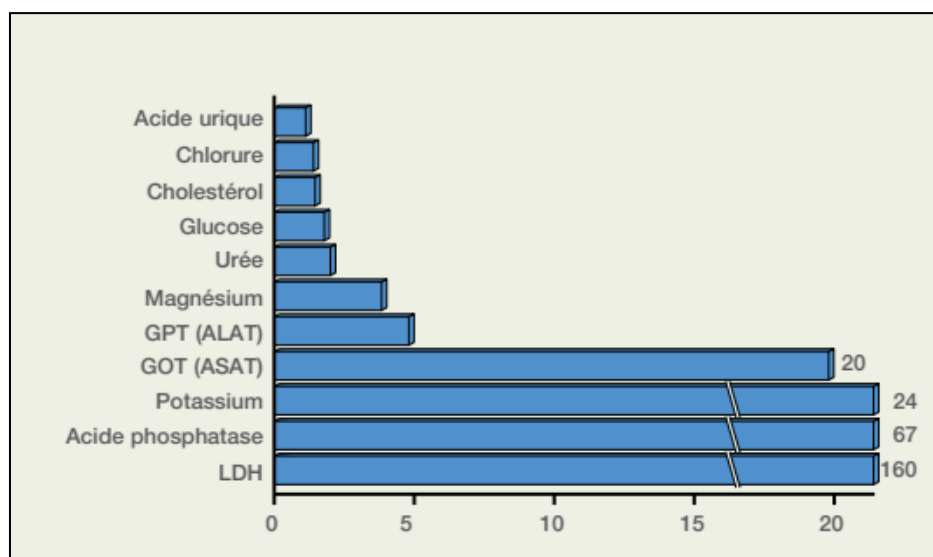


Figure 06 : Rapport de concentration de différents paramètres dans les érythrocytes et dans le sérum [15].

4. Physiopathologie de l'hémolyse

4.1. Définition de l'hémolyse

L'hémolyse est le phénomène irréversible par lequel les globules rouges sont détruits par rupture de leurs membranes plasmiques avec pour conséquence la libération de leur contenu intracellulaire dont une quantité importante d'hémoglobine [16].

4.2. Différents types d'hémolyse

4.2.1. Hémolyse physiologique

➤ Hémolyse intra tissulaire

Les globules rouges âgés, après une durée de vie normale de 120 jours, sont phagocytés par les macrophages du système des phagocytes mononucléés. Chez le sujet normal, la majorité des globules rouges sont détruits dans les macrophages de la moelle osseuse (minimum 50%). Le reste de l'hémolyse se répartit dans l'organisme, en particulier dans la rate et le foie[5].

Cette phagocytose porte sur des globules rouges dont le vieillissement s'est traduit par :

- Des modifications biochimiques : diminution du contenu enzymatique, ralentissement métabolique, perte des lipides membranaires, phénomènes oxydatifs.

- Des modifications morphologiques (tendance à la sphéricité par réduction de la surface membranaire et/ou hyperhydratation).
- Des modifications de la plasticité (diminution de la déformabilité des globules rouges entraînant une stagnation dans les capillaires [5]).

Lors de cette hémolyse:

- ❖ La globine va être dégradée en acides aminés.
- ❖ Le fer sera libéré et récupéré par l'organisme (circuit fermé) :
 - Les deux tiers passent dans la circulation, se lient à la transferrine, pour être réutilisés pour l'érythropoïèse.
 - Le tiers restant sera stocké dans les macrophages sous forme de ferritine et d'hémosidérine.
- ❖ Le reste de l'hème après perte du fer (la protoporphyrine α) sera métabolisé en bilirubine qui va être libérée dans le plasma sous forme libre ou non conjuguée. Fixée sur l'albumine et transportée vers le foie où elle subira, dans l'hépatocyte, une glycurono-conjugaison qui la transforme en bilirubine conjuguée. Cette dernière passe dans la bile et sera éliminée dans les selles sous forme de stercobilinogène. Une petite partie est réabsorbée par l'intestin et éliminée par le rein sous forme d'urobiline[17].

➤ Hémolyse intra vasculaire

Une faible partie de l'hémolyse physiologique se déroule au sein même de la circulation sanguine ; dans ce cas, l'hémoglobine est libérée dans le plasma où elle forme un complexe avec l'haptoglobine, synthétisée par le foie. Ce complexe est capté par l'hépatocyte au niveau duquel l'hémoglobine est dégradée [18].

Si la capacité de fixation de l'haptoglobine est débordée, l'hémoglobine en excès reste libre et traverse le filtre glomérulaire après dissociation de la molécule d'hémoglobine en deux dimères.

Elle est réabsorbée par les cellules du tubule rénal qui la catabolisent et se chargent de dépôts de fer. Une hémosidérinurie apparaît quelques jours plus tard lorsque les cellules desquament dans les urines. Si la réabsorption tubulaire est dépassée, il existe une hémoglobinurie.

En fait, la dégradation de l'hémoglobine est toujours intra tissulaire au niveau des cellules épithéliales du foie et du rein[19].

4.2.2. Hémolyse pathologique

C'est la destruction précoce et exagérée des globules rouges circulants sous l'effet d'un processus hémolytique. Elle peut être due à deux mécanismes principaux:

- ❖ Soit une anomalie du globule rouge : hémolyses corpusculaires ou globulaires
- ❖ Soit à une agression extrinsèque des hématies : hémolyses extra corpusculaires[20].

➤ Hémolyses corpusculaires

- Anomalie de la membrane : maladie de Minkowski-Chauffard ou sphérocytose héréditaire
- Anomalie de l'hémoglobine : (hémoglobinopathie (thalassémies, drépanocytose...)
- Déficit enzymatique (déficit en Pyruvate Kinase), déficit en G₆PD : Glucose 6 Phosphate Déshydrogénase...)[21]

➤ Hémolyses extra corpusculaire

C'est une hémolyse secondaire à une agression extrinsèque des hématies, cette agression peut être :

- ❖ D'origine toxique (benzène, plomb, sulfate de cuivre, la phénacétine...),
- ❖ D'origine immunologique (accidents transfusionnels, anémie hémolytique du nouveau-né, anémie hémolytique auto-immune...),
- ❖ D'origine mécanique (ex : prothèse cardiaque)
- ❖ Ou d'origine infectieuse (paludisme trypanosomose...) [22]

Qu'elle soit corpusculaire, ou extracorpulaire, les perturbations biologiques suivantes peuvent apparaître :

- La bilirubine libre sera augmentée (Bilirubine conjuguée normale)
- L'haptoglobine sérique sera effondrée, souvent < 0.1 G/L,
- La LDH sérique sera augmentée (parfois 20 fois la normale)
- Le fer sérique sera augmenté.

La combinaison d'une augmentation des taux sériques de LDH et d'une diminution de l'haptoglobine a été spécifique d'une hémolyse à 90 %. La combinaison de taux de LDH normaux et d'haptoglobine supérieurs à 25 mg/l a écarté la présence d'une hémolyse avec une sensibilité de 92 % [23].

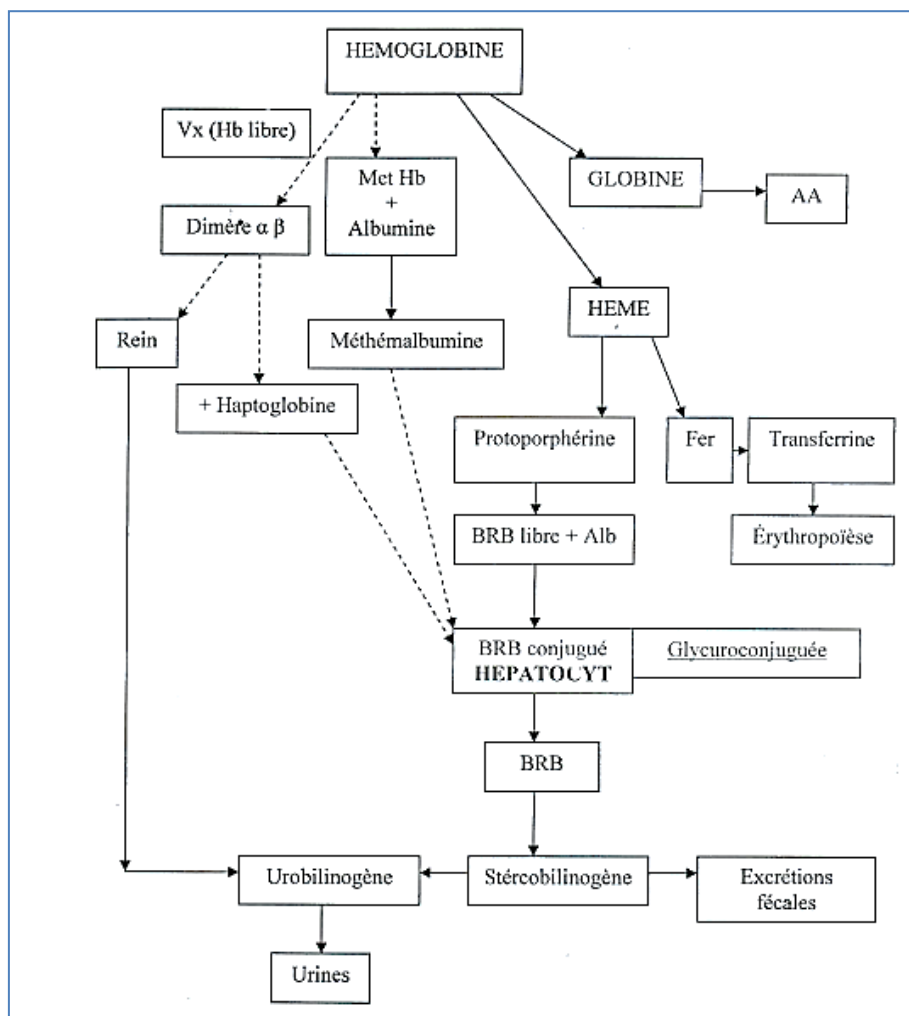


Figure 07 : Schéma de l'hémolyse [24].

Chapitre II : Interférences en biochimie

1. Définition de l'interférence

Le terme interférence se définit selon l'article de la commission de validation de technique par « Modification du signal mesuré, relative à une concentration déterminée, par suite de la présence d'un corps accompagnant l'analyte dans le milieu soumis à l'analyse, modifiant l'exactitude des résultats »[25].

Il s'agit donc de l'effet que présente une substance présente dans l'échantillon, de modifier la juste valeur du résultat du dosage d'un analyte exprimé en concentration ou en activité[26].

Le processus analytique peut être perturbé par des substances interférentes de différentes manières :

- Mécanisme de surcharge (effet pré analytique) ;
- Mécanisme physique (interférences spectrale) ;
- Mécanisme chimique [27].

2. Mécanismes d'interférences

2.1.Effet pré-analytique

Au sein de l'échantillon, une modification de la concentration d'un analyte préalablement à la phase analytique est communément appelée effet pré-analytique [28].il s'agit en fait d'une surcharge provenant du contenu érythrocytaire qui va entraîner une surestimation de l'analyte dosé [27] .(Annexe II)

2.2.Interférences de détection et interférences spectrales (interférences physiques)

La substance interférente peut également avoir des propriétés similaires à celles de l'analyte en ce qui concerne la fluorescence, la dispersion lumineuse ou la position d'élution.

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux interférences spectrales qui sont liées à l'additivité de la loi de Beer-Lambert, et vont s'observer pour les paramètres dont la mesure finale est spectrophotométrique et réalisée à une longueur d'onde proche des principales longueurs d'onde d'absorption de la substance interférente[29].

Il peut s'agir d'une surestimation ou sous-estimation du paramètre dosé (selon que l'on mesure en cinétique descendante ou ascendante) et dans tous les cas l'interférence spectrale fournit un résultat « erroné ».

2.3. Interférences chimiques

Les interférences chimiques sont liées aux perturbations induites par la substance interférente lors de la réaction chimique ou enzymatique utilisée pour le dosage du paramètre. Là encore il peut donc s'agir de surestimation ou de sous-estimation et le résultat fourni est erroné dans le sens où il ne correspond pas à la réalité.

Les interférences chimiques sont nombreuses, la substance interférente peut ainsi inhiber une réaction par compétition, complexations ou précipitation d'un réactif ou d'un produit de réaction. La substance interférente peut également altérer l'activité d'une enzyme (analyte ou réactif) ou du fait de la non spécificité d'une réaction, agir de la même manière que l'analyte en établissant une réaction croisée [27].

3. Les principales interférences en biochimie

Les substances interférentes sont nombreuses et peuvent être d'origine endogène ou exogène.

On y recense principalement :

- ❖ L'hémoglobine suite à une hémolyse ; qui est la plus fréquente ;
- ❖ La bilirubine ;
- ❖ Les lipides.

3.1. Hémolyse

3.1.1. Définition

L'hémolyse dans un prélèvement sanguin après centrifugation se caractérise par une coloration rosée à rouge du plasma ou du sérum (Figure 08).

L'intensité de cette coloration varie selon la concentration d'hémoglobine. Elle est visuellement détectable pour des concentrations d'hémoglobine libre d'environ 0.1 à 0.3 g/L (6.2 à 18.6 $\mu\text{mol/L}$), et clairement visible pour une lyse de 0.5% des globules rouges correspondant à 0.5 g/L (31 $\mu\text{mol/L}$) d'hémoglobine libre.

En effet cette hémolyse peut avoir un effet très délétère sur la qualité du prélèvement et les résultats d'analyses [27]. (Annexe III)

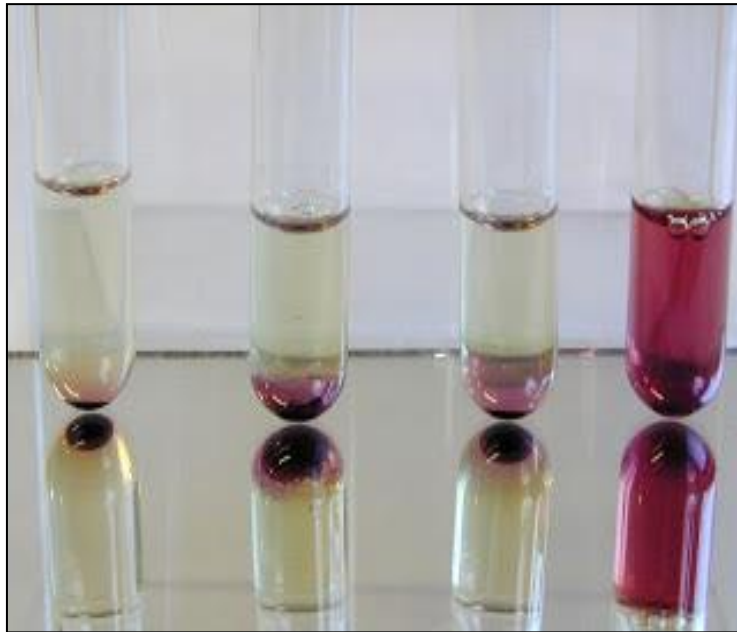


Figure 08 : Aspect d'un sérum hémolysé [30].

3.1.2. Différents types d'hémolyses

Selon l'origine de cette hémolyse on distingue l'hémolyse in vivo et l'hémolyse in vitro.

➤ **Hémolyse in vivo**

Elle peut être physiologique ou bien pathologique. (Voir chapitre I)

➤ **L'hémolyse in vitro**

L'hémolyse in vitro a toujours été un problème important pour les laboratoires de biologie médicale du monde entier. Les causes majeurs de l'hémolyse in vitro sont liées l'étape pré-analytique.

Cette dernière s'étend la prescription médicale à la réalisation proprement dite de l'analyse biologique [27].

3.1.3. Principales causes de l'hémolyse in-vitro

✓ **Durée et intensité de la stase veineuse**

La pose d'un garrot provoque une augmentation de pression en amont de celui-ci, entraînant une fuite d'eau et d'électrolytes vers le secteur péri vasculaire, par conséquent une augmentation de la concentration (hémococoncentration) sérique ou plasmatique d'analytes qui

ne diffusent pas, et affecte certaines analyses telles que : le potassium, les ALAT, la CK, la bilirubine, la LDH et la GGT. On retrouve une variation +/- de 10%.

Une stase d'un maximum de 60 secondes est acceptable et n'a aucun effet significatif sur l'échantillon [31] (Figure 09).

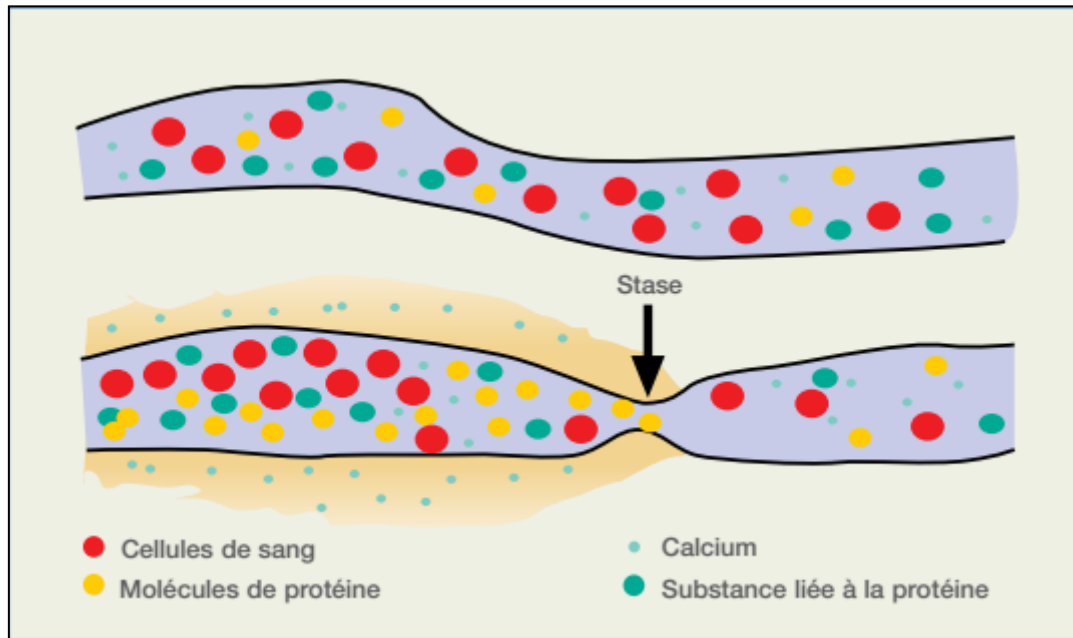


Figure 09: L'hémoconcentration due au transfert de plasma et de molécules de petite taille de l'espace intravasculaire à l'espace interstitiel [32].

✓ Ponction veineuse

Le fait de déplacer l'aiguille plusieurs fois dans le tissu en essayant de localiser la veine ainsi qu'une dépression trop forte liée à un diamètre d'aiguille trop petit ou un vide trop intense par une seringue peut entraîner des risques accrus d'hémolyse [33]

✓ Prélèvement à partir d'un cathéter

L'hémolyse serait due à la transformation d'un flux laminaire en flux turbulent, cet effet étant obtenu lorsque la vitesse d'écoulement dépasse un certain seuil.

L'augmentation de la différence de pression et du diamètre de la canule provoque l'hémolyse [34].

✓ Homogénéisation inadéquate du sang

Une agitation trop brutale des tubes entraîne une hémolyse de l'échantillon par lyse cellulaire [32].

✓ Conditions de stockage

La durée de stockage d'un échantillon est limitée, un stockage prolongé abouti à :

-Une dégradation de certains constituants par action d'enzymes du plasma ou des cellules sanguines, par exemple : le glucose (perte de plus de 7 % par heure).

- La libération à partir des cellules de constituants intracellulaires, par exemple le potassium qui a une concentration intra érythrocytaire élevée [35].

Si le sérum ou le plasma ne sont pas séparés des cellules à l'aide d'un gel séparateur ou par décantation après la centrifugation, des substances peuvent passer des cellules au plasma ou au sérum par diffusion, en outre, les risques d'hémolyse augmentent. Ce processus peut entraîner des modifications significatives après 2 à 3 heures seulement [29,33].

En revanche, après séparation, la plupart des analytes biochimiques dosés en routine sont stables quelques heures à température ambiante, d'un à trois jours en réfrigération, plusieurs semaines en congélation à - 20 °C.

Certains échantillons peuvent être stockés à température ambiante pendant une période prolongée tandis que d'autres doivent être stockés au réfrigérateur ou être congelés .Les cellules de sang étant détruites lors de la congélation.[32].

✓ Transport des échantillons

En raison de leurs stabilités parfois très limitées, les échantillons doivent être transmis au laboratoire aussi rapidement que possible. Le transport devrait être effectué de manière optimale afin que le prélèvement ne subisse aucune modification. Il devrait se faire dans des délais brefs et à température ambiante. Les vibrations et les chocs lors du transport peuvent également engendrer une hémolyse [37].

✓ Erreurs lors de la centrifugation

Une durée d'attente trop longue avant la centrifugation peut provoquer des modifications du sérum / plasma au-dessus des cellules (Figure10) .

Certains paramètres peuvent contribuer à l'hémolyse : durée et vitesse de centrifugation ainsi que la température lors de la centrifugation. (Annexe IV)

La centrifugation doit être assez intense pour permettre une sédimentation totale des cellules tout en étant suffisamment douce pour ne pas lyser les cellules sanguines [38].

Un refroidissement ou un réchauffement extrême dans la centrifugeuse peut provoquer une hémolyse. La température dans la centrifugeuse doit être comprise entre 20 °C et 22 °C (recommandations CLSI 2005).

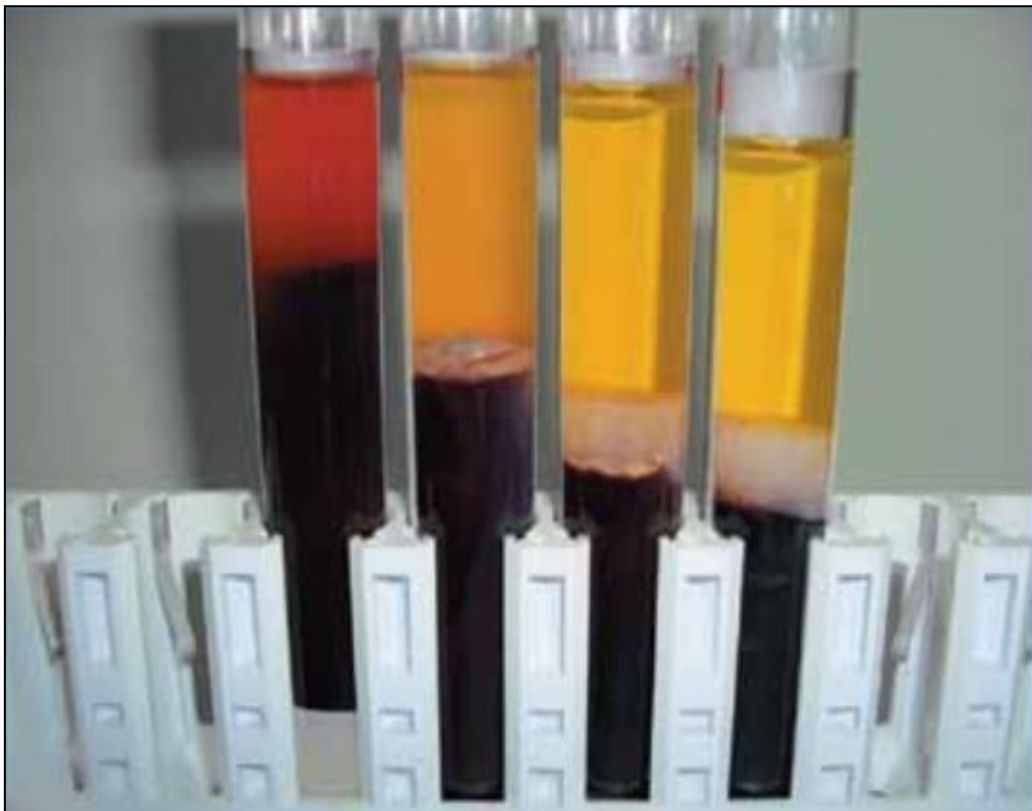


Figure 10 : De gauche à droite, les effets d'une durée de centrifugation de plus en plus longue[32].

3.1.4. Interférence de l'hémolyse avec les analyses biologiques

3.1.4.1. Interférences d'apport

L'hémolyse *in vitro* est une anomalie pré-analytique et elle peut engendrer des interférences d'apport par un mécanisme de surcharge. La libération du contenu érythrocytaire induit une surestimation de certains paramètres. Cette augmentation est directement proportionnelle à la concentration intra-érythrocytaire de l'analyte en question et à l'importance de l'hémolyse, Tels que le K⁺, la LDH et les transaminases[27].

3.1.4.2. Interférences chimiques

Elles correspondent à l'ensemble des perturbations induites par l'hémoglobine ou tout autre composant érythrocytaire (protéines structurales, lipides, enzymes, carbohydrates...) lors de la réaction chimique ou enzymatique utilisée pour le dosage d'un paramètre donné.

À titre d'exemple on peut citer l'interférence lors du dosage de la créatine kinase par libération d'adénylate kinase. L'adénylate kinase (AK) ou myokinase est susceptible d'interférer sur la réaction par consommation d'ADP et génération d'ATP et entrée donc en compétition avec la créatine kinase.

L'interférence de l'hémolyse sur les dosages immunochimiques est beaucoup moins fréquente que pour les dosages spectrophotométriques. Il peut toutefois exister des interférences liées à une éventuelle surcharge ou liées à la réactivité croisée des anticorps utilisés vis-à-vis de protéines érythrocytaires [27].

3.1.4.3. Interférences physiques

Les principales bandes d'absorption de l'hémoglobine sont situées à 415 nm, 540 nm et 578nm. L'hémolyse est donc susceptible d'influencer la mesure des paramètres dont la détection se fait par spectrophotométrie autour de ces longueurs d'ondes. Exemple l'hémoglobine et la bilirubine.

De plus la structure de l'hémoglobine peut être modifiée en fonction du milieu réactionnel, le pH et la présence d'agents oxydants ou réducteurs. Cela aboutit à des formes d'hémoglobine dont le spectre d'absorption est différent donc à d'autres potentielles interférences spectrophotométriques[39].

L'hémolyse a un triple effet:

- ❖ La libération de composants intracellulaires modifie la concentration dans le sérum ou le plasma comme décrit ci-dessus.
- ❖ La coloration rouge causée par l'hémoglobine interfère avec les mesures photométriques.
- ❖ Les réactions chimiques qui se déroulent au cours des analyses peuvent être influencées par des substances cellulaires[40].

3.2. Interférence due à la bilirubine

3.2.1. Définition de l'ictère (jaunisse)

L'ictère correspond à la coloration jaune des téguments (peau et muqueuses) en raison de l'augmentation du taux plasmatique de la bilirubine au-delà des valeurs usuelles.

Le sérum ou le plasma perdent leurs couleurs normales jaune pâle, en virant vers le jaune foncé, le brun ou carrément devenir verdâtre [41].

3.2.2. Origine de l'échantillon ictérique

La bilirubine est le produit de dégradation normal de l'hémoglobine contenue dans les globules rouges.

De nombreuses pathologies, en particulier celle touchant le foie ou les globules rouges, sont associées à l'élévation anormale de la bilirubine dans le sang, colorant ainsi la peau et les liquides biologiques en jaune foncé ou brun. On parle d'ictère pour la peau et d'échantillon ictérique pour un prélèvement (Figure 11).

Un échantillon ictérique doit être signalé par le laboratoire d'analyses médicales. Visuellement l'aspect ictérique d'un plasma est détectable pour une concentration de bilirubine libre d'environ 25 $\mu\text{mol/L}$ (1.46mg /dl)[42].



Figure 11 : Aspect d'un sérum ictérique[43].

3.2.3. Interférence d'un échantillon ictérique avec les analyses de laboratoire

La présence de bilirubine en excès dans un échantillon interfère avec de nombreux dosages par des interférences spectrales ou chimiques.

3.2.3.1. Interférence spectrale

La bilirubine étant un composé coloré il s'agit principalement d'interférence optique. Elle absorbe la lumière entre 400 et 520 nm, elle peut donc potentiellement interférer avec tout dosage utilisant ces longueurs d'onde de détection, exemple : le taux de protides ; la CPKet la créatinine (Figure 12).

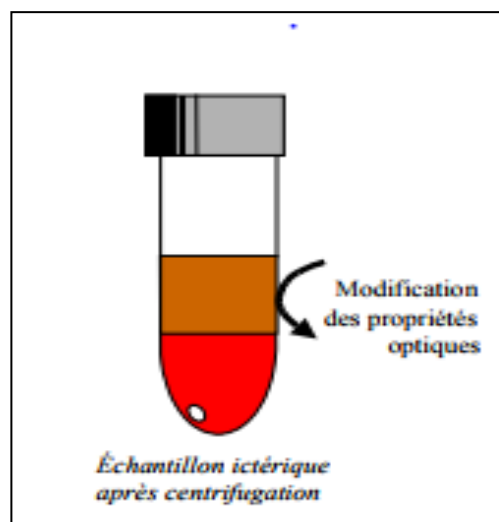


Figure 12 : Interférences liées à un échantillon ictérique [44]

3.2.3.2. Interférence chimique

La bilirubine peut réagir chimiquement avec les composants du milieu réactionnel notamment du fait de son caractère facilement oxydable. Ce phénomène se retrouve notamment dans tous les dosages mettant en jeu la réaction de Trinder tels que le glucose, la créatinine, les triglycérides, le cholestérol-HDL et l'acide urique

Par contre, l'interférence de l'ictère sur les dosages immunochimiques est négligeable.[45]

3.3. La lipémie

3.3.1. Définition

La lipémie est un état trouble du plasma, qui est visible à l'œil nu à partir d'une concentration de 300mg/l (0.3g/l) en triglycérides [46].

L'échantillon lipémique a un aspect trouble, translucide ou laiteux qui est dû à l'augmentation des lipides ; cette situation est la conséquence d'une augmentation de la production ou/et diminution du catabolisme de lipoprotéines riches en triglycérides (les chylomicrons et les VLDL)(Figure 13)[47].



Figure 13 : Aspect d'un sérum lipémique[48].

3.3.2. Origine d'un échantillon lipémique

La plus part des échantillons lipémiques sont dus à une alimentation récente riche en lipide, la lipémie poste prandiale disparaît après un jeûne de 12heures [49].

Les autres causes sont pathologiques telle que le diabète, pancréatite, maladie de cushing et les plus importantes les maladies du métabolisme des lipides qui doivent être signalées au laboratoire d'analyse médicale.

Un simple examen visuel de l'échantillon permet d'orienter grossièrement la recherche de ces troubles par exemple certaines graisses telles que les chylomicrons forment une couche d'aspect crémeux qui flotte à la surface après 24h au réfrigérateur (test de crémage).

D'autres graisses telles que le VLDL génèrent une turbidité homogène du plasma [47]. (Figure14) .

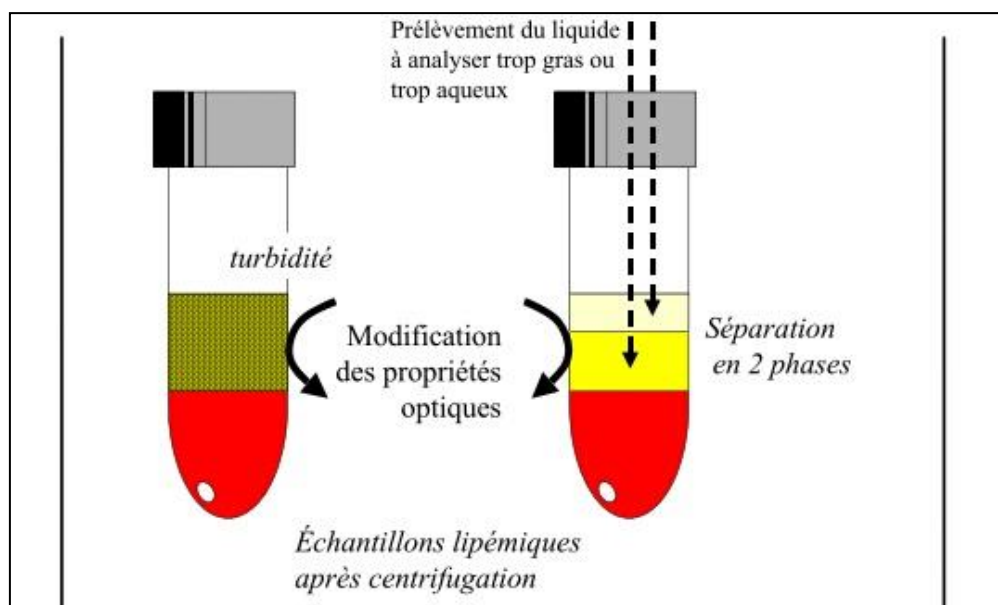


Figure 14 : Interférence lié à un échantillon lipémique[44] .

3.3.3. Interférence de la lipémie avec les analyses

La présence des lipides en excès dans un échantillon interfère avec nombreux dosage par des interférences physico-chimiques, optiques ou immunologiques.

3.3.3.1. Interférence physique

Les lipoprotéines présents dans un sérum/ou plasma peuvent altérer les propriétés physique de la matrice telles que la viscosité, la tension superficielle, la turbidité qui entraînent la modification de la concentration mesurée de l'analyte.

3.3.3.2. Interférence optique

Les propriétés optiques du sérum et du plasma sont exploitées pour de nombreuses analyses. Les propriétés optiques d'un échantillon seront faussées par un phénomène de turbidité et/ou d'inhomogénéité [46].

3.3.3.3. Interférence immunologique

La lipémie interfère aussi avec divers dosages immunologiques, tel que l'immunotypage des protéines sériques en présence excessive de lipides qui interfèrent avec la réaction antigènes – anticorps en bloquant les sites de liaison sur les anticorps. L'interférence peut causer des résultats faussement élevés ou faussement diminués [50].

Le tableau 01ci-dessous Les principales variations des paramètres biochimiques lors de l'hémolyse, l'ictère et de l'augmentation de la turbidité. [51].

Analyse	Hémolyse	Lipémie	Ictère	Valeur normal
Na+	↘	==	↗	135-145 mmol/l
K+	↗	==	==	3.5-5 mmol/l
Cl-	↘	↘	↘	95-105meq/l
BIC	↘	↗	S ₂ O ₂	0-3 mg/l
BIT	↘	==	S ₂ O ₂	2-10 mg/l
CHT	↗	==	↘	0.50-2 g/l
LDL	==	↘	==	0-1,6g /l
HDL	==	↘	==	0.4-0.9 g/l
CPK	↗	↘	↘	0-200UI /l
CRP	==	==	↘	0-6 mg/l
Fe	↗	↘	==	30-180ug /dl
GGT	==	==	↘	9-64U/l
LDH	↗	↘	↘	200-400 UI/l
Mg ²⁺	↘	↗	↗	16-30mg/l
P	==	↗	==	23-47mg/l
PAL	↘	==	↘	40-150U/L
PT	==	==	↘	66-87g/l
TG	↗	S ₂ O ₂	==	0,35-1,5g/l
TGO	↗	==	↘	0-45 UI/l
UREE	==	==	==	0.10-0.50g/l
CA	==	==	==	80-105mg/l
G	==	==	==	0.70-1.10 g/l
TGP	==	==	↘	0-45UI/l

4. Autres interférences**4.1. Influence de l'anticoagulant**

Le processus de coagulation conduit à des modifications des concentrations de nombreux constituants du liquide extracellulaire au-delà de leurs limites maximales acceptables. Les changements sont induits par les mécanismes suivants:

- Augmentation des concentrations de composants plaquettaires dans le sérum par rapport au plasma (potassium, phosphate, magnésium, ASAT, LDH...).
- Diminution de la concentration des constituants dans le sérum à la suite du métabolisme cellulaire et le processus de coagulation (glucose, protéines totales, plaquettes).
- Activation de la lyse cellulaire des érythrocytes et des leucocytes dans le sang non coagulé. (Annexe V)

4.2. Influence des médicaments

De nombreux médicaments influencent fréquemment les résultats d'examens biologiques, soit directement par un mécanisme métabolique, soit indirectement par les interférences qu'ils peuvent provoquer pendant le dosage[52]. (Annexe VI)

4.3. Influence de l'alimentation

Le laboratoire préconise d'être à jeun pour éviter les erreurs liées à une augmentation transitoire de certains métabolites en période postprandiale mais également pour palier à certaines difficultés de dosage liées à la turbidité du sérum [53]. (Annexe VII)

Certains aliments peuvent être responsables d'interférences sur les examens pratiqués exemples : certains pigments tels que le carotène, les produits riches en vanille...

La consommation d'aliments riches en calcium tels que les laitages, les noisettes, les fruits secs, certaines eaux minérales peut largement influencer la mesure de la calciurie. De même pour les aliments d'origine végétale, ils peuvent modifier les concentrations plasmatiques de certains paramètres (urée, acides aminés...) [31]

5. Les normes SFBC

La qualité des analyses de biologie médicale dépend de différents facteurs parmi lesquels le choix de la technique et sa validation jouent un rôle très important. Il appartient donc au biologiste de bien sélectionner ses outils et de justifier objectivement ses décisions comme le rappelle le guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale.

Ce souci ne peut être complètement satisfait en l'absence de référentiels. Les résultats fournis doivent être suffisamment fiables pour ne pas entraîner d'erreur d'interprétation dans le cadre du diagnostic, du pronostic, de la surveillance, la prévention, du dépistage et épidémiologie des maladies.

Le respect des règles d'assurance qualité des laboratoires oblige à procéder à la validation des techniques en préalable à leur utilisation et à le justifier. Il s'agit d'un pré-requis indispensable l'évaluation des performances de la technique suivie de leur validation pour vérifier leur conformité à des normes.

La vérification et validation d'une technique consiste à évaluer les performances du processus analytique (fidélité, justesse, exactitude, domaine de mesure, sensibilité aux interférences, limite de détection), à les quantifier en suivant un protocole opératoire standardisé puis à les juger, par rapport à des critères définis. Une adaptation du protocole proposé par la SFBC en 1986 répond aux exigences de la norme NF EN ISO 15189. Un module est consacré à chaque évaluation, décrivant l'objectif, le protocole opératoire, le matériel, le recueil des résultats, les calculs à effectuer ainsi que l'interprétation des résultats illustrés par un exemple.

Nous avons différents modules à programmer en fonction des stratégies à déployer, le protocole que nous avons adopté est décrit dans le module 7 intitulé évaluation de l'influence de l'hémolyse, de la bilirubine et de la turbidité des échantillons. Ces interférences peuvent être évaluées par surcharge d'un spécimen biologique par un composé dont la présence est susceptible d'entraîner un résultat inexact, soit par excès, soit par défaut. Le protocole se propose d'appréhender de façon quantitative l'influence de certains composés d'origine endogène tels que l'hémoglobine et la bilirubine.

6. Quelques données de la littérature

- Mémoire interférence de l'hémolyse sur la détermination des paramètres de biochimie clinique L. Benchekroun et al montre que :

Le potassium, les triglycérides, la bilirubine totale, la bilirubine directe, l'acide urique, la lactate déshydrogénase (LDH), l'Aspartate aminotransférase (ASAT), l'alanine aminotransférase (ALAT), et les phosphatases alcalines (PAL) étaient positivement influencés par l'hémolyse, alors que le glucose et la créatinine sont influencés négativement. Le calcium, le phosphore, le taux des protides, et la GGT n'ont pas montré de variations significatives.

- Article de l'interférence de l'hémolyse sur le dosage de vingt-deux paramètres biochimiques montre que :

La mesure de l'activité ALAT pour une valeur normale d'ALAT (0,34 μ kat), l'hémolyse interfère de façon positive pour une concentration en hémoglobine de 50 μ mol/L (0,8 g/L) puis de façon négative à partir de 750 μ mol/L (12,1 g/L).

L'hémolyse interfère de façon positive sur la mesure de l'activité ASAT, pour une valeur d'ASAT normale à 0,34 μ kat/L, une augmentation de plus de 10 % de l'activité mesurée est notée avec une concentration en hémoglobine de 7 μ mol/L soit 0,1 g/L. Cette augmentation est proportionnelle au degré d'hémolyse jusqu'à une concentration en hémoglobine de 300 μ mol/L (4,8 g/L), au-delà de cette concentration en hémoglobine un plateau est atteint.

Sur une valeur de LDH à 3 μ kat/L, l'hémolyse interfère de façon positive sur la mesure de l'activité LDH et de façon très importante, ceci même en absence visible d'hémolyse. Une augmentation de plus de 10 % de l'activité mesurée est notée avec une concentration en hémoglobine de 7 μ mol/L soit 0,1 g/L. Cette augmentation est proportionnelle au degré d'hémolyse.

La mesure de l'activité GGT est impactée de façon négative par l'hémolyse uniquement pour des hémolyses importantes correspondant à une hémoglobinémie > 500 μ mol/L (8,1 g/L).

La mesure de l'activité PAL est impactée de façon négative par l'hémolyse, mais uniquement pour une activité PAL normale. En effet pour une activité PAL à 1 μ kat/L, il y a diminution de l'activité mesurée à partir d'une concentration en hémoglobine de 140 μ mol/L (2,3 g/L).

Aucune interférence de l'hémolyse sur la mesure de l'urée n'est observée pour les valeurs normales de 5,6 mmol/L .

Aucune interférence de l'hémolyse sur la mesure du calcium n'est observée pour une valeur normale 2,44 mmol/L.

Aucune interférence de l'hémolyse sur la mesure de l'acide urique n'est observée pour les valeurs normales d'uricémie : 211 et 372 $\mu\text{mol/L}$.

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE I : Matériel et Méthodes

1. Description de l'étude

Nous avons mené une étude prospective à visée analytique qui s'est déroulée sur une période de 5 mois (du mois de décembre 2017 au mois d'avril 2018) au sein du laboratoire de biochimie de l'unité NEDDIR MOHAMED du CHUTIZI OUZOU.

2. Rappel des objectifs

- ❖ Déterminer l'influence de l'hémolyse sur certains paramètres biochimiques (glucose, acide urique, PAL, GGT, urée, bilirubine totale, bilirubine directe, LDH, ASAT, ALAT, Ca²⁺, Na⁺etK⁺)
- ❖ Etablir le sens de l'interférence de l'hémolyse, son importance et à partir de quelle concentration elle apparait.
- ❖ Fournir des recommandations pour minimiser l'hémolyse in-vitro.

3. Population d'étude

Notre étude a été réalisée sur un groupe de 20 patients venus à titre externe au laboratoire de biochimie appartenant à différentes tranches d'âge.

4. Matériel

4.1. Matériel biologique

4.1.1. Critères de recueils

Les pools plasmatiques sont constitués à partir d'aliquotes d'échantillons de patients prélevés sur tubes avec comme anticoagulant l'héparinates de lithium.

Ces échantillons ont été reçus au laboratoire de biochimie accompagnée d'une ordonnance dument remplie.

Les prélèvements ont été enregistrés et étiquetés puis rapidement centrifugés.

Le plasma et le culot globulaire ont été séparés.

Selon la demande du médecin les examens biologiques ont été effectués, puis en fonction des paramètres manquants à notre étude, des examens biologiques complémentaires ont été rajoutés afin de remplir les conditions requises par notre fiche de renseignement (Annexe VIII)

Cette fiche de renseignement comporte

- L'Identité du patient (nom et prénom) ;
- L'Age et le sexe ;
- Le numéro d'identification de l'échantillon ;
- Les paramètres biochimiques à effectuer ;
- Un résumé clinique.
-

4.1.2. Critères d'inclusion et d'exclusion

La sélection a été faite selon des critères d'inclusion et d'exclusion suivants :

4.1.2.1. Critères d'inclusion

- Prélèvements sanguins frais (du jour même) ;
- Age > 18 ans ;
- Plasmas d'aspects clairs ;
- Echantillons provenant de patients externes ;
- Echantillons dont les examens biochimiques sont normaux.

4.1.2.2. Critères d'exclusion

- Plasmas hémolysés, ictériques ou lipémiques ;
- Echantillons sans identifiants ;
- Echantillons coagulés (mauvaise homogénéisation de l'anticoagulant) ;
- Echantillons prélevés sur tubes sans anticoagulants (tubes secs) ;
- Paramètres dont les sérums de contrôles normaux et pathologiques sont en dehors de l'intervalle de confiance.

4.2. Matériel non biologique

- Centrifugeuse ;
- Micropipette de précision 5ml, 10 ml, 50 ml, 100ml, 250 ml, 1000ml ;
- Consommable de laboratoire : embouts, racks, cupules et tube sec ;
- Analyseurs de biochimie : ARCHITECT *ci* 4100 ABBOTT ®, analyseur d'électrolytes 9180 (AVL ROCHE®) et GAZOMETRE ABL 800®.

5. Méthodes

5.1. Paramètres étudiés

Les paramètres ci-dessous ont été choisis fonction de la disponibilité des réactifs :

- Glucose ;
- Urée et acide urique ;
- Ionogramme sanguin ;
- ALAT et ASAT ;
- PAL et GGT ;
- Bilirubine totale et directe ;
- LDH ;
- Calcium ;

5.2. Intérêt clinique des paramètres étudiés

(Annexe XIII)

5.3. Automates utilisés

5.3.1. ARCHITECT *ci* 4100 (ABBOTT ®)

Le système de biochimie ARCHITECT *ci* 4100 est un analyseur de biochimie clinique automatisé qui permet d'effectuer des analyses de sérum et de plasma d'origine humaine, il combine les instruments ARCHITECT *c*4000 et ARCHITECT *i* 1000SR offrant aux laboratoires à plus faible volume ; l'efficacité et la productivité accrues employées par les grands laboratoires. (Figure 15)

L'ARCHITECT *ci* 4100 offre un débit maximal de 900 tests par heure. Il est doté d'une capacité de chargement de 180 échantillons avec 35 positions prioritaires. [54].



Figure15: Architect Ci41000. ABBOTT® [55].

La méthode de dosage utilisée dans notre étude est un dosage photométrique sur Architect ci4100. La méthode photométrique est la technique utilisée sur l'analyseur *c* pour la mesure de l'absorbance de l'échantillon permettant de quantifier la concentration de la substance analysée.

La photométrie est une méthode de mesure de la lumière absorbée par un échantillon. A cet effet, un faisceau lumineux traverse l'échantillon et le système mesure l'intensité lumineuse atteignant un détecteur. La loi de Beer Lambert établit un rapport mathématique entre l'absorbance de la solution et la concentration de l'analyte.

L'absorbance de la solution change avec le temps, à mesure que la réaction progresse. Les mesures sont effectuées soit lorsque le réactif est entièrement consommé et que la réaction atteint une stabilité (dosages en point final), soit lorsque le réactif atteint une cinétique d'ordre zéro (dosage du substrat)[56].

5.3.2. Analyseur d'électrolytes 9180 AVL ROCHE®

L'analyseur d'électrolytes 9180 AVL ROCHE® est un dispositif médical performant qui est conçu pour aider de façon rapide, précise et efficace à réaliser des analyses d'électrolytes directe en laboratoire.(Figure 16)



Figure 16: Analyseur d'électrolyte 9180 AVL ROCHE®[57].

Il fonctionne selon le principe de mesure d'électrode sélective d'ions(ISE) afin de déterminer avec précision les valeurs des électrolytes. L'analyseur compare une valeur de mesure inconnue à une valeur connue pour calculer les valeurs de l'électrolyte du spécimen.

Une membrane sélective d'ions déclenche une réaction déterminée avec l'électrolyte correspondante des spécimens. Cette membrane est un échangeur d'ions qui réagit aux modifications électriques des ions et appelé une modification du potentiel de la membrane ou de la tension de mesure qui s'accumule dans la zone comprise entre l'électrode et le spécimen.

Une chaîne de mesure galvanique à l'intérieur de l'électrode détermine la différence entre les deux valeurs de potentiel des deux côtés de la membrane. (Figure 17)

La différence de concentration en ion entre l'électrolyte interne (concentration fixe) et le spécimen (concentration variable) entraîne l'apparition d'un potentiel électrochimique au niveau de la membrane de l'électrode de mesure. La concentration ionique du spécimen est déterminée et affichée au moyen d'une courbe de calibration [58].

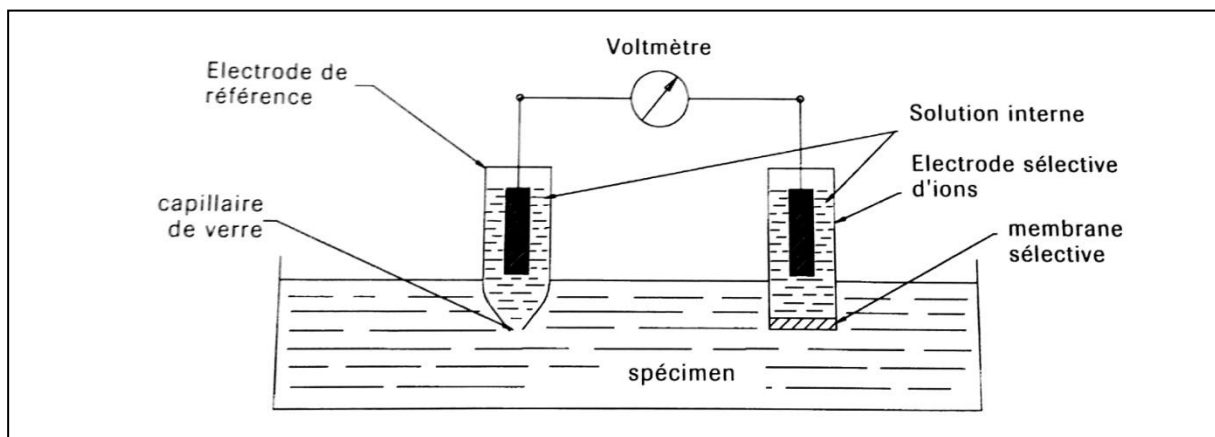


Figure 17 : Principe de mesure de l'AVL ROCHE®.

5.3.3. Gazomètre ABL 800®

Cet analyseur fonctionne avec plusieurs principes

- ❖ Principes de mesure potentiométriques ;
- ❖ Principe de mesure ampérométrique ;
- ❖ Principe de mesure optique : il est conçu pour mesurer la Concentration d'hémoglobine totale . Le système optique est basé sur un spectrophotomètre à 128 longueurs d'onde. Sa plage de mesure est entre 478-672 nm. Le spectrophotomètre est connecté via une fibre optique à un combiné d'hémolyse et à une chambre de mesure [59].



Figure 18 : Gazomètre ABL 800 ®[60].

5.4.Principes de dosage des paramètres analysés par l'Architect ci 4100 (ABBOTT®)

➤ Définition de la linéarité

C'est la capacité d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir une valeur d'information ou des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans l'échantillon.

Les limites de linéarité sont les limites expérimentales de grandeurs entre lesquelles un modèle d'étalonnage linéaire peut être appliqué avec un niveau de confiance connu.

➤ Définitions de la limite de détection

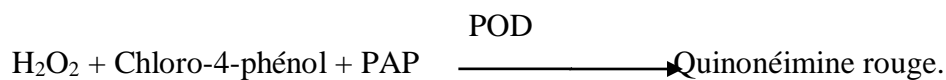
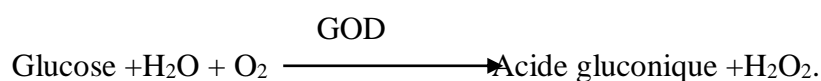
La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée et considérée comme différente de la valeur du blanc, mais non nécessairement quantifiée. [61].

Tableaux 02 Les paramètres étudiés sur l'automate Architect Ci4100®.

Paramètre	Principe	Méthode	Longueur d'onde de mesure	Domaine de linéarité	Limite de détection
<i>Glycémie</i>	Enzymatique Colorimétrique	GOD/POD	500 nm	0.63- 500 mg/dl	0,63 mg/dl
<i>Urée</i>	Enzymatique en UV	Uréase	340 nm 380 nm	7-125 mg/dl	7 mg/dl
<i>Acide Urique</i>	Enzymatique Colorimétrique	Uricase	524 nm 700 nm	0,3-20 mg/dl	0,3mg/dl
<i>Bilirubine Totale</i>	Colorimétrique	DCA (2,4-dichloroaniline)	548 nm	0,1 à 30,0 mg/dl	0,05 mg/d
<i>Bilirubine Directe</i>	Colorimétrique	Nitrite de sodium	444 nm	0-35 mg/dl	0,01 mg/dl
<i>ASAT</i>	Enzymatique	NADH	340 nm 380 nm	3-350 U/L	3,0 U/L
<i>ALAT</i>	Enzymatique	NADH	340 nm 380 nm	1-350 U/L	1,0 U/L
<i>γGT</i>	Enzymatique	L-G-glutamyl-p-nitroanilide	404 nm 524 nm	4-320 U/L	4 U/L
<i>LDH</i>	Enzymatique en UV	Pyruvate au lactate (NAD ⁺)	340 nm	1500UI/l	20U/l
<i>PAL</i>	Enzymatique en UV	p-nitrophényl Phosphate	405 nm	0-1 200 U/L.	5,0 U/L

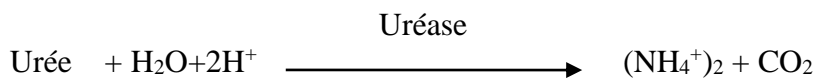
➤ Glucose

Le glucose est dosé par la méthode de Trinder : le glucose est oxydé par la GOD en acide gluconique et H₂O₂ qui réagit en présence de POD avec le chloro-4-phénol et le PAP pour former une quinonéimine rouge. L'absorbance du complexe coloré est proportionnelle à la concentration en glucose[62].

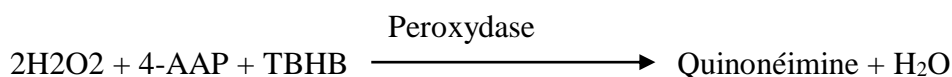
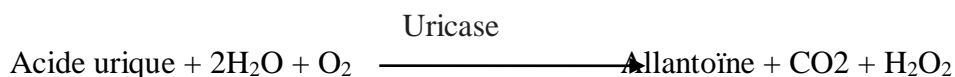


➤ **Urée**

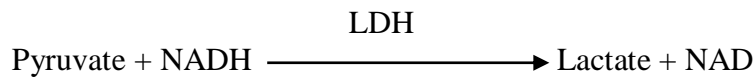
L'urée contenue dans l'échantillon est hydrolysée par l'uréase en ammoniac et en dioxyde de carbone. La deuxième réaction, catalysée par le glutamate déshydrogénase (GLD) convertit l'ammoniac et α -cétoglutarate en glutamate et en eau avec oxydation simultanée du (NADH) en (NAD). Deux moles de NADH sont oxydées pour chaque mole d'urée présente. Le taux initial de diminution de l'absorbance à 340 nm est proportionnel à la concentration d'urée dans l'échantillon [63].

➤ **Acide urique**

L'acide urique est oxydé en allantoïne par l'uricase avec la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le H_2O_2 réagit avec 4-aminoantipyrine (4-AAP) et acide 2,4,4,6-tribromo-3-hydroxybenzoïque (TBHB) en présence de peroxydase pour donner un colorant quinoneimine. La variation de l'absorbance à 548 nm qui en résulte est proportionnelle à la concentration d'acide urique dans l'échantillon[64].

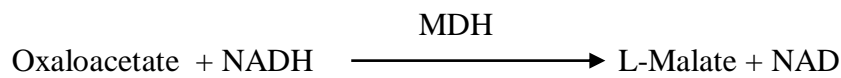
➤ **ALAT Alanine aminotransférase**

L'ALAT présente dans l'échantillon, catalyse le transfert du groupe amine de la L-Alanine vers l' α -cétoglutarate formant ainsi Pyruvate et L-Glutamate. Pyruvate en présence de NADH et de lactate déshydrogénase (LDH) est réduit en L-lactate. Dans cette réaction, le NADH est oxydé en NAD. La réaction est surveillée en mesurant le taux de diminution de l'absorbance à 340 nm en raison de l'oxydation de NADH en NAD[65].



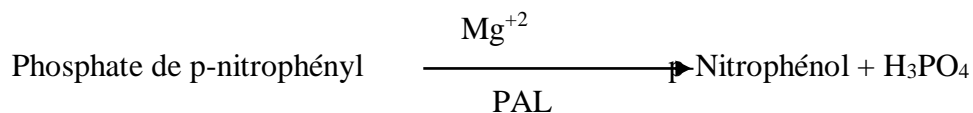
➤ **ASAT Aspartate aminotransférase**

ASAT présent dans l'échantillon, catalyse le transfert de l' amino groupe de L-aspartate à α -cétoglutarate, formant l'oxaloacétate et L-glutamate. Oxaloacétate, en présence de NADH et de malate la déshydrogénase (MDH), est réduite en L-malate, et le NADH oxydé en NAD. L'activité de l'ASAT est surveillée en mesurant le taux de la diminution de l'absorbance à 340 nm due à l'oxydation du NADH en NAD[66].



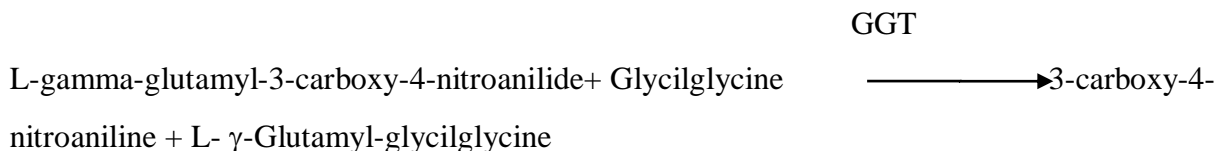
➤ **PAL phosphatase alcaline**

La phosphatase alcaline dans l'échantillon catalyse l'hydrolyse du phosphate de p-nitrophényle (p-NPP) incolore pour donner du p-nitrophénol et du phosphate. Au pH de l'essai (alcalin), le p-nitrophénol est sous forme de phénoxyde jaune. Le taux d'augmentation de son absorbance à 405 nm est directement proportionnel à l'activité de la phosphatase alcaline dans l'échantillon.[67].



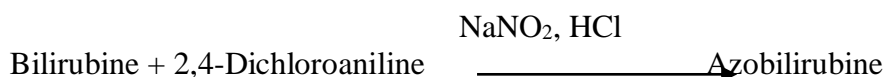
➤ **GGT gamma glutamyl transférase**

GGT catalyse le transfert du groupe gamma-glutamyle à partir du substrat donneur (L-gamma glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide) au dipeptide accepteur glycyglycine pour obtenir de la 3-carboxy-4-nitroaniline. Le taux de l'augmentation de l'absorbance à 412 nm (416 nm pour c4000 et c16000) est directement proportionnel à la GGT de l'échantillon. [68].



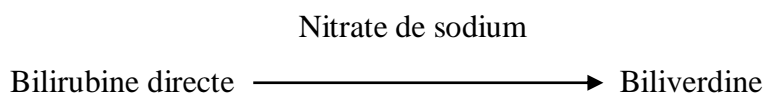
➤ **Bilirubine totale**

Les méthodes traditionnelles de mesure de la bilirubine sont basées sur la réaction de la bilirubine avec un réactif diazo (2,4-dichloroaniline, NaNO₂, HCl) pour former le composé coloré azobilirubine. La réaction diazoïque peut être accélérée par l'ajout de divers produits chimiques. La bilirubine totale (conjuguée et non conjuguée) est couplée à un réactif diazoïque en présence d'un surfactant pour former l'azobilirubine. La réaction diazoïque est accélérée par l'ajout d'un surfactant comme agent solubilisant. L'augmentation de l'absorbance à 548 nm due à l'azobilirubine est directement proportionnelle à la concentration totale de bilirubine[69].



➤ **Bilirubine directe**

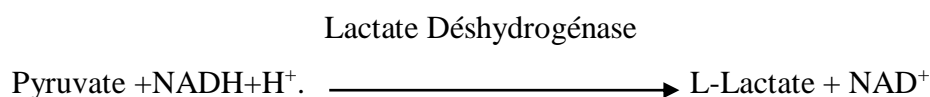
La bilirubine directe est oxydée en biliverdine par le nitrite de sodium, ce qui entraîne une diminution de l'absorbance à 444 nm. Il existe une relation linéaire entre la diminution de l'absorbance et de la concentration de bilirubine directe dans l'échantillon[70].



➤ LDH

La lactate déshydrogénase est une enzyme de transfert de l'hydrogène qui catalyse l'oxydation du pyruvate en lactate avec la médiation du NAD^+ en tant qu'un accepteur d'hydrogène. La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD^+ est directement proportionnelle à l'activité de la LDH dans le spécimen, elle est mesurée à 340 nm [71].

Méthode de Henry et al (conforme aux recommandations SFBC)

**6. Protocole expérimental****6.1. Contrôle de qualité**

Avant d'effectuer les différents dosages pour notre étude, des sérums de contrôle normaux et pathologiques ont été lancés puis les résultats ont été comparés avec l'intervalle de confiance fourni avec les kits de sérums de contrôles.

En cas de non-conformité, de nouveaux sérums de contrôle ont été lancés. Dans le cas où les résultats étaient toujours hors normes une nouvelle calibration a été faite et des sérums de contrôles normaux et pathologiques ont été lancés à nouveau.

La quasi-totalité des paramètres de notre étude ont répondu à ces conditions, sauf le calcium qui malgré toutes les mesures entreprises, les résultats restaient en dehors de l'intervalle de confiance probablement à cause de la qualité de l'eau. De ce fait nous n'avons pas étudié l'impact de l'hémolyse sur le dosage de la calcémie malgré la disponibilité des réactifs.

6.2. Préparation du pool de plasmas

Le pool plasmatique est constitué à partir des d'échantillons de patients reçus au laboratoire, qui sont choisis selon les critères cités ci-dessus. Le plasma de 20 patients est recueilli et mélangé pour obtenir un pool homogène.

6.3. Préparation de l'hémolysât

A partir des échantillons sanguins prélevés sur des tubes héparinés choisis selon les critères cités précédemment au laboratoire de biochimie, on prend le culot globulaire après

centrifugation puis on procède a trois lavage des hématies par le sérum physiologique NaCl 0.9% afin d'éliminer le reste du plasma et du buffycote (couche leuco-plaquettaire)

Les hématies lavées sont ensuite lysées par choc osmotique par addition d'eau distillée volume a volume, une centrifugation a 4000 g pendant 20 min qui permet d'éliminer les débris cellulaires.

La concentration d'hémoglobine est mesurée sur l'hémolysât en utilisant un gazomètre ABL 800, la concentration obtenue étant de 45g/l (2.7mmol/l). (Annexe IX)

La méthode de surcharge en Hb utilisée consiste a charger notre spécimen contenant l'analyte étudié (pool) avec des dilutions l'hémolysât variant de 0à 3.6g/l soit de 0 à 216umol/l selon le tableau ci-dessous, le même pool étant analysé en deux fois.(Tableau 03)

Tableau 03: Tableau récapitulatif du protocole expérimental.

Tube n°	1	2	3	4	5	6	7
Pool (µl)	900	900	900	900	900	900	900
Hémolysât(µl)	0	5	10	20	40	60	80
NaCl 150 mmol/l (µl)	100	950	90	80	60	40	20
Taux de surcharge en hémoglobine (g/l)	0	0.22	0.45	0.9	1.8	2.7	3.6
Taux de surcharge en hémoglobine (µmol/l)	0	6.6	27	54	108	117	216

7. Analyses statistiques

Les données recueillies ont été saisies sur Windows7, dans les logiciels WORD et EXCEL version 2007.

EXCEL : pour l'analyse descriptive et courbe de corrélation.

CHAPITRE II : Résultats

1. Présentation des résultats – études statistiques

Les résultats collectés lors de notre étude ont été analysés puis rapportés sur des tableaux et des graphes effectués sur Excel.

Présentation des données

Nous avons calculé pour chacun des paramètres le rapport de concentration Y/X, défini comme étant le rapport de la concentration mesurée [plasma + hémolysât] (Y) sur la concentration mesurée [plasma + NaCl] (X).

$$\frac{Y}{X} = \frac{[\text{plasma} + \text{hémolysât}]}{[\text{plasma} + \text{NaCl}]}$$

Ce rapport est représenté en ordonnées sur les graphiques tandis que les abscisses représentent les concentrations en hémoglobine allant de 0 à 3.6 g/l.

Notre critère d'acceptabilité est représenté sur le graphique par les barres horizontales (plus ou moins 10 % soit Y/X compris entre (0,9 et 1,1)).

Tableaux 04 : Données du fournisseur pour chaque paramètre [60-69].

Paramètre	Concentration d'hémoglobine g/l	la cible	% d'observation de la cible
Glucose	>1	/	/
ASAT	0.62 1.25	64.5 64.5	105.7 111.6
ALAT	>5	/	/
PAL	7.5 10.0	150.8 150.8	95.3 94.3
Bilirubine D	0.31 5	0.4	-0.1 -0.2
Bilirubine T	0.16 2.5	1.1	-0.2 -3.4
GGT	2.5 5.0	42.6 42.6	91.6 82.6
Urée	10.0 20.0	19.8 19.8	96.5 97.4
Acide urique	16	5	120.1
LDH	Toute concentration	/	/

2. Résultats

2.1. Glucose

Tableau 05 : Les résultats du glucose obtenus après ajout de l' hémolysât.

HB g/l	0	0,22	0,45	0,9	1,8	2,7	3,6
[glucose] g/l	0,72	0,73	0,73	0,72	0,755	0,725	0,72
Rapport	1,00	1,01	1,01	1,00	1,05	1,01	1,00
différence	0	0,01	0,01	0	0,035	0,005	0

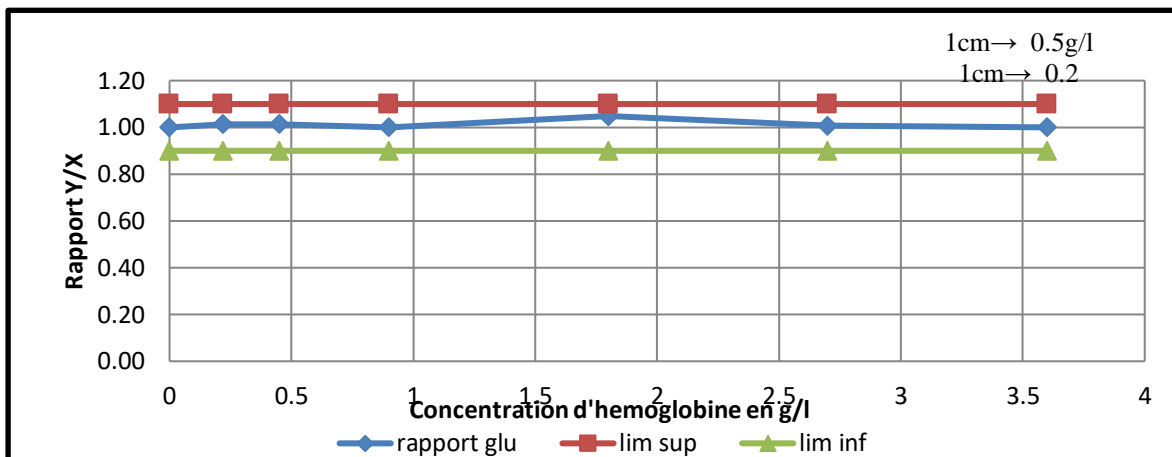


Figure 19 : Représentation graphique du rapport de la glycémie en fonction des concentrations d'hémoglobine.

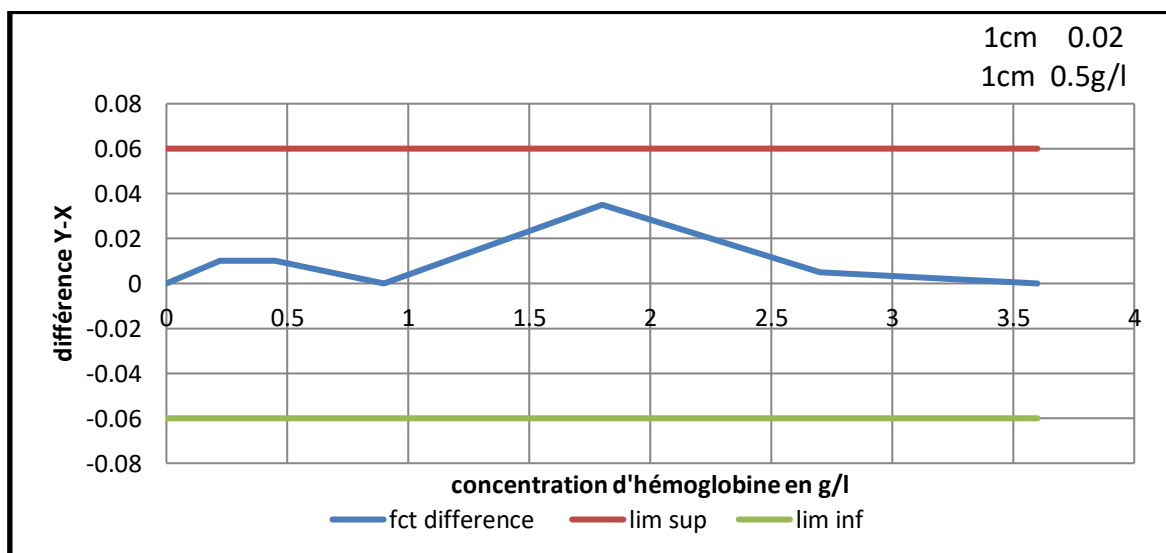


Figure 20 : Représentation graphique de différence de la glycémie en fonction des concentrations d'hémoglobine.

Interprétation

Selon les deux graphes de rapport et de différence, aucune interférence de l'hémolyse pour les valeurs étudiées de 0g/l à 3.6g/l soit de 0 à 216 μ mol/l d'hémoglobine sur la mesure de la glycémie (méthode à la glucose oxydase) n'est observée pour les valeurs normales de glycémie (0.72g/l).

2.2.Acide urique

Tableau 06 : Les résultats de l'acide urique obtenus après ajout de l'hémolysât.

HB g/l	0	0,22	0,45	0,9	1,8	2,7	3,6
[Acide urique]mg/l	47,5	48	48	46	48,5	46	46
Rapport	1,000	1,011	1,011	0,968	1,021	0,968	0,968
différence	0	0,5	0,5	-1,5	1	-1,5	-1,5

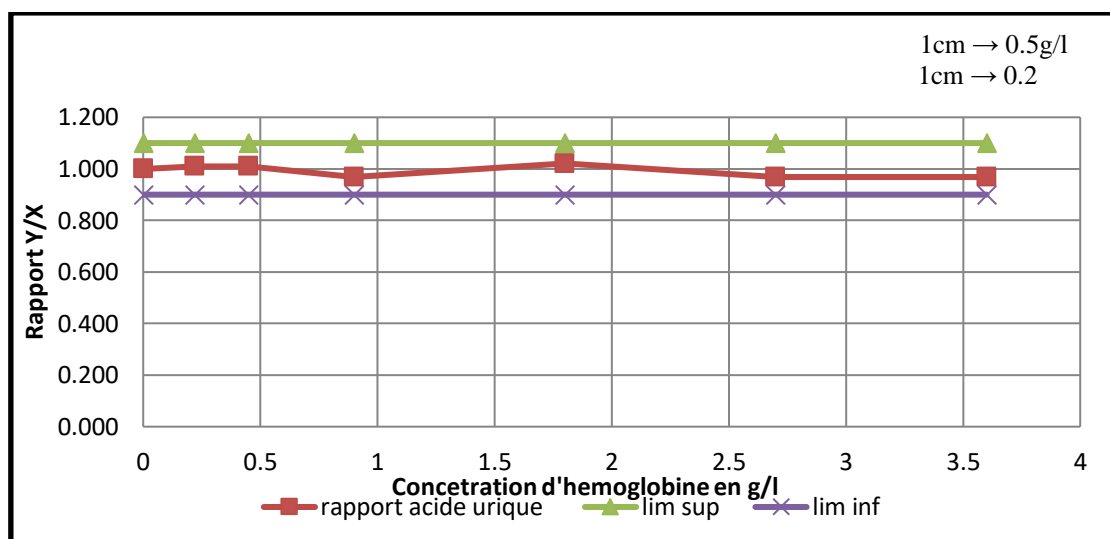


Figure 22 : Représentation graphique du rapport de l'acide urique en fonction des concentrations d'hémoglobine.

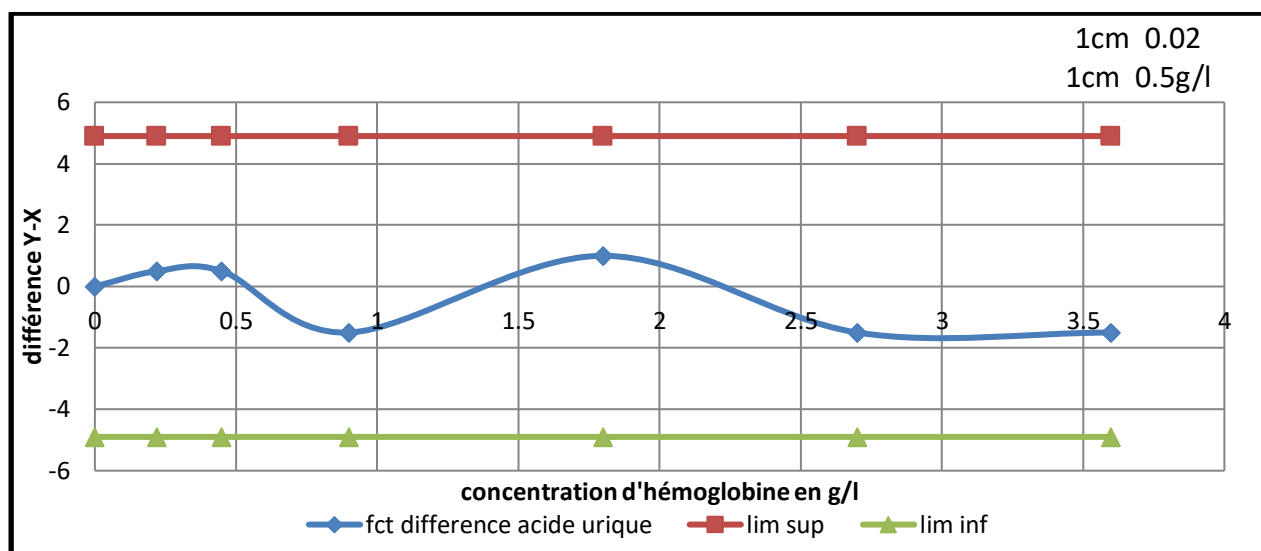


Figure 21 : Représentation graphique de différence de l'acide urique en fonction des concentrations d'hémoglobine

Interprétation

Selon les deux graphes de rapport et de différence, aucune interférence de l'hémolyse pour les valeurs étudiées de 0g/l à 3.6g/l soit de 0 à 216 μ mol/l d'hémoglobine sur la mesure de l'acide urique (méthode à l'uricase) n'est observée pour les valeurs normales d'uricémie (47.5mg/l).

2.3.Urée

Tableau 07: Les résultats de l'urée obtenus après ajout de l'hémolysât.

HB g/l	0	0,22	0,45	0,9	1,8	2,7	3,6
[urée] g/l	0,23	0,225	0,24	0,225	0,245	0,235	0,235
Rapport	1,000	0,978	1,043	0,978	1,065	1,022	1,022
Différence	0	-0,005	0,01	-0,005	0,015	0,005	0,005

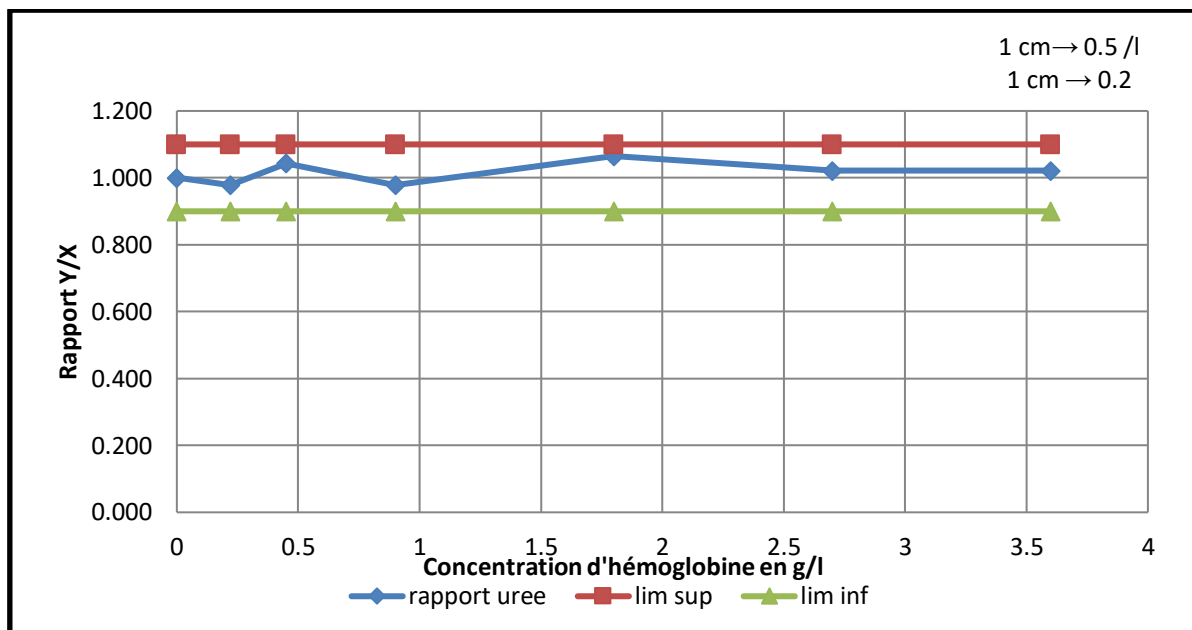


Figure 23 : Représentation graphique du rapport de l'urée en fonction des concentrations d'hémoglobine.

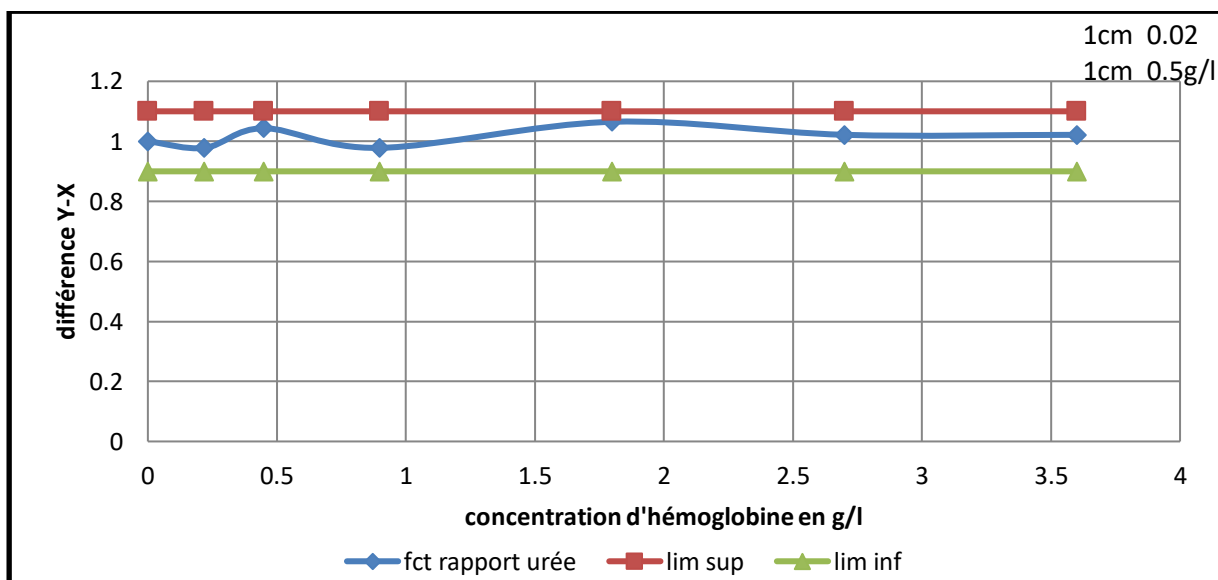


Figure 24 : Représentation graphique de différence de l'urée en fonction des concentrations d'hémoglobine

Interprétation

Selon les deux graphes de rapport et de différence, aucune interférence de l'hémolyse pour les valeurs étudiées de 0g/l à 3.6g/l soit de 0 à 216 $\mu\text{mol/l}$ d'hémoglobine, sur la mesure de l'urée (méthode à l'uréase) n'est observée pour les valeurs normales d'urémie de 0.23g/l.

2.4.ASAT

Tableau 08 : Les résultats des ASAT obtenus après ajout de l'hémolysât.

HB g/l	0	0,22	0,45	0,9	1,8	2,7	3,6
[ASAT] UI/L	33	36,5	39	42	53	59	67
RAPPORT	1,000	1,106	1,182	1,273	1,606	1,788	2,030
Différence	0	3,5	6	42	20	26	67

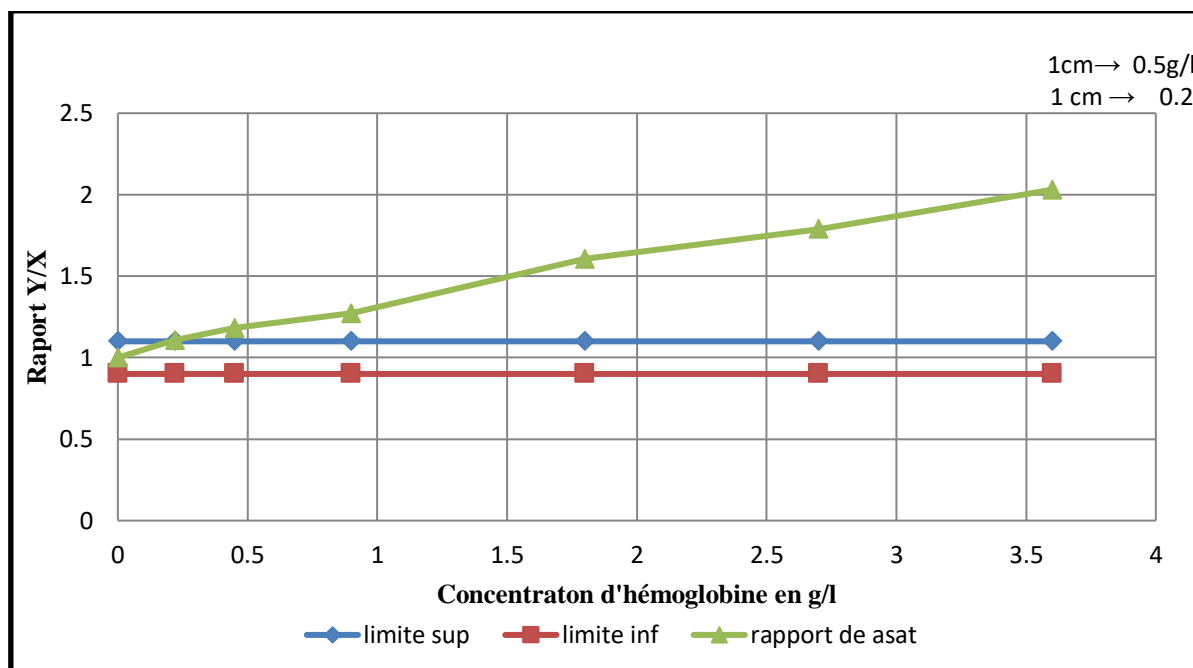


Figure 25 : Représentation graphique du rapport des ASAT en fonction des concentrations d'hémoglobine.

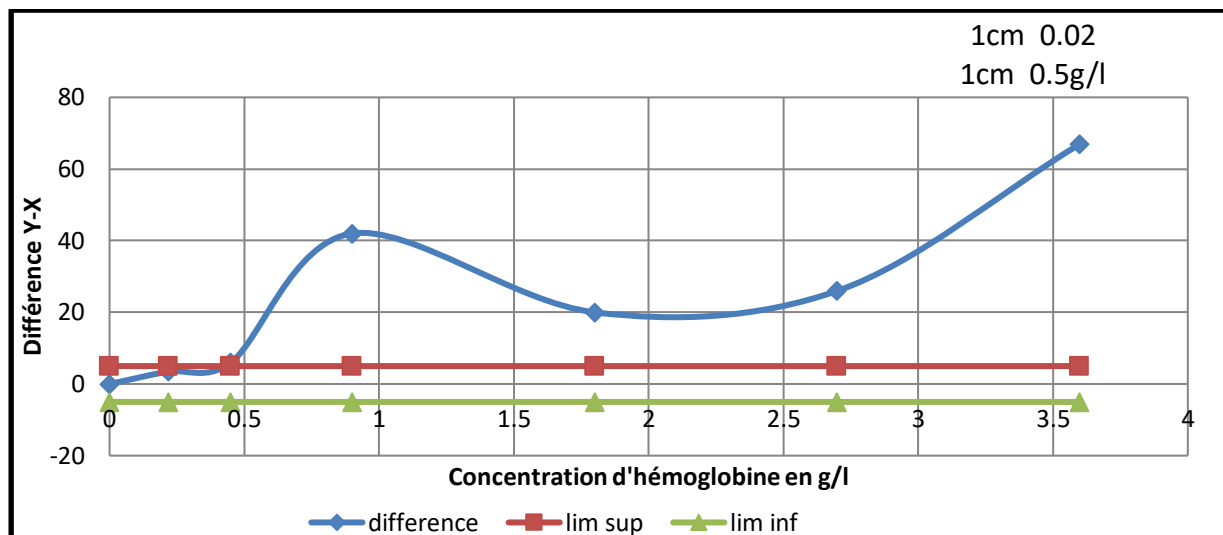


Figure 26 : Représentation graphique de différence des ASAT en fonction des concentrations d'hémoglobine.

Interprétation

Selon les deux graphes de rapport et de différence, l'hémolyse interfère de façon positive sur la mesure de l'activité des ASAT (cinétique enzymatique en UV)

Pour une valeur d'ASAT normale à 33 UI/L, une augmentation de plus de 10% de l'activité mesurée est notée avec une concentration en hémoglobine de 0,2 g/L, donc bien avant le seuil visuel de détection.

Cette augmentation est proportionnelle aux concentrations d'hémoglobine de 0 à 3,6 g/l.

2.5.ALAT

Tableau 09 : Les résultats des ALAT obtenus après ajout de l'hémolysât.

HB g/l	0	0,22	0,45	0,9	1,8	2,7	3,6
[ALAT] UI/L	25	26,5	27	27	29	28,5	30
Rapport	1,000	1,060	1,080	1,080	1,160	1,140	1,200
différence	0	0,5	0,5	-1,5	1	-1,5	-1,5

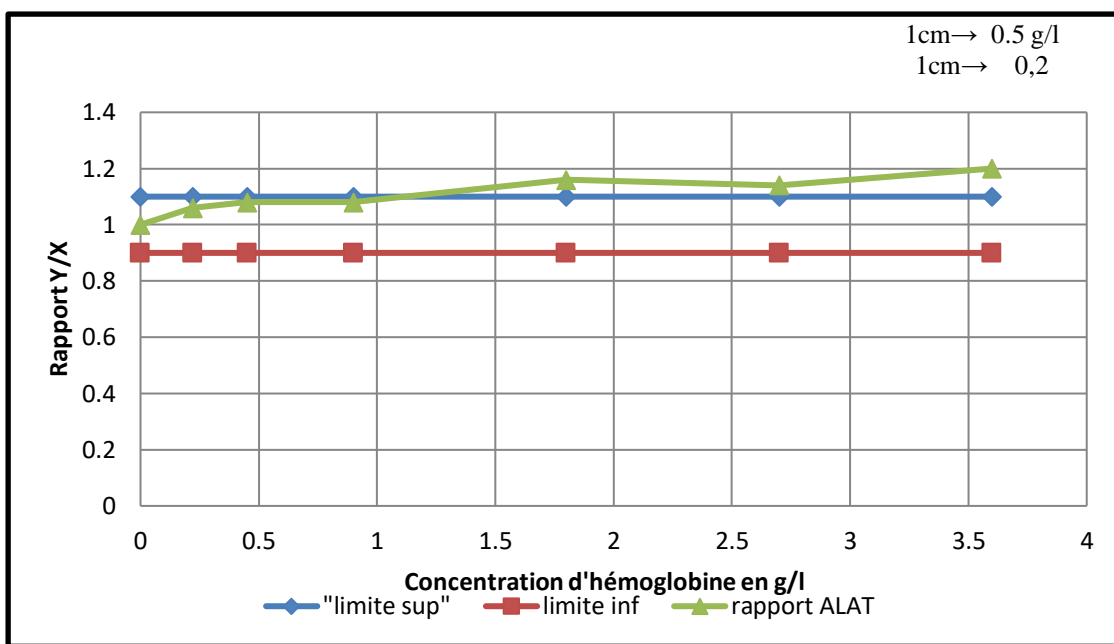


Figure 27 : Représentation graphique du rapport des ALAT en fonction des concentrations d'hémoglobine.

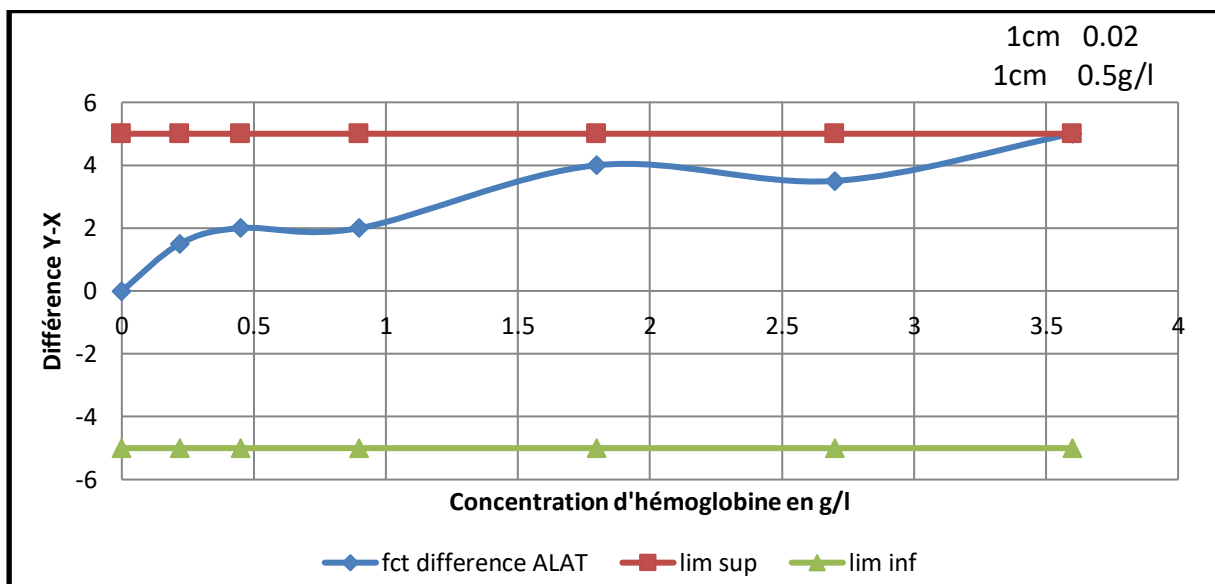


Figure 28 : Représentation graphique de différence des ALAT en fonction des concentrations d'hémoglobine

Interprétation

Selon le graphe du rapport l'hémolyse interfère de façon positive sur la mesure de l'activité des ALAT (cinétique enzymatique en UV)

Pour une valeur d'ALAT normale à 25UI/L, une augmentation de plus de 10% de l'activité mesurée est notée avec une concentration en hémoglobine de 1.1 g/L. Cette augmentation est proportionnelle à la concentration d'hémoglobine de 0 à 3.6 g/l, tandis que le graphe de différence montre une absence d'interférence significative avec tendance à la hausse à partir d'une concentration de 3.6 g/l d'hémoglobine.

2.6.GGT

Tableau 10: Les résultats de la GGT obtenus après ajout de l'hémolysât.

HB g/l	0	0,22	0,45	0,9	1,8	2,7	3,6
[GGT]U/L	60,5	61,5	61,5	59,5	61,5	58	57,5
Rapport	1,000	1,017	1,017	0,983	1,017	0,959	0,950
différence	0	1	1	-1	1	-2,5	-3

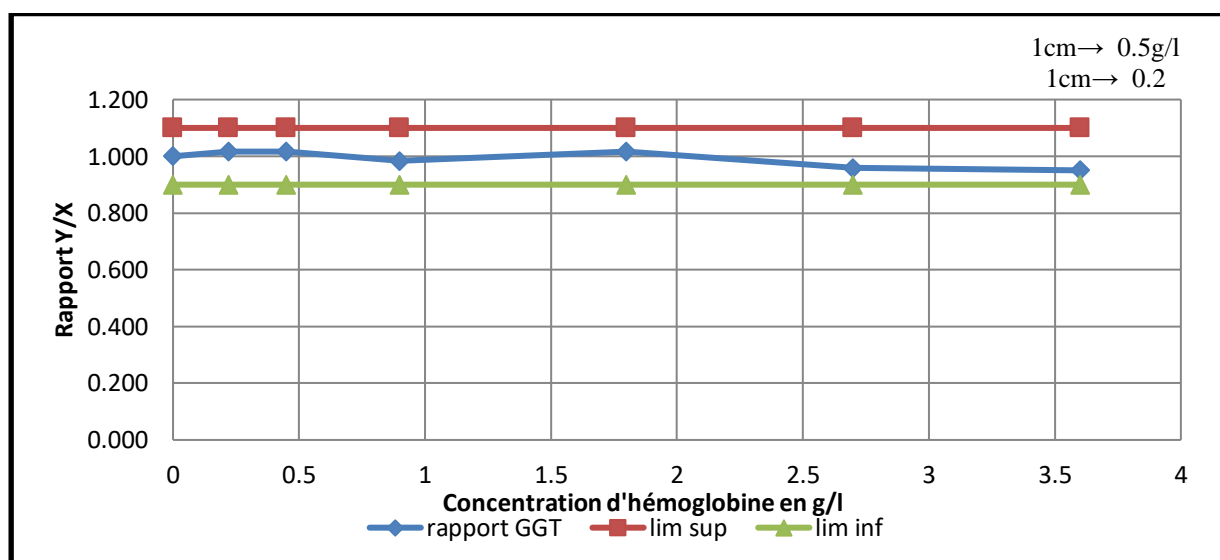


Figure 29: Représentation graphique du rapport de la GGT en fonction des concentrations d'hémoglobine.

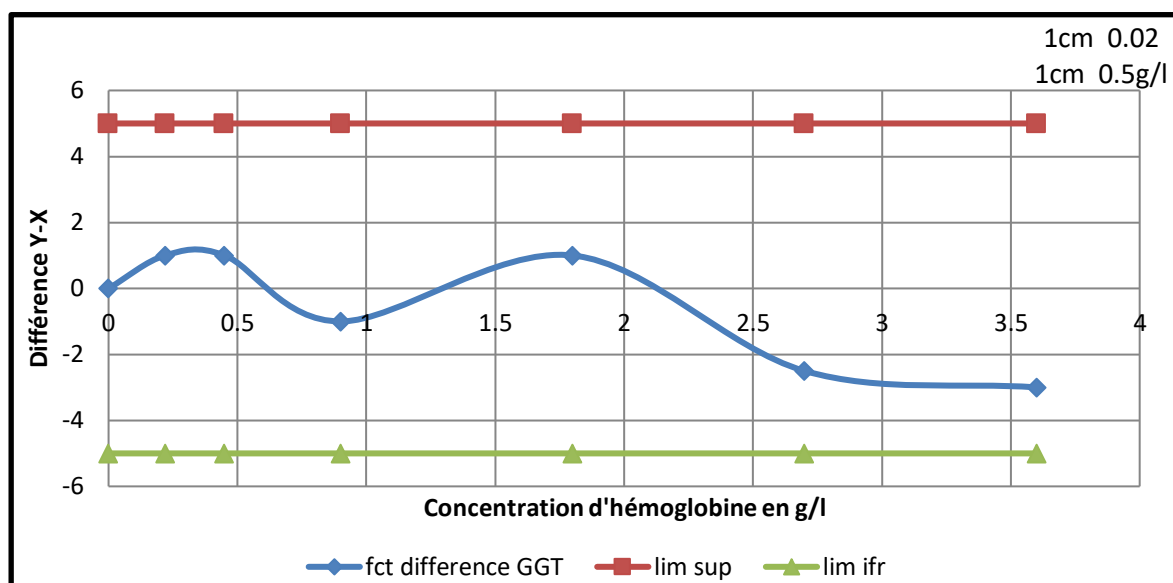


Figure 30: Représentation graphique de différence de la GGT en fonction des concentrations d'hémoglobine.

Interprétation

Selon les deux graphes du rapport et de différence, Pour les concentrations étudiées de 0 g/l à 3.6g/l soit de 0 à 216 $\mu\text{mol/l}$ d'hémoglobine, la GGT (méthode enzymatique) n'est pas impacté par l'hémolyse pour une valeur normale de (60.5U/L).

Cependant, nous constatons une tendance vers la baisse, cela pourrait sous-entendre que si nous avons travaillé avec des concentrations encore plus élevées en hémoglobine, l'hémolyse aurait pu avoir un impact négatif sur nos résultats.

2.7.PAL

Tableau 11 : Les résultats de la PAL obtenus après ajout de l' hémolysât.

HB g/l	0	0,22	0,45	0,9	1,8	2,7	3,6
[PAL] UI/L	81	86,5	86	86	89	88	88
Rapport	1,000	1,068	1,062	1,062	1,099	1,086	1,086
différence	0	5,5	5	5	8	7	7

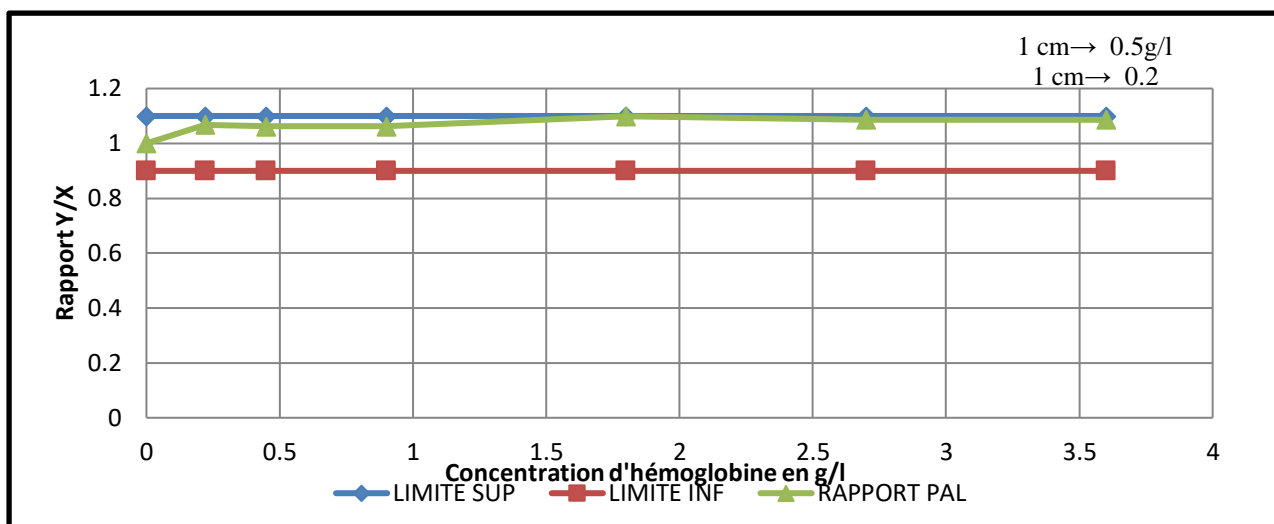


Figure 31: Représentation graphique du rapport de la PAL en fonction des concentrations d'hémoglobine.

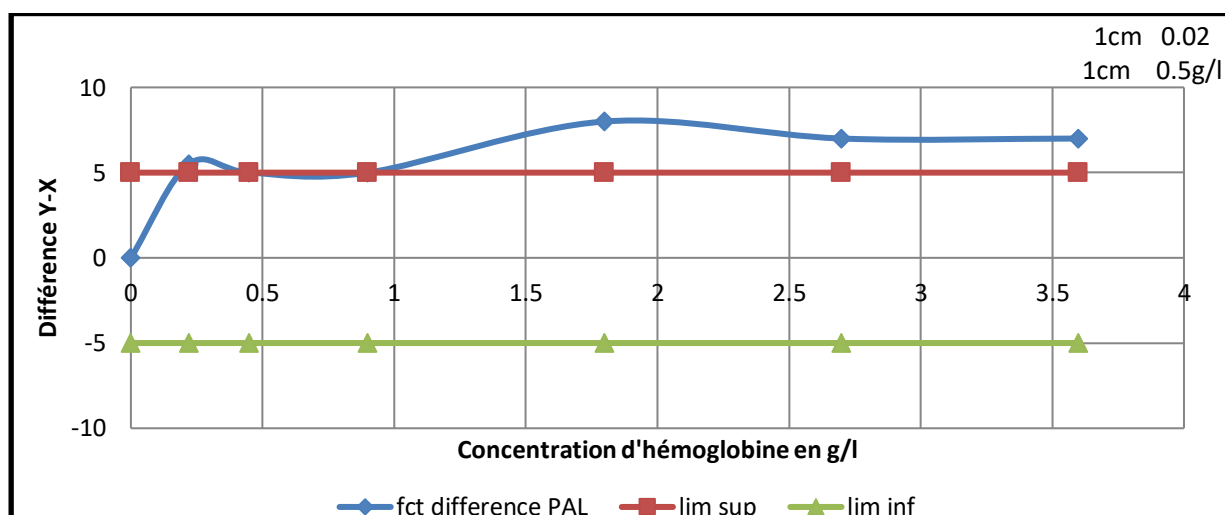


Figure 32 : Représentation graphique de la différence de la PAL en fonction des concentrations d'hémoglobine

Interprétation

Pour le graphe du rapport Aucune interférence significative n'est observée sur la mesure de l'activité PAL (méthode enzymatique) pour la valeur normale de 81UI/L sur les concentrations d'hémoglobines de 0 à 3.6 g/l soit de 0 à 216 $\mu\text{mol/l}$.

Cependant, nous constatons une tendance vers la hausse, sans pour autant dépasser la limite supérieure. Cela pourrait sous-entendre que si nous avions travaillé avec des concentrations encore plus élevées en hémoglobine, l'hémolyse aurait pu avoir un impact positif sur nos

résultats. Tandis que le graphe de différence montre une influence positive à partir d'une concentration de 0.9g/l d'hémoglobine.

2.8. Bilirubine totale

Tableau 12 : Les résultats de la Bilirubine totale obtenus après ajout de l'hémolysât.

HB g/l	0	0,22	0,45	0,9	1,8	2,7	3,6
[Bilirubine Totale] mg/l	7	7	7	7	7	6	6
Rapport	1	1	1	1	1	0,5	0,5
Différence	0	0	0	0	0	-1	-2

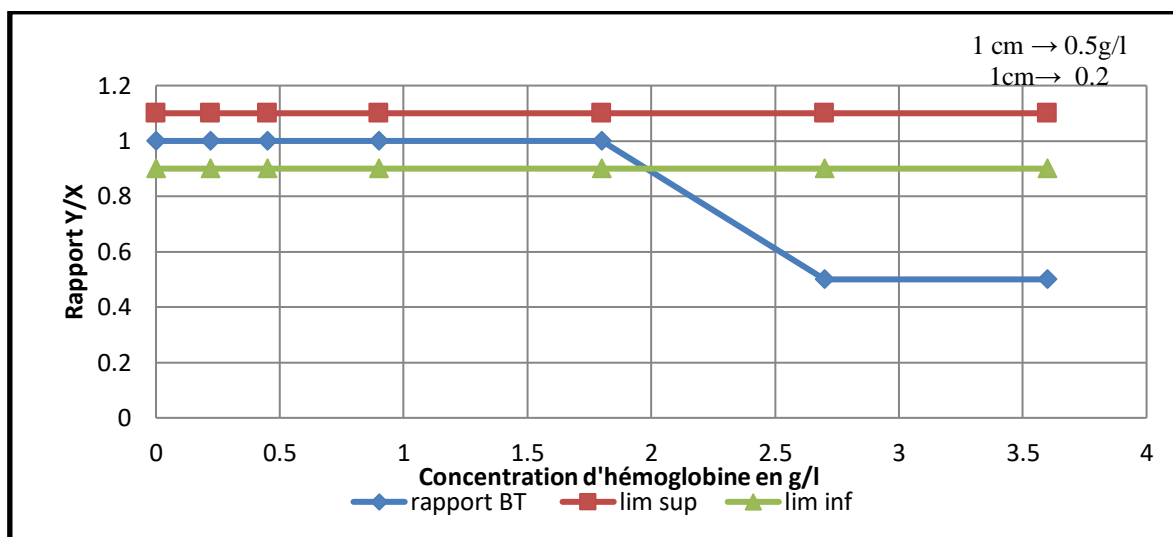


Figure 33 : Représentation graphique du rapport de la bilirubine totale en fonction des concentrations d'hémoglobine.

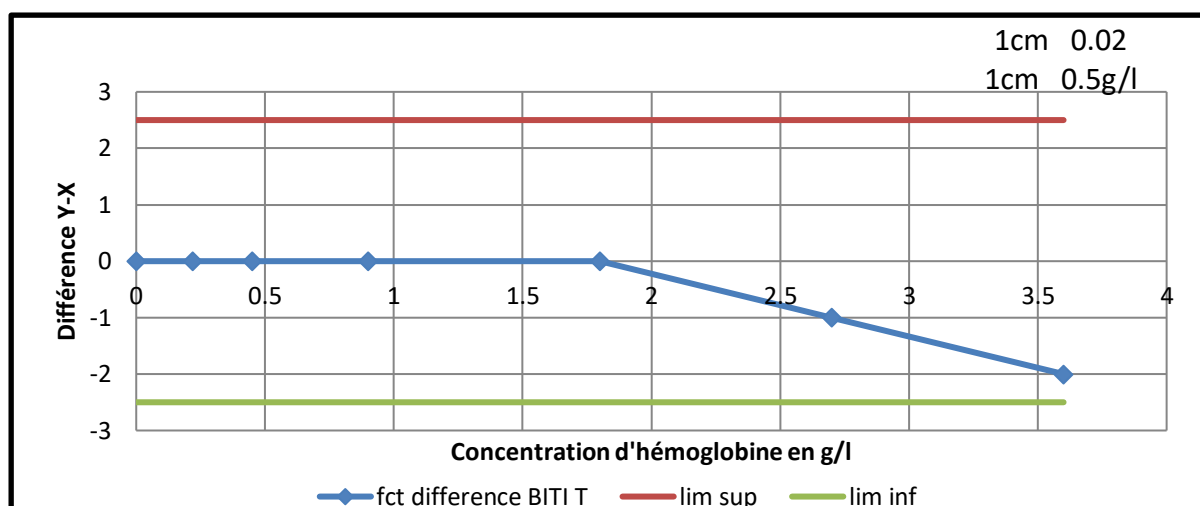


Figure 34 : Représentation graphique de différence de la bilirubine totale en fonction des concentrations d'hémoglobine

Interprétation

Le graphe du rapport montre que pour une valeur normale de bilirubine totale de 7 mg/l, l'hémolyse interfère de façon négative à partir d'une concentration de 1,8 g/l d'hémoglobine (méthode colorimétrique).

Cette diminution est proportionnelle à la concentration d'hémoglobine de 1,8 à 2,7g/l. puis elle se stabilise à partir de 2,7g/l. Tandis que le graphe de différence ne montre aucune interférence significative.

2.9. Bilirubine directe

Tableau 13 : Les résultats de la Bilirubine directe obtenus après ajout de l'hémolysât.

HB g/l	0	0,22	0,45	0,9	1,8	2,7	3,6
[Bilirubine Directe] mg/l	2	2	2	2	1	1	1
RAPPORT	1	1	1	1	0,5	0,5	0,5
différence	0	0	0	0	-1	-1	-1

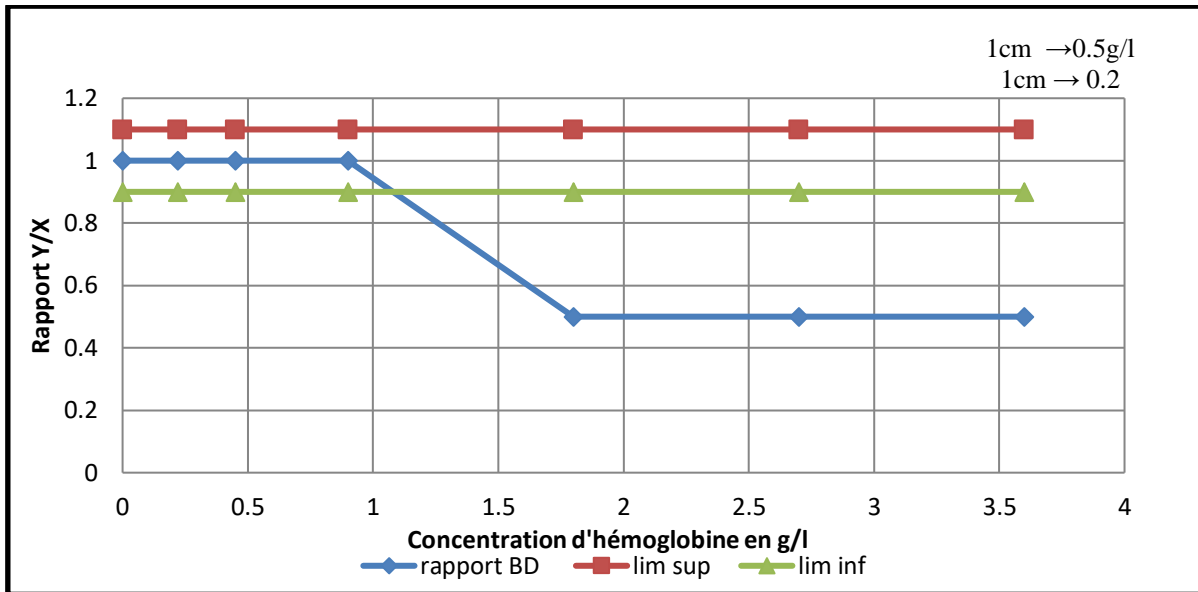


Figure 35: Représentation graphique du rapport de la bilirubine directe en fonction des concentrations d'hémoglobine.

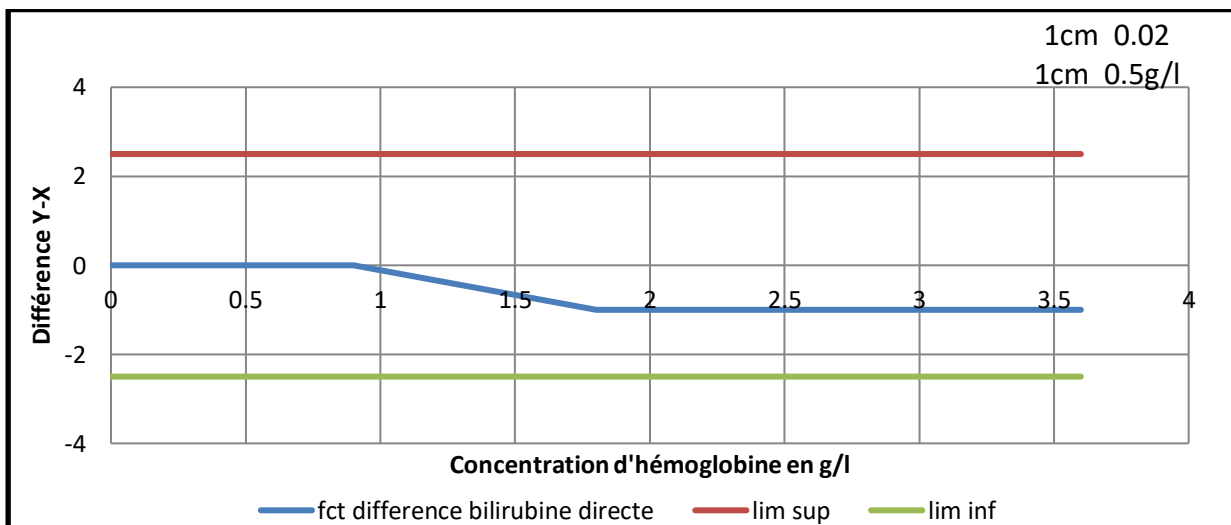


Figure 36: Représentation graphique de la différence de la bilirubine totale en fonction des concentrations d'hémoglobine.

Interprétation

Pour une valeur normale de bilirubine directe de 2 mg/l, l'hémolyse interfère de façon négative à partir d'une concentration de 0.9 g/l d'hémoglobine (méthode colorimétrique)

Cette diminution est inversement proportionnelle à la concentration d'hémoglobine de 0.9 à 1.8g/l. puis elle se stabilise au de-là de 1.8g/l. Tandis que le graphe de différence ne montre aucune interférence significative.

2.10. LDH

Tableau 14 : Les résultats de l'LDH obtenus après ajout de l'hémolysât.

HB g/l	0	0,22	0,45	0,9	1,8	2,7	3,6
[LDH] UI/L	504	569	582,3	598	623,5	641	673
Rapport	1,000	1,129	1,155	1,187	1,237	1,272	1,335
Différence	0	65	78.3	94	119.5	137	169

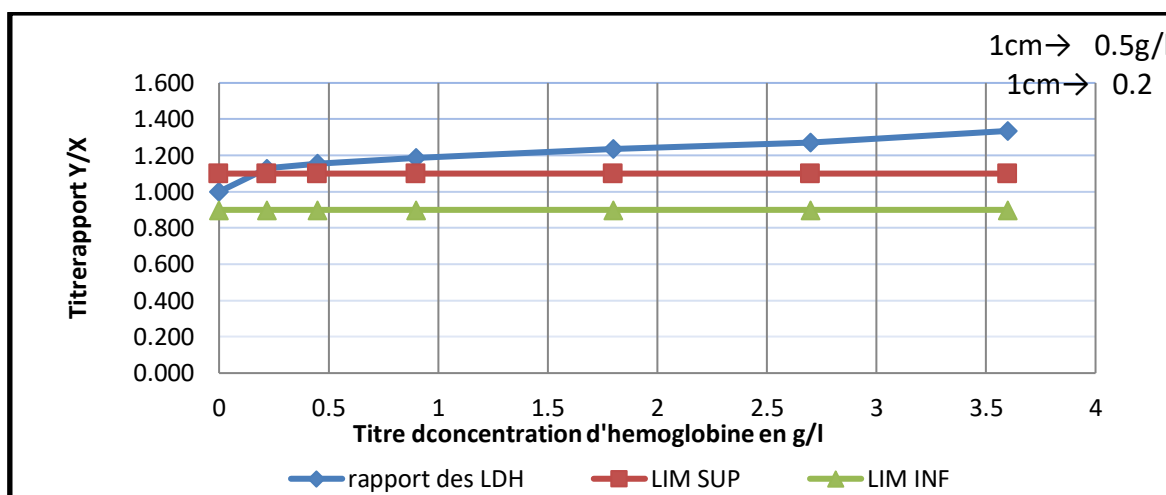


Figure 37 : Représentation graphique du rapport de l'LDH en fonction des concentrations d'hémoglobine.

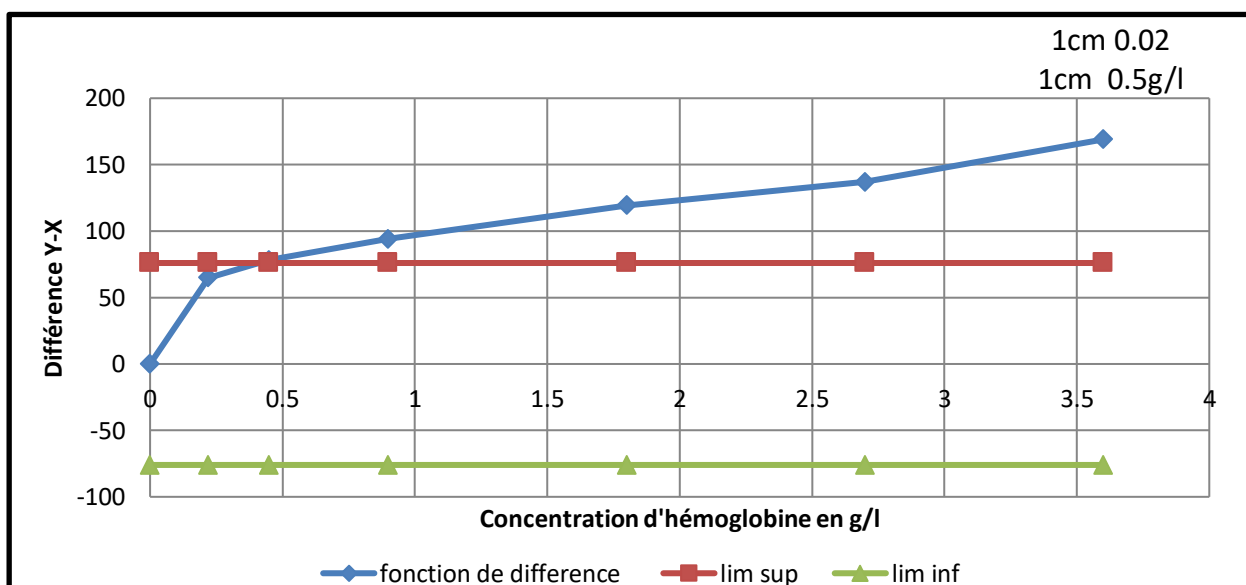


Figure 38 : Représentation graphique de différence de la LDH en fonction des concentrations d'hémoglobine

Interprétation

Pour les deux graphes du rapport et de différence, l'hémolyse interfère de façon positive sur la mesure de l'activité LDH (méthode enzymatique en UV) sur une valeur de LDH à 504 UI/L, l'augmentation de plus de 10% de l'activité mesurée est notée avec une concentration de 0.2 g/l en hémoglobine, donc bien avant le seuil visuel de détection.

2.11. Potassium

Tableau 15 : Les résultats du Potassium obtenus après ajout de l'hémolysât.

HB g/l	0	0,22	0,45	0,9	1,8	2,7	3,6
[K+]mmol/l	4,55	4,6	4,85	4,95	5,7	5,8	6,25
Rapport	1,000	1,011	1,066	1,088	1,253	1,275	1,374
Différence	0	0,05	0,3	0,4	1,15	1,25	1,7

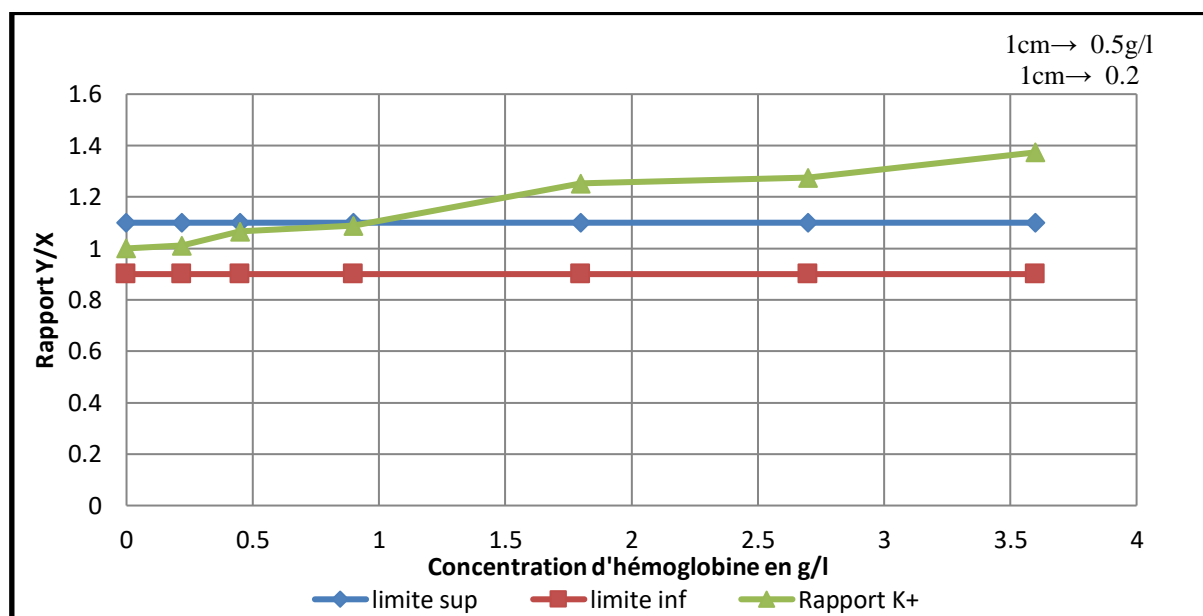


Figure 39: Représentation graphique du rapport Du potassium en fonction des concentrations d'hémoglobine.

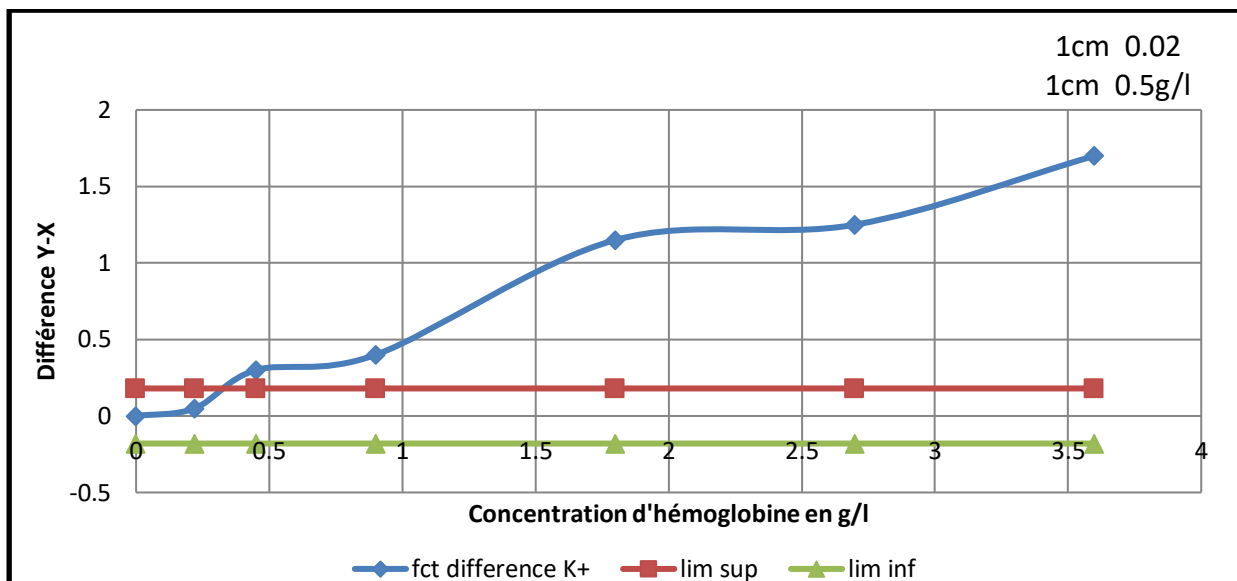


Figure 40 : Représentation graphique de différence du potassium en fonction des concentrations d'hémoglobine

Interprétation

Pour le graphe de différence et du rapport, l'hémolyse interfère de façon positive sur la mesure de l'activité du potassium.

Pour une valeur normale de 4,5 mmol/l, une augmentation de plus de 10% de l'activité mesurée est notée avec une concentration en hémoglobine de 0,9 g/L.

Cette augmentation est proportionnelle à la concentration d'hémoglobine de 0 à 3,6 g/l.

2.12. Sodium

Tableau 16: Les résultats du Sodium obtenus après ajout de l'hémolysât.

HB g/l	0	0,22	0,45	0,9	1,8	2,7	3,6
[Na ⁺]mmol/l	143	142,5	141	141	136,5	134,5	132
Rapport Na ⁺	1	0,997	0,986	0,986	0,955	0,941	0,923
différence	0	-0,5	-2	-2	-6,5	-8,5	-11

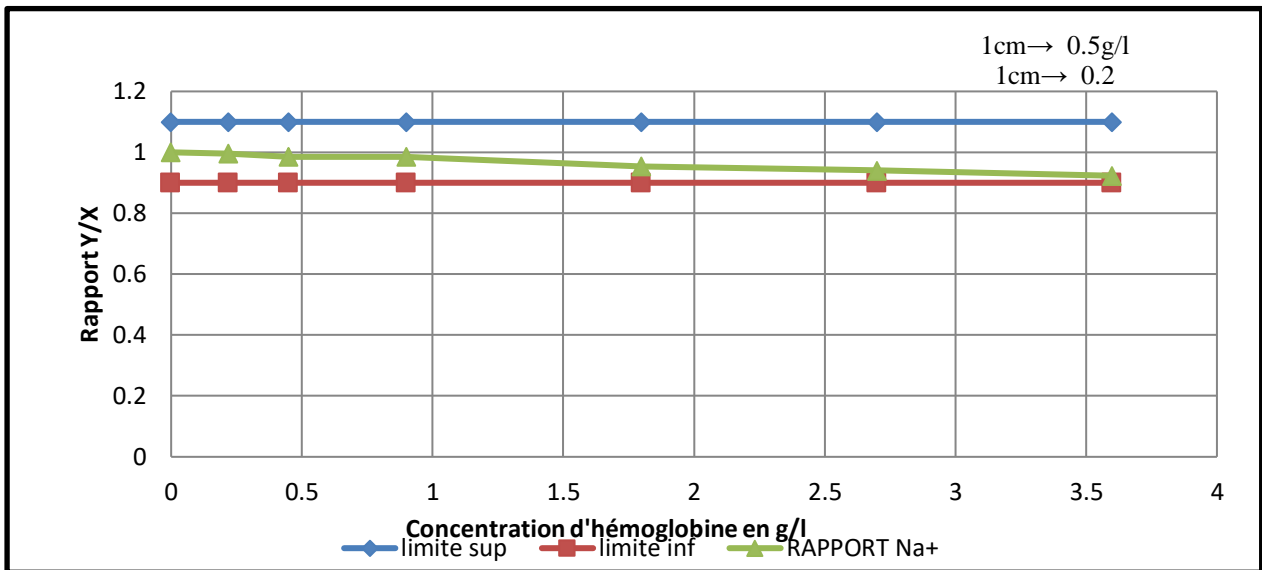


Figure 41: Représentation graphique du rapport du sodium en fonction des concentrations d'hémoglobine.

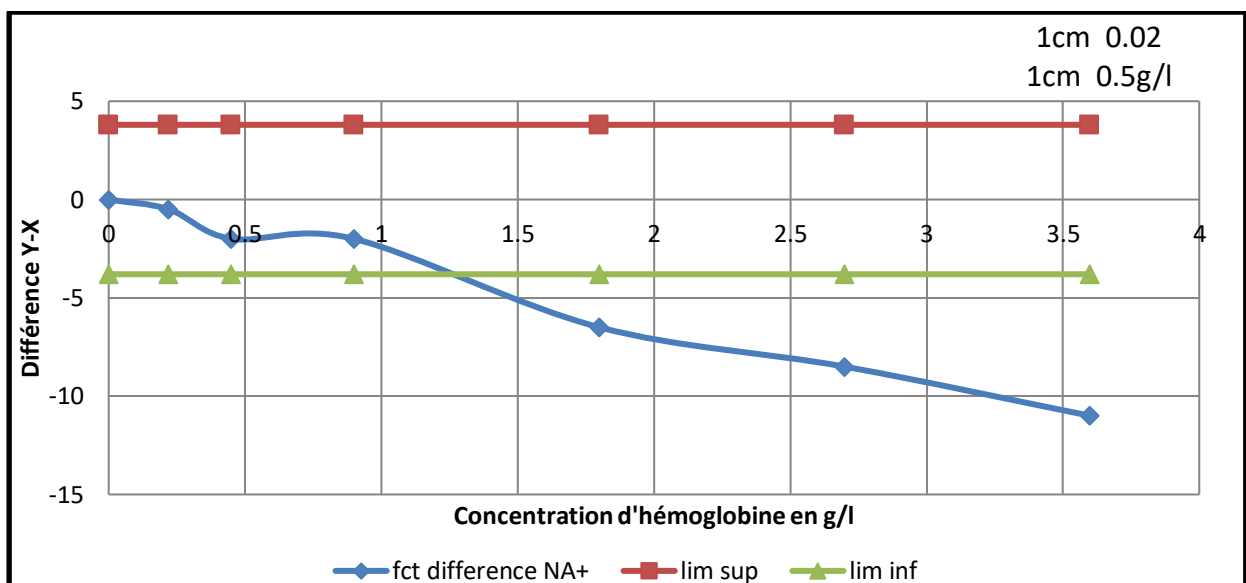


Figure 42: Représentation graphique de différence du sodium en fonction des concentrations d'hémoglobine.

Interprétation

Pour le graphe de du rapport aucune interférence de l'hémolyse pour les valeurs étudiées de 0 g/l à 3.6g/l soit de 0 à 216 μ mol/l d'hémoglobine. la mesure de la natrémie est observée pour les valeurs normales de natrémie à 143mmol/l.

Cependant, nous constatons une tendance vers la baisse, cela pourrait sous-entendre que si nous avons travaillé avec des concentrations encore plus élevées en hémoglobine, l'hémolyse aurait pu avoir un impact négatif sur nos résultats. Ce ci est démontré dans le graphe de différence qui montre une influence négative à partir d'une concentration de 1.3g/l d'hémoglobine.

CHAPITRE III : Discussion

❖ L'objectif de notre étude est de déterminer l'influence de l'hémolyse sur certains paramètres biochimiques (glucose, acide urique, urée, PAL, GGT, bilirubine totale, bilirubine directe, ASAT, ALAT, LDH, Ca^{2+} , Na^+ et K^+), selon les différentes concentrations de l'hémolysât (hémoglobine) et les comparer avec les données du fournisseur et ainsi fournir des recommandations sur les erreurs qu'on peut éviter en phase pré-analytique.

❖ Avant d'entamer la discussion nous tenons juste à préciser les limites de notre étude. Nous tenons à rappeler que le choix du groupe étudié a été porté sur des patients sains, sans antécédents et avec des plasmas clairs. Il ne comptait pas les patients qui ne répondaient pas à nos critères. Les échantillons étudiés ne sont donc pas représentatifs de la population. Les données ont été récoltées directement à partir de l'automate après avoir effectué les différents contrôles avec des sérums normaux et pathologiques. Les différents dosages ont été ensuite effectués et les résultats obtenus sont liés au degré de fiabilité de l'automate utilisé. De ce fait le dosage du calcium a été écarté de notre étude vu la non conformité du contrôle de qualité pour ce paramètre.

❖ L'Analyse de nos résultats permet de distinguer trois catégories : les paramètres non influencés par l'hémolyse, les paramètres influencés positivement et proportionnels au degré d'hémolyse et les paramètres influencés négativement.

Le seuil de 10% de variation par rapport à la valeur vraie définissant une influence sur la mesure a été choisi en fonction des données de la littérature (Annexe X).

❖ Les résultats de notre étude révèlent que pour certains paramètres l'hémolyse n'a pas d'influence décelable. Il s'agit du Glucose, de l'Acide urique, de l'Urée, de la GGT, de la PAL et du Sodium. Pour tous ces paramètres, la présence dans l'échantillon d'hémoglobine jusqu'à une concentration de 3.6 g/l (soit $216\mu\text{mol/L}$) n'entraîne pas une variation significative à +/- 10% sur la mesure.

Les résultats obtenus dans notre étude sont identiques avec ceux publiés dans les articles suivants : Damien Ali sur l'interférence de l'hémolyse sur le dosage de vingt-deux paramètres biochimiques, (Annexe XI) et L. Benchekroune et all. sur l'influence de l'hémolyse sur la détermination des paramètres de biochimie clinique sauf pour la PAL.

- **Pour la PAL**

L'étude de L. Benchekroune réalisée sur BEKMAN© CX7 Delta démontre une influence positive de l'hémolyse alors que celle de Damien Ali réalisée sur COBAS© 6000 démontre une influence négative pour des valeurs de PAL normal. Cette discordance de résultats est due probablement à la différence des automates utilisés lors de ces études, leurs seuils de détection ainsi que leurs limites de sensibilité qui diffèrent, sans oublier les méthodes et les réactifs spécifiques de chaque automate. Cependant nos résultats sont concordants à ceux donnés par le fournisseur.

- **Pour le glucose**

Pour une valeur normal de glucose notre résultat n'est pas identique à celui indiqué dans la fiche technique du réactif utiliser au laboratoire dont l'influence commence à partir des concentrations supérieures à 1g/l cette discordance est probablement due à la qualité du réactif. (Réactif reconstitué)

- **Urée et acide urique**

Nos résultats obtenus pour des valeurs normales d'acide urique et d'urée sont identiques à ceux mentionnés sur la fiche fournisseur.

- **Pour la GGT et le sodium**

Nous constatons une tendance vers la baisse, cela pourrait sous-entendre que si nous avons travaillé avec des concentrations encore plus élevées en hémoglobine, l'hémolyse aurait pu avoir un impact négatif sur nos résultats.

Pour la GGT la tendance à la baisse a été démontrée par une augmentation des concentrations de l'hémoglobine comme dans l'étude de Damien Ali et al, et mentionné sur la fiche fournisseur.

Cependant pour le sodium nous n'avons pas trouvé d'arguments en faveur de cette tendance à la baisse.

❖ Les paramètres pour lesquels l'hémolyse interfère de façon positive sont : ASAT, ALAT, LDH et Potassium. Cela pourrait se justifier par le fait que leurs concentrations intra-érythrocytaire soient supérieures à celles du plasma causant ainsi une interférence d'apport de l'hémolyse (qui est du ou relargage lors de la lyse du globule rouges).

Bien que le mécanisme à l'origine de cette interférence est le même pour ces paramètres, les valeurs de concentration pour lesquelles l'hémoglobine interfère sont variables car elles dépendent du rapport intra érythrocytaire /plasma de l'analyte considéré.

- **Pour la LDH**

Dans notre étude l'hémolyse influence sur l'activité de la LDH de façon positive, elle est proportionnelle aux concentrations de l'hémoglobine qui varient de 0 à 3.6g/l.

Pour ce paramètre le rapport intra érythrocytaire/plasma est égale à 160 d'où l'importance de l'impact de l'hémolyse qui est causé par le relargage important intra érythrocytaire de la LDH.

Cette influence commence à partir de 0.2g/l d'hémoglobine ce qui concorde avec les résultats publiés dans les articles publiés par Damien Ali & all et L. Benchekroun ainsi que les données du fournisseur.

- **Pour les ASAT**

L'hémolyse interfère d'une façon positive et proportionnelle avec la concentration d'hémoglobine sur l'activité ASAT. Cette interférence commence avant le seuil visuel de l'hémolyse donc à partir de 0.2g/l d'hémoglobine. Ces données sont légèrement diminuées par rapport à celles du fournisseur.

Cette interférence positive est expliquée par le rapport intra érythrocytaire/plasma qui est égale à 20.

Cette interférence est due principalement à l'étape pré-analytique lors du relargage du contenu érythrocytaire.

Le résultat obtenu dans notre étude est légèrement plus faible que les limites mentionnées dans la fiche technique du fournisseur mais il est proche de celui obtenu dans les études publiées par Damien Ali & all et L. Benchekroun.

- **Pour les ALAT**

L'activité ALAT est impactée positivement par l'hémolyse. Cette augmentation est due à la présence intra érythrocytaire de cette enzyme 5 fois plus élevée que dans le plasma, donc il s'agit d'interférence d'apport.

Dans notre étude l'influence commence à partir d'une concentration de 1.1g/l d'hémoglobine, qui est inférieure aux limites mentionnées dans la fiche technique du réactif spécifique. Cependant elle est concordante à l'étude de Damien et all

- **Pour le Potassium**

L'hémolyse influence sur le potassium positivement et d'une façon proportionnelle à la concentration d'hémoglobine, et cette influence commence à partir de 0.9g/l d'hémoglobine. Cette augmentation du potassium revient à la concentration intra érythrocytaire qui est 24 fois plus élevée que celle du plasma, ce qui engendre une interférence d'apport. Ce résultat est concordant avec d'autres études.

- ❖ Les paramètres pour lesquels l'hémolyse interfère de façon négative sont la bilirubine totale et directe :

- **Pour la bilirubine totale**

Selon les résultats obtenus dans notre étude l'hémolyse influence négativement sur la bilirubine totale à partir d'une concentration de 1.8g/l d'hémoglobine ce qui concorde avec les valeurs données par le fournisseur ainsi que l'étude faite par le Juge van der woerd de lange sur l'interférence de l'hémoglobine dans la détermination de la bilirubine

Par contre, elle ne concorde pas avec ceux de l'études faite par E. Gobert De Paepel et all sur Interférences de l'hémolyse et de la lipémie sur trois méthodes de dosage de la bilirubine totale et conjuguée sur ADVIA 1650, qui démontre une absence d'interférence de l'hémolyse sur la bilirubine totale. Cette discordance de résultats est probablement due à la différence des automates utilisés ainsi qu'à leurs limites de détections.

Cette influence se traduit par l'effet peroxydatif suite à l'auto-oxydation d'hémoglobine qui casse la liaison diazobilirubine responsable de la réaction colorimétrique par laquelle la mesure de la bilirubine est légèrement ou fortement diminuée. Ceci dépend de la composition du réactif diazo, donc c'est une interaction chimique.

- **Pour la Bilirubine directe**

Selon les résultats obtenus dans notre étude l'hémolyse influence négativement sur la bilirubine directe à partir d'une concentration de 0.9g/l d'hémoglobine ce qui concorde avec les valeurs données par le fournisseur ainsi que l'étude faite par le Juge van der woerd de lange sur l'interférence de l'hémoglobine dans la détermination de la bilirubine et celle de

l'études faite par E. Gobert De Paepel et all sur l'interférence de l'hémolyse et de la lipémie sur trois méthodes de dosage de la bilirubine totale et conjuguée sur ADVIA 1650.

Cette interférence négative est due à l'activité pseudo peroxydase de l'hémoglobine qui inhibe la formation du colorant azoïque. L'inhibition peut être observée si la concentration d'hémoglobine libre dans le plasma est supérieure à 0,8 g /L.

Tableau 17: Sens de l'influence de l'hémolyse sur les différents paramètres étudiés.

Absence d'influence	Influence positive	Influence négative
Glucose	ASAT	Bilirubine totale
Urée	ALAT	Bilirubine directe
Acide urique	LDH	
GGT	Potassium	
PAL		
Sodium		

CONCLUSION

Nous avons effectué dans notre étude l'influence de l'hémolyse sur certains paramètres biochimiques dosés sur l'automate ARCHITECT Ci 4100 ABBOTT© et l'analyseur d'électrolytes 9180 AVL ROCHE® en suivant un protocole selon les recommandations SFBC puis nous avons comparé nos résultats avec ceux du fournisseur ainsi qu'à d'autres études. Cette comparaison a été faite par rapport à l'intervalle de limites d'acceptabilité présents dans les fiches techniques des différents réactifs relatifs aux paramètres étudiés.

Au terme de ce travail, nous avons classé nos paramètres biochimiques en trois catégories ;

- Ceux qui ne présentent pas d'interférences décelables (Glucose, Urée, Acide urique, GGT, PAL et Sodium) ;
- Ceux qui sont influencés positivement (ASAT, LDH et Potassium) dont on ne peut pas valider les résultats, tandis que pour ALAT même si sa concentration est influencée positivement on peut valider le résultat vu qu'elle correspond aux normes d'acceptabilité.
- ceux qui sont influencés négativement (la Bilirubine totale et la Bilirubine directe), mais on peut valider les résultats vu qu'ils sont dans les normes d'acceptabilité.

La prévention de l'hémolyse passe en partie par la maîtrise de la phase pré-analytique, l'un des challenges les plus importants pour les laboratoires de biologie médicale afin de palier ou du moins la réduire le risque de survenue d'une hémolyse et d'éviter ainsi une sous-estimation ou une sur-estimation des résultats d'analyses médicales.

Ainsi, nous pouvons proposer ces quelques recommandations :

- ❖ Eviter la pose prolongée de garrot pendant le prélèvement : une stase d'un maximum de 60 secondes est acceptable et n'a aucun effet significatif sur l'échantillon de plus il doit être relâché dès que le sang s'écoule normalement dans le premier tube.
- ❖ Eviter les réajustements de l'aiguille ; celle-ci doit être tenue parallèlement à la veine. La ponction doit s'effectuer à un angle de 30°. De plus il faut bien choisir le calibre de l'aiguille en fonction de la grosseur de la veine, du site de ponction et de l'état du patient.
- ❖ Il est recommandé dans la limite du possible d'éviter de prélever du sang à partir d'un cathéter horizontal, de plus les 10 premiers millilitres de sang doivent être éliminés.

Conclusion

- ❖ Transporter les échantillons sanguins le plus rapidement possible au laboratoire sans pour autant leur faire subir des agressions pendant le transport.
- ❖ Ne jamais congeler du sang total directement, cela entraînerait une hémolyse totale
- ❖ Centrifuger aussi rapidement que possible en respectant les durées d'attente nécessaires, la durée et la vitesse de centrifugations recommandées.

BIBLIOGRAPHIE

1. Enseignement de l'hématologie cellulaire du globule rouge disponible sur : www.hematocell.fr [(visité le 04 03 2018)].
2. Wood, S. C, et Lenfant, C. (Phylogeny of the gas-exchange system: Red cell function and Comprehensive Physiology),(1987).
3. Berthlon jade .Bourbon Laura .Erythropoïétine dans le dopage sanguin sportif . Projet 2018 disponible sur : <<<http://dopagepoetsl.canalblog.com/archives/2009/04/10/13338919.html>>> [Visité le 01-04-2018] .
4. Terkia medkour, thèse de doctorat de l'université Paris XII spécialité biologie cellulaire et moléculaire (modélisation mathématique et simulation numérique de la polymérisation de l'Hb drépanocytaire) le 2 juillet 2008 s. d.
5. Gerared Sebaraud, le livre d'hématologie clinique et biologique 2em édition, 2005.
6. Schéma du globule rouge disponible sur : « <https://www.mesexercices.com/exercices/exercice-culture-2/exercice-culture-31187.php> ».
7. Les cahiers d'Hématologie octobre 2013disponible sur : «<http://www.researchgate.net/publication/258172595>» .
8. Delaunay, J. The molecular basis of hereditary redcell membrane disorders. Blood reviews, 21(1), 1-20. 2005.
9. BrigitteBader-Menier , T Cynober, G Tchernia (Maladies de la membrane du globule rouge) .Medecin et therapeutique /Pediatrie.2001;4(3):217-22.
10. Le cytosquelette membranaire disponible sur : « <https://www.google.com/search?q=LE+CYTOSQUELETTE+MEMBRANAIRE>».
11. H wajcman : Hémoglobine , EMC d'hématologie 2005; 2 (13-000-R-60):1-8.
12. Couprie N : les Hémoglobinopathie laboratoire marcel merieux - Hematologie spécialisé 200 : 1-24 ».
13. Structure tetramérique de l'hémoglobine ,disponible sur le site << <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/2d.html>>> [visiter le 15/12/2017]
14. Pharmacologie des médicaments inhibiteurs des canaux ionique disponible sur : « www.pharmacorama.com.
15. Guide pré analytique VAGUETTE .www.gbo.com/preanalytics.
16. Thomas L. Haemolysis as influence and interference factor. Biochim Clin. 2002;26(95):7.

Bibliographie

17. Hémolyse : mécanismes et méthodes d'exploration .disponible sur : <<<http://www.medecine-cours.com/2011/10/hemolyse-mecanismes-etmethodes.html>>>.
18. FRANÇOIS Jobin, PIERRE F. Leblond . Cahiers d'hématologie, Tome 1, 2006, 180-181.
19. Hémolyse physiologique et pathologique .disponible sur le site : <<<https://tenma123.files.wordpress.com/2008/10/11-hemolyse>>>[visité le 23.05.2018].
20. Roselyne l'Etalien et AL. Immun hématologie, hémolyse intra vasculaire, 2008, page 355.
21. Hématologie hémolyse disponible sur : <<<http://univ.encyeducation.com/uploads/1/3/1/0/13102001>>> [Visité décembre 2018).
22. Maladie anémie hémolytique disponible sur : <<<http://www.docteurcliv.com>>>.
23. Médecine du Québec .Disponible sur : <<<https://fmoqlegacy.s3.amazonaws.com/fr/Le%20Medecin%20du%20Quebec/Archives/2000%20-%202009/074-077ROGER-A1003.pdf>>>[visité le 15.03.2018].
24. Schéma de l'hémolyse, disponible sur : <<<http://www.jle.com/edocs/00/04/B0/3C/jlemet0557gr1.jpg>>>.
25. Commission de validation des techniques.
26. Remaley AT, Wilding P. Macroenzymes .biochemical characterization, clinical significance, and laboratory detection. Clin Chem. 1989. 35(12) :2261-70.
27. Thomas L. Haemolysis as influence and interference factor. Biochim Clin 2002 ; 26 : 95-7.
28. Wayne, PA. CLSI Interferen cetesting in clinical chemistry. Approved guidelined-second edition. CLSI document EP07-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
29. Kroll MH. Evaluating Interference Caused by Lipemia. Clin Chem. 2004 1;50(11):1968–9.
30. Hémolyse immune disponible sur : <<www.snv.jussieu.fr>>.
31. Moran RF, Feuillu A. Critical care analytes: pre-analytical factor saffecting result quality for combined bloodgas and electrolyte systems. Journal of Automatic Chemistry 1989; 11:201-205.
32. Guide preanalytique VAGUETTE sur : <<www.gbo.com/preanalytics>>.
33. Fayolle P, Lefebvre H, Braun JP. Effects of incorrect venepuncture on plasma CK activity in dog and horse. Br Vet J 1992;148:161–2.
34. Sharp MK, Mohammed SF. Scaling of hemolysis in needles and catheters .Ann biomed Eng 1998 ;26 :788-97.

Bibliographie

35. Ito S, Matsuzawa T, Saida M, Izumisawa S, Iwasaki M. Time and temperature effects on potassium concentration of stored whole blood from four mammalian species. *Comp Haematol Int* 1998;8:77–81.
36. Khadija SAADOUNI .thèse les non conformités pré-analytiques au laboratoire de biochimie de L'HMIMV 2011 .
37. RymEllouze , Sami Guermazi importance de l'étape pré analytique en hémostase anale de biologie clinique vol 71 ,n° 4 juillet –aout 2013.
38. Laurence Vernez et Dagmar Kessler centrifugation centre suisse de contrôle de qualité création juillet 2009 mise a jour janvier 2017.
39. Da Fonseca-Wollheim F. Haemoglobin interference in the bichromatic spectrophotometry of NAD(P)H at 340/380 nm. *Eur J Clin Chem Clin Biochem J Forum Eur Clin Chem Soc.* 1993;31(9):595–601.
40. K.S.S.Saibaba , M .VijayaBhaskar . Intereference in clinical chemistry analysis .*Indian Journal of Clinical Biochemistry* .1998 , 13(2), 55-62.
41. Guder WG, da Fonseca-Wollheim F, Heil W, et al. The haemolytic, icteric and lipemic sample recommendation regarding their recognition and prevention of clinically relevant interferences. Recommendations of the Working Group on Preanalytical Variables of the German Society for Clinical Chemistry and the German Society for Laboratory Medicine *Journal of Laboratory Medicine* 2000;24(8).
42. Brousse A. Les Principales interférences endogènes dans les examens de biochimie clinique. 1996. Thèse d'exercice : Pharm., Université de Nantes; n°14. 69 p.
43. Image d'un sérum ictérique disponible sur : << <https://www.google.com>>>.
44. Olivier Preynat-Seauve, André Deom, Dagmar Kessler. CSCQ juin 2010.
45. Ji JZ, Meng QH. Evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin, and lipids on Roche Cobas 6000 assays. *Clin Chim Acta.* 2011 ;412(17–18):1550–3.
46. Nikolac N. Lipemia: causes, interference mecanisme, detection and management. *Biochem Medica.* 2014 Feb 15;24(1):57–67.
47. Bonnefont-rousselot D -le bilan lipidique en 2016.Feuillets de biologie. mai2016;(330) :39-52.
48. Nikolac N, Šupak-Smolčić V, Šimundić AM, Čelap I. Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: national recommendations for venous blood sampling. *Biochem Med.* 2013;23:242–54. <<<http://dx.doi.org/10.11613/BM.2013.031>>>.
49. Povjerenstvo za stručna pitanja Hrvatske komore medicinskih biokemičara]. [Standard idobre stručne prakse]. (in Croatian). Disponible sur : << <http://www.hkmb.hr/povjerenstva/strucna-pitanja.html#1>>>.[visité le 15-04-2018.

Bibliographie

50. Liste extraite du fichier ANALYSES. LBM BIO CASAMANCE disponible sur : <<laboratoire.pylevy.pagesperso-orange.fr/CATANALPY>> [visité le 02-02-2018].
51. Goff Caroline, Dr Lognard Micha Le Goff Caroline, Dr Lognard Michaëël Centre Hospitalier Universitaire de Centre Hospitalier Universitaire de Li Liège 2007.
52. Cazenille E, Cynober DL. Dysfonctionnements et non conformités au cours de la phase pré-analytique au laboratoire de biochimie. Thèse de pharmacie. Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques. Université Paris V- Rene Descartes 2005 : 98p. .
53. Togni G, Volken C, Sabo G. Pré-analytique. Forum Med Suisse 2002 ; 6 :113-120 .
54. Architect ci 4100. Abbott park, illinois , USA 2016.disponible sur : <<<http://www.corelabotory.abott>>>. Visité le 04-03-2018
55. Image de l'Architect ci4100 disponible sur << <http://fr.dotmed.com>>>.
56. Manuel Technique ARCHITECT 48-1974/R1 - Juillet 2009.
57. Image de l'AVL 9180 ROCHE®.disponible sur : << [www.morimidis .com](http://www.morimidis.com)>>.
58. Mode d'emploi , Analyseur d'électrolytes 9180 ,rév.5.0, mars 2008.
59. ABL FLEX reference manual , software version 6.00; disponible sur le site <<[https://www.google .dz](https://www.google.dz)>> ,visité le 01 -06-2018.
60. Image de l'analyseur des gaz du sang pH/avec analyseur d'électrolytes - ABL 800 , disponible sur : <<<http://www.medicalexpo.fr/prod:radiometer-medical/product-77112-568151.html>>>.
61. Hubert ph,Nguyen JJ, Boulanger B, Chapuzet E , Chiap P, Cohen , et al.SFSTP. Validation des procédures analytiques quantitatives, harmonisation des démarches. PARTIE II ; Statistiques ,2006.
62. Fiche technique GLUCOSE MR Cromatest.
63. Fiche Technique UREA Abbot Laboratories ,September 2006.
64. Fiche technique URIC ACID Abbot Laboratories ,October 2009.
65. fiche technique ALANINE AMINO TRANSFERASE abbott labotories .january 2009.
66. Fiche technique ASPARTATE AMONO TRANSFERASE abbott laboratories ,décembre 2008.
67. Fiche technique ALKALINE PHOPHATASE abbott Laboratories ,February 2007.
68. Fiche Technique GAMMA -GLUTAMYL TRANSFERASE Abbott Laboratories ,March 2009.
69. Fiche technique TOTAL BILIRUBINE Abbott laboratories ,july 2009.
70. Fiche technique DIRECT BILIRUBINE Abbott Laboratories , August 2009.

Bibliographie

71. Fiche technique LACTATE DEHYDROGENASE Abbot Laboratories ,October 2009 .
72. Nikolac N, Simundic A-M, Miksa M, Lima-Oliveira G, Salvagno GL, Caruso B, et al. Heterogeneity of manufacturers' declarations for lipemia interference — An urgent call for standardization. Clin Chim Acta. 2013 ;426:33–40.
73. DAMIEN Ali et al. Interference de l'hémolyse sur 22 paramètres biochimiques, ann bio clin 2014.

ANNEXES

ANNEXE I

Tableau des rapports de concentration de différents paramètres dans les érythrocytes et dans le sérum.

Constituants	[]Éryth/sérum
Créat	1,60
K	25
Mg	2,7
LDH	160
Phosphatases acides	57
TGO	3
TGP	20

ANNEXE II

Impact des interférences de la phase pré-analytique sur le dosage des paramètres biochimiques [36].

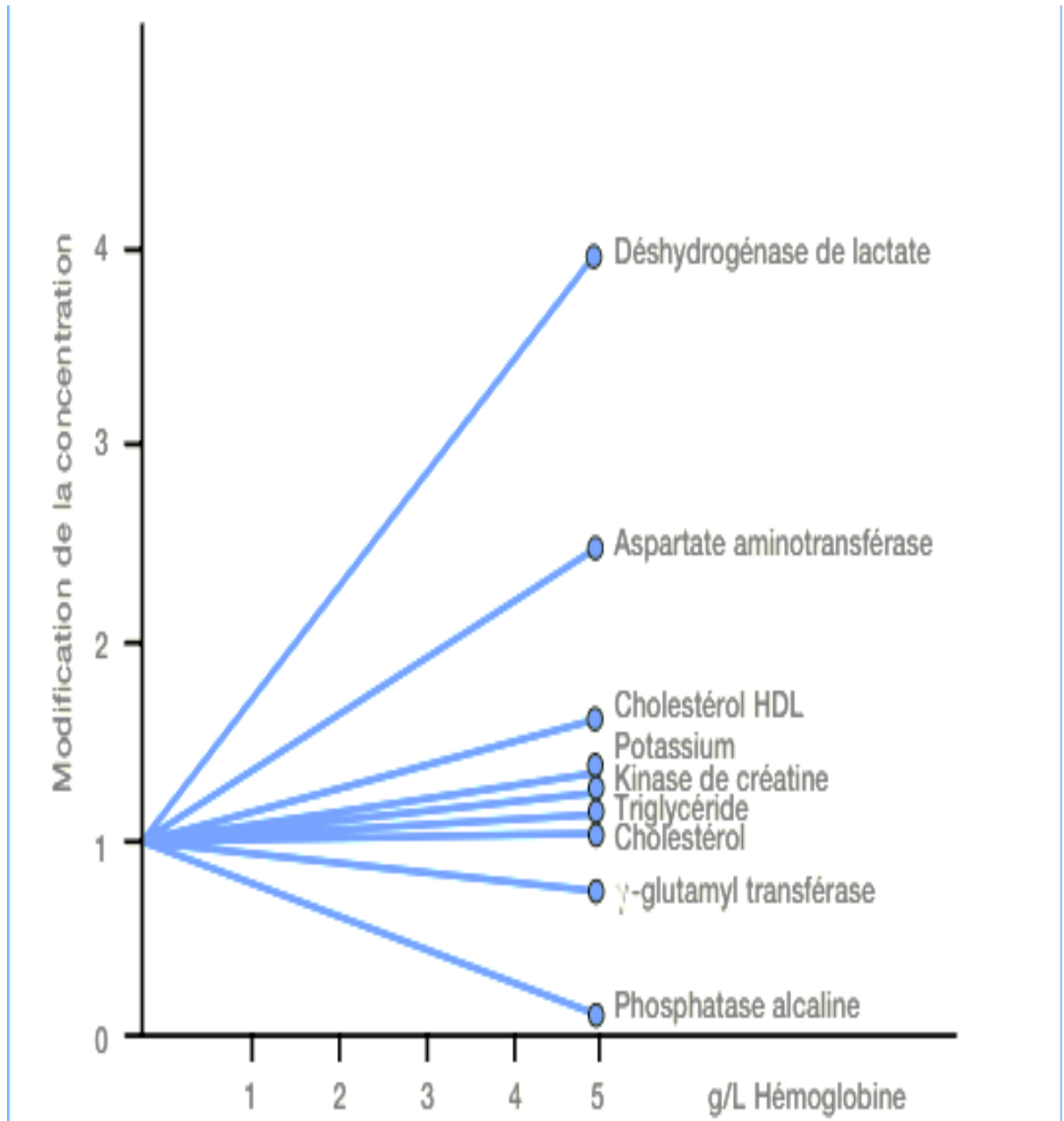
BIOCHIMIE	
Paramètres	Interférences
Na	↓ : Diurétiques, Tegretol, Oncovin, Endoxan, Primperan, <i>Eviter l'hémolyse, les perfusions</i>
K	↓ : Diurétiques, réglisse ↑ : Hémolyse +++ <i>Eviter les perfusions</i>
Cl	↓ : Diurétiques, ↑ : Calcibronat <i>Eviter les perfusions</i>
Réserves Alcalines	↑ : Perfusion de Bicarbonate de Na <i>Eviter l'hémolyse</i>
Protides	↓ : Grossesse, perfusions, œstrogènes ↑ : Activité musculaire
Urée	↓ : Grossesse, régime ↑ : Activité musculaire
Créatinine	↓ : Hémolyse, sérum hyperlipémique ou ictérique ↑ : Activité musculaire
Glycémie	↓ : Grossesse, activité musculaire, insuline ↑ : Alcool, tabac, stress, patient non à jeun, perfusion de glucose, corticoïdes
Cholestérol	↓ : Hémolyse ↑ : Grossesse, patient non à jeun, perfusion de solution lipidique
Triglycérides	↑ : Grossesse, patient non à jeun, alcool, tabac, oestroprogestatifs, hyperglycémolémies (perturbation métabolique bénigne qui provoque une fausse ↑ des triglycérides avec un sérum clair)
Acide urique	↓ : Grossesse
Calcium	↓ : Grossesse, oestroprogestatifs
Phosphore	↓ : oestroprogestatifs, antiacides/hydroxyde d'aluminium, antiépileptiques ↑ : activité musculaire, antihypertenseurs <i>Eviter l'hémolyse</i>
Magnésium	↑ : Hémolyse
Fer	↑ : Hémolyse
Bilirubine	↓ : Grossesse, phénobarbital, clofibrate, fénofibrate, acide acétylsalicylique ↑ : Diurétiques, rifampicine, hémolyse
TGO/TGP	↓ : Grossesse ↑ : Hémolyse, anticonvulsivants, oestroprogestatifs

Annexes

Prolactine	<p>↓ : Levodopa, bromocriptine, piribédil, dihydroergocriptine, corticoïdes</p> <p>↑ : Grossesse, activité musculaire, stress, stimulation du mamelon, allaitement, phénothiazines, benzodiazépines, antiémétiques, oestroprogestatifs, œstrogènes, réserpiniques, antagonistes histaminergiques, opiacés, agonistes sérotoninergiques, lithium, morphiniques, neuroleptiques, antidépresseurs tricycliques, carbamates, Primperan, Dogmatil, Tagamet, méthyldopa</p>
Œstradiol	↑ : Grossesse
Cortisol	<p>↓ : Dexaméthazone</p> <p>↑ : Grossesse, oestroprogestatifs, Synacthène</p> <p style="text-align: center;"><i>Eviter stress, activité musculaire</i></p>
Phosphatases Alcalines	<p>↓ : Hypolipémies, oestroprogestatifs, troubles dentaires</p> <p>↑ : grossesse, hémolyse, anticoagulants, antiépileptiques, androgènes</p>
GGT	↑ : Très nombreux médicaments (antimitotiques, anticonvulsivants, antidépresseurs, oestroprogestatifs), alcool
PSA	<p>↑ : toucher rectal, biopsie rectale, échographie transrectale, chirurgie prostatique, sondage vésical ou sonde transurétrale, effort physique</p> <p>+++ voiture, +++ vélo</p>
Amylase	<p>↓ : Hypertriglycémie (fausse hypoamylasémie)</p> <p>↑ : si présence de macro-amylase, opiacés</p>
Lipase	Eviter l'hémolyse et les sérums hyperlipémique et ictériques
CPK	↑ : Activité musculaire, biopsie musculaire.
LDH	↑ : Hémolyse, grossesse, antiépileptique.
Aldolase	<p>↓ : Hémolyse, œstrogènes</p> <p>↑ : Activité musculaire, corticoïdes</p>
Myoglobine	↑ : Activité musculaire, hémolyse
Ferritine	<p>↑ : Hémolyse</p> <p>↓ : Grossesse</p>
Électrophorèse des protéines	<p>Eviter l'hémolyse (dédoublage du pic α-2 globulines)</p> <p>Eviter les plasmas (pic de fibrinogène)</p>
Albumine	<p>↓ : Grossesse, oestroprogestatifs, perfusion, régime végétarien</p> <p style="text-align: center;"><i>Eviter l'hémolyse et les sérums hyperlipémique</i></p>
Ig E	↓ : Antihistaminiques
Vit B12	↓ : Grossesse, alcool
Folates	↓ : Grossesse, oestroprogestatifs, alcool
ECA	↑ : Grossesse, tabac
AFP	↑ : Grossesse
T3/T4	<p>↓ : Androgènes, corticoïdes, barbituriques, anti-inflammatoires, hydantoïne, grossesse</p> <p>↑ : hormones thyroïdiennes, œstrogènes, héparine, amiodarone</p>
TSH	<p>↓ : hormones thyroïdiennes, corticoïdes, dopaminergiques, opiacés, antagonistes, opiacés, sérotonine, somatostatine, amiodarone, β bloquants, stress, testostérone</p> <p>↑ : œstrogènes, métoclopramide, sulpiride, noradrénaline</p>

ANNEXE III

Modification de différents paramètres avec une concentration d'hémoglobine de 5 g/l [32].



ANNEXE IV

Recommandations pour la centrifugation des tubes VACUETTE® [32]

	Vitesse de centrifugation	Durée
Tubes hémostases		
Plasma citraté riche en plaquettes (PRP)	150 g	5 minutes
Plasma citraté pauvre en plaquettes (PPP)	1500 à 2000 g	10 minutes
Plasma citraté sans plaquettes	2500 à 3000 g	20 minutes
Tubes sérum	min. 1800 à 2200 g	10-15 minutes
Tubes sérum avec gel	min. 1800 à 2200 g	10-15 minutes
Tubes sérum billes	min. 1800 à 2200 g	10-15 minutes
Tubes héparine	min. 1800 à 2200 g	10-15 minutes
Tubes héparine avec gel	min. 1800 à 2200 g	10-15 minutes
Tubes EDTA avec gel	min. 1800 à 2200 g	10-15 minutes
Tubes fluorure de sodium	min. 1800 à 2200 g	10-15 minutes

ANNEXE V

L'influence des anticoagulants sur une sélection de paramètres[32].

Paramètre	Anticoagulants interférant
Albumine	Héparine
Phosphatase alcaline	Citrate, EDTA, fluorure, oxalate
Alpha-amylase	Citrate, EDTA, fluorure
Alpha-1-antitrypsine	Citrate, EDTA, oxalate
Bilirubine	Citrate, fluorure, oxalate
Vitesse de sédimentation des érythrocytes (VS)	Héparine
Calcium	Citrate, EDTA, oxalate
Cholestérol	Citrate, fluorure
Cholinestérase	EDTA, fluorure, héparine
Céruplasmine	EDTA
Kinase de créatine (CK)	Citrate, fluorure, oxalate
CK-MB	Citrate, EDTA, fluorure, héparine, oxalate
Fer	Citrate, EDTA, héparine, oxalate
Capacité de fixation du fer	EDTA
Gamma-GT	Citrate, fluorure, héparine, oxalate
GLDH	Fluorure
Glucose	Citrate, oxalate
GOT (ASAT)	Oxalate
GPT (ALAT)	Oxalate
Acide urique	EDTA, citrate, fluorure
Urée	Fluorure
HBDH	Oxalate
Cholestérol HDL	Citrate, fluorure
Insuline	Oxalate
Potassium	Oxalate
Créatinine	Citrate, EDTA, fluorure
Cuivre	Citrate, EDTA, fluorure, oxalate
LAP	Citrate, EDTA, fluorure, héparine, oxalate
LDH	Fluorure, oxalate
Cholestérol LDL	Oxalate
Lipase	EDTA
Lipids	EDTA
Electrophorèse des lipides	Oxalate
Lithium	Oxalate
Sodium	Citrate, EDTA, oxalate
Phosphate	Citrate
Electrophorèse des protéines	Oxalate
Quick (temps de thromboplastine)	Oxalate
Phosphatase acide	Citrate, EDTA, fluorure, héparine, oxalate
T3 (triiodothyronine)	Oxalate
Triglycérides	Citrate, fluorure, oxalate
Vitamin B12	Oxalate

ANNEXE VI

Tableau des Médicaments pouvant influencer les activités enzymatiques et autres analytes [36].

<i>Enzyme et autres analytes</i>	<i>Effet du médicament</i>
<i>Phosphatase alcaline (PAL)</i>	<i>Augmentation</i> Allopurinol, stéroïdes anabolisants, carbamazépine, cotrimoxazole, cyclophosphamide, disopyramide, érythromycine, isoniazide, kétoconazole, mercaptopurine, méthotrexate, α-méthyl dopa, oxacilline, papavérine, pénicillamine, phénobarbital, phénylbutazone, phénytoïne, propylthiouracil, triméthoprime/sulfaméthoxazole, sulfasalazine, acide valproïque
	<i>Diminution</i> Clofibrate, contraceptifs oraux
<i>Transaminases (ALT, ASAT)</i>	<i>Augmentation</i> Amiodarone, carbamazépine, disopyramide, oxacilline, papavérine, paracétamol (acétaminophène), pénicillamine, phénylbutazone, phénytoïne, acide salicylique, streptokinase, acide valproïque
	<i>Diminution</i> Allopurinol
<i>Créatine (-phospho)-kinase (CK ou CPK)</i>	<i>Augmentation</i> Clofibrate, digoxine, phénothiazine, succinylcholine (suxaméthonium), théophylline
<i>Gamma Glutamyl transférase (GGT)</i>	<i>Augmentation</i> Carbamazépine, érythromycine, contraceptifs oraux (sauf micropilule), phénytoïne
	<i>Diminution</i> Clofibrate

ANNEXE VII

Influence du jeune sur les analyses biochimiques[32].

Jeûne IMPERATIF	Acide urique, Calcium, Phosphore, Glycémie, Triglycerides, Cholesterol, Prolactine, Test au synacthène immédiat
Jeûne PREFERABLE	Electrophorèse des protéines sériques, Fer, CREATININE, Vitesse de SEDIMENTATION, Enzymes hépatiques (transaminases, GGT, Bilirubines, PAL), Enzymes cardiaques (CK, LDH)
Jeûne INUTILE	Marqueurs tumoraux, Tests hormonaux

ANNEXE VIII

Fiche de renseignement

Laboratoire de biochimie

Hôpital CHU Tizi-Ouzou.

Promoteur : Dr Amirat

Mémoire : 6^{em} Année Pharmacie : Hémolyse et interférences en biochimie.

Nom :

prénom :

Age :

Date :

N° du tube :

Les critères :

-plasma normale

plasma lipémique

-plasma icterique

plasma hémolysé

Les paramètres :

-Glycémie

- Taux de protéine totale

-Urée

- Créatinine

-Acide urique

-Bilan lipidique complet

-Bilan hépatique complet

-Ionogramme sanguin

-Albumine

- Calcémie

- Fer

- Magnesémie

-Phosphorémie

-LDH

ANNEXE IX

Article Evaluation de l'influence de l'hémolyse, de la bilirubine et de la turbidité des échantillons.

Recommandations pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale

1

Module 7 : évaluation de l'influence de l'hémolyse, de la bilirubine et de la turbidité des échantillons

Définition

La présence, dans les liquides biologiques de certaines substances endogènes, parmi lesquelles la bilirubine, l'hémoglobine ou des lipoprotéines peut être à l'origine d'anomalies et conduire à des résultats erronés. L'influence de ces substances varie avec la nature de l'examen et la méthode de mesure ou de recherche mise en œuvre. Un protocole d'évaluation de cette influence est proposé pour les tests de validation.

→ Objectif

Les défauts de spécificité ou la sensibilité aux interférences peuvent être évalués par surcharge d'un spécimen biologique [7] par un composé dont la présence est susceptible d'entraîner un résultat inexact, soit par excès, soit par défaut. Le protocole se propose d'appréhender de façon quantitative l'influence de certains composés d'origine endogène (hémoglobine, bilirubine, colorant, etc.) ou exogène (médicaments, aliments, toxiques, etc.).

→ Matériaux

Un spécimen de concentration connue de l'analyte à doser (niveau moyen) est surchargé par une solution concentrée de la substance susceptible d'interférer pour obtenir plusieurs niveaux de concentration.

→ Étude de l'influence de l'hémolyse

- **Hémolysat** : préparer une solution d'hémoglobine à partir d'hématies lavées, hémolysées et diluées pour obtenir une concentration d'environ 50 g/L (3 mmol/L) d'hémoglobine. Les surcharges du spécimen contenant l'analyte étudié (*pool*) sont effectuées par dilution en suivant les indications du [tableau II](#).

→ TABLEAU II. SOLUTIONS SURCHARGÉES AVEC UN HÉMOLYSAT

Tube n°	1	2	3	4	5	6	7
Pool (µL)	900	900	900	900	900	900	900
Hémolysat (µL)	0	5	10	20	40	60	80
NaCl 150 mmol/L (µL)	100	95	90	80	60	40	20
Taux de surcharge en hémoglobine (µmol/L)*	0	15	30	60	120	180	240

* À vérifier par dosage.

ANNEXE X

Principales études et critères utilisés pour définir l'interférence significative [72]

Dans la littérature récente, la définition de l'interférence significative est réajustée. Certains auteurs dénoncent le fait que la plupart des fournisseurs utilisent arbitrairement le seuil de 10% de variation. Selon les travaux de Fraser, une interférence significative apparaît lorsque que le résultat diffère de $\pm 1.96 \times (CVa^2 + CVb^2)^{1/2}$ du résultat attendu avec CVa : coefficient de variation analytique et CVb : coefficient de variation biologique. Plusieurs études se basent sur les performances d'imprécision souhaitables ou DSI (desirable specification for imprecision) issues des travaux de Ricos et Al, afin de définir leur limite interférence significative. Cette démarche semble en effet plus appropriée, le critère d'acceptation est ajusté pour chaque analyte selon par exemple qu'il présente des variations biologiques faibles ou importantes. Plusieurs auteurs réclament ainsi que les fournisseurs s'alignent sur cette définition de l'interférence significative mais en pratique cela n'est pas réalisé.

CLIA : Clinical Laboratory Improvement Amendments ; CVa : Coefficient de variation analytique ; CVb : Coefficient de variation biologique ; DSI : desirable specification for imprecision ; TAE : total allowable error.

Références	Critères d'interférence significative
Monneret et Al, 2015	10% $1.96((CVa^2+CVb^2)^{1/2})$ $1,96 \times Cva$
Nikolac et Al, 2013	DSI Ricos
Ji et Al, 2011	10%
Lippi et Al, 2006	DSI Ricos
Steen et Al, 2006	DSI Ricos
Grafmeyer et Al, 1995	CV Valtec
Ryder et Al, 1990	10%

ANNEXE XI

Influence de l'hémolyse sur 22 paramètres biochimiques [73]].

Tableau 1. Paramètres pour lesquels l'influence de l'hémolyse a été étudiée sur l'automate Cobas 6000 ce Roche.

Paramètre	Principe de dosage	Méthode	Longueur d'onde de mesure	Domaine de linéarité	CV reproductibilité (%)	Incertitude de mesure (%)	
ALAT	Alanine amino-transférase	Méthode enzymatique	IFCC avec phosphate de pyridoxal	340 nm	0,08-11,7 μ kat/L	4,4	8,81
ALB	Albumine	Méthode colorimétrique	Vert de bromocrésol	570 nm	2-60 g/L	3,1	ND
ASAT	Aspartate amino-transférase	Méthode enzymatique	IFCC avec phosphate de pyridoxal	340 nm	0,08-11,7 μ kat/L	2,2	6,15
AUR	Acide urique	Méthode enzymatique	Uricase -POD-Chromogène	546 nm	11,9-1487 μ mol/L	1,8	6,09
CA	Calcium	Méthode colorimétrique	NM-BAPTA	340 nm	0,20-5 mmol/L	1,8	3,65
CK	Créatine kinase	Méthode enzymatique	IFCC - NAC activé	340 nm	0,12-33,4 μ kat/L	1,7	5,11
CRE	Créatinine	Méthode colorimétrique	Jaffé cinétique compensée	505 nm	15-2200 μ mol/L	4,0	9,31
CRP	Protéine C réactive	Immuno-turbidimétrie	Particules de latex recouvertes d'Ac murin anti-CRP	570 nm	0,3-350 mg/L	3,8	8,13
CT	Cholestérol total	Méthode enzymatique	Cholestérol estérase, cholestérol oxydase - POD-chromogène	505 nm	0,1-20,7 mmol/L	3,2	8,76
GGT	Gamma glutamyl transférase	Méthode enzymatique	SZASZ	415 nm	0,05-20,0 μ kat/L	1,8	5,99
LDH	Lactate déshydrogénase	Méthode enzymatique	IFCC (lactate \rightarrow pyruvate)	340 nm	0,17-16,7 μ kat/L	2,8	6,85
LIP	Lipase	Méthode enzymatique	Ester de 1,2-O-dilauryl-rac-glycéro-3-acide glutarique	570 nm	0,05-5,01 μ kat/L	2,7	8,17
Mb	Myoglobine	Méthode immuno-chimique	Sandwich-électrochimiluminescence, Ruthénium	-	21-3000 μ g/L	5,3	10,27
Mg	Magnésium	Méthode colorimétrique	Bleu de xylidyle	600 nm	0,10-2,0 mmol/L	2,7	4,37
NT-pro BNP	Fragment N-Terminal du précurseur du peptide natriurétique de type B	Méthode immuno-chimique	Sandwich-électrochimiluminescence, Ruthénium	-	5-35000 ng/L	8,3	9,03
P	Phosphore	Méthode colorimétrique	Molybdate d'ammonium	340 nm	0,10-6,46 mmol/L	2,8	6,27
PAL	Phosphatases alcalines	Méthode enzymatique	IFCC avec tampon aminométhyl propanol	450 nm	0,084-20,0 μ kat/L	3,7	7,25
PT	Protéines totales	Méthode colorimétrique	Biuret avec iodeure de potassium	546 nm	2,0-120 g/L	1,7	4,27

ANNEXE XII

Intérêt clinique des paramètres dosés [58,62,71]

Paramètre	Intérêt clinique
Glucose	Le glucose est le principal aliment énergétique des cellules. Son taux dans le sang est régulé en fonction de nos besoins. Un taux anormal de glucose (bas ou élevé) peut être lié à un diabète.
Urée	L'urée est une molécule qui résulte d'un processus de dégradation des protéines. C'est la forme principale d'élimination des déchets azotés, par l'urine. C'est l'azote des protéines qui, combinée avec des molécules produites par le foie, constitue l'urée. Le dosage de l'urée permet, avec d'autres mesures, d'évaluer la fonction rénale, particulièrement la présence d'une insuffisance rénale. Il est aussi prescrit pour surveiller la fonction rénale des personnes atteintes de diabète ou ayant subi un infarctus du myocarde. En effet, lorsque les reins ne fonctionnent plus normalement, il y a une augmentation dans le sang des concentrations d'urée, de créatinine et d'acide urique. Certaines pathologies du foie peuvent également affecter le taux d'urée dans le sang.
Acide urique	L'acide urique est un métabolite des purines, des acides nucléiques et des nucléoprotéines. Par conséquent, des taux anormaux peuvent indiquer un trouble dans le métabolisme de ces substances. Une hyperuricémie peut être observée dans la dysfonction rénale, la goutte, la leucémie, la polyrythmie, l'athérosclérose, diabète, hypothyroïdie, ou dans certaines maladies génétiques. Une hypouricémie est présente chez les patients atteints de la maladie de Wilson
Sodium	Le sodium est l'un des <u>électrolytes du corps</u> , dont l'organisme a besoin en quantités relativement importantes. La plupart du sodium de l'organisme (97%) est située dans le sang et dans les liquides présents autour des cellules (liquides interstitielles). Le sodium permet de maintenir un équilibre liquidien normal. Il joue un rôle clé dans la fonction nerveuse et musculaire normale. Les reins qui fonctionnent normalement, conservent un niveau constant de sodium dans l'organisme en faisant varier la quantité de sodium excrétée dans l'urine. Quand la consommation et la perte de sodium ne sont pas équilibrées, la quantité totale de sodium de l'organisme est affectée. L'hyponatrémie survient lorsque l'organisme contient peu de <u>sodium</u> par rapport à la quantité de liquides qu'il contient, par exemple, les vomissements ou la diarrhée entraînent une perte de sodium. Lorsque les pertes de liquides sont comblées avec de l'eau, le sodium est dilué. Certains troubles, tels que les maladies rénales, la <u>cirrhose</u> et l' <u>insuffisance cardiaque</u> , peuvent entraîner une rétention du sodium et des liquides dans l'organisme. Certaines affections peuvent provoquer une consommation d'eau excessive (polydipsie), qui peut contribuer au développement d'une hyponatrémie. L'hypernatrémie découle d'une insuffisance d'apport hydrique dans un organisme impliquant alors une <u>déshydratation intracellulaire</u> ; il s'agit de ce qui se passe lorsqu'un organisme ne boit pas assez d' <u>eau</u> . Cela peut aussi être dû à une perte excessive d'eau au niveau <u>rénal</u> ou cutané à la suite d'une <u>brûlure</u> étendue ou lors d'un effort physique important, si les apports en eau ne compensent pas cet excès de perte.
Potassium	Le potassium est un cation de répartition essentiellement intracellulaire (97%), et seulement 3% dans le fluide extra cellulaire. Le <u>potassium</u> est nécessaire au fonctionnement normal des cellules, des nerfs et des muscles. L'organisme doit maintenir le taux de potassium dans le sang dans des limites très étroites. Un taux de potassium trop élevé (<u>hyperkaliémie</u>) ou trop bas (<u>hypokaliémie</u>) peut avoir de graves conséquences, comme des anomalies du rythme cardiaque. Le vaste réservoir de potassium stocké à l'intérieur des cellules peut être utilisé par l'organisme pour maintenir un taux de potassium constant dans le sang. L'hypokaliémie traduit souvent une déplétion importante du stock potassique de l'organisme. Elle se résume en trois manifestations essentielles qui sont : Cardiaques, avec des troubles du rythme qui peuvent être sévères. Neuromusculaires, avec apparition de paralysie dans les formes les plus importantes. Rénales, avec des perturbations fonctionnelles et un risque de lésion organique. Les deux causes plus fréquentes de l'hypokaliémie sont : La perte digestive de potassium, lors de <u>diarrhées</u> aiguës et de <u>vomissements</u> ou à la suite d'aspirations digestives. L'hyperkaliémie quand elle est modérée ne provoque que des symptômes légers ou est totalement asymptomatique. Parfois, elle peut être associée à une faiblesse musculaire. Dans une maladie rare appelée paralysie périodique familiale hyperkaliémique, les personnes ont des crises de faiblesse qui peuvent évoluer en paralysie. Dans la forme plus grave de l'hyperkaliémie, elle peut entraîner des <u>troubles du rythme cardiaque</u> . Si le taux est très élevé, un arrêt

Annexes

	cardiaque peut se produire.
ALAT	Alanine aminotransférase (ALT), également appelée pyruvate de glutamate transaminase (GPT), est une enzyme impliquée dans le métabolisme des acides aminés. On la trouve dans de nombreux tissus, mais les niveaux les plus élevés se trouvent dans le foie et le rein. La destruction des tissus entraîne sa libération. Dans le sang circulant le niveau d'ALT sériques notablement élevés peut être trouvée dans une variété de maladies qui impliquent le foie, tels que l'hépatite, la mononucléose infectieuse et la cirrhose. Ces très hauts niveaux d'ALT ne sont généralement pas observés dans d'autres processus pathologiques, par exemple l'infarctus du myocarde ; ainsi, ALT est considéré comme un indicateur raisonnablement spécifique de la maladie du foie.
ASAT	Aspartate aminotransférase (AST), également dénommé glutamate oxaloacétate transaminase (GOT), fait partie d'un groupe d'enzymes qui catalyse l'interconversion des acides aminés et des α -cétoacides par transfert de groupes amino. L'AST et l'alanine aminotransférase (ALT) se trouvent normalement dans la plupart des fluides corporels, mais pas dans l'urine, sauf en cas de lésions rénales. Les plus grandes concentrations d'AST se trouvent dans les tissus cardiaques, hépatiques, musculaires et rénaux, une atteinte de ces tissus peut grandement élever les taux sériques d'AST. Après l'infarctus du myocarde par exemple. Les valeurs sériques peuvent augmenter de 10 à 15 fois la normale et l'augmentation est à peu près proportionnelle au degré de lésion tissulaire.
PAL	La phosphatase alcaline humaine est constituée d'un groupe d'au moins cinq iso enzymes spécifiques des tissus qui catalysent l'hydrolyse de mono ester de phosphate à pH alcalin. Une variété de processus pathologiques peut entraîner la libération de quantités accrues de phosphatase alcaline dans le sang.
GGT	La gamma-GT (γ -GT ou gamma glutamyl-transpeptidase ou gamma glutamyl-transférase) est une enzyme qui existe au niveau de la membrane cellulaire de nombreux organes comme les reins ou le pancréas. Mais son activité dans le sang est essentiellement d'origine hépatique. Son taux augmente en cas de consommation excessive d'alcool par exemple. Son dosage permet aussi de détecter d'autres affections hépatobiliaires ou des tumeurs hépatiques
Bili T	La bilirubine est un pigment de couleur jaune qui provient de la dégradation de l'hémoglobine. présent dans la bile et en faible quantité dans le sang. Une accumulation de bilirubine dans l'organisme se traduit par une jaunisse. Une bilirubine élevée peut être le signe d'une hépatite
Bili D	Le dosage de la bilirubine directe est utilisé pour la quantification de la bilirubine directe dans le sérum ou le plasma humain.
LDH	la Lactate deshydrogénase est une enzyme intra cellulaire contenue dans la pluparts des tissus (myocarde, foie, le rein, cerveau muscle strier) et les cellules sanguines (essentiellement la lignée érythrocytaire et myelocytaire) la LDH C'est une enzyme importante dans la transformation des sucres en énergie. Son augmentation témoigne d'un dommage tissulaire dans l'organisme qui peut être le résultat d'une grande variété de situations pathologiques. Elle a longtemps été utilisée pour aider au diagnostic de l'infarctus du myocarde avant d'être remplacée par la troponine
Calcium	La majorité du calcium dans le corps est présente dans les os. Le reste du calcium se trouve dans le sérum et à diverses fonctions. Par exemple, les ions calcium diminuent l'excitabilité neuromusculaire, participent dans le sang à la coagulation et l'activation de certaines enzymes. L'hypercalcémie peut résulter de l'hyperparathyroïdie, de l'hypervitaminose D, myélome multiple et certaines maladies néoplasiques des os .L'hypocalcémie peut résulter de l'hyperparathyroïdie, de l'hypo albuminémie, insuffisance rénale et pancréatite.

Résumé

L'étude de l'influence de l'hémolyse a été déterminée expérimentalement pour 12 paramètres biochimiques dosés sur l'analyseur de biochimie ARCHITECT Ci4100 ABBOTT® et l'analyseur d'électrolytes AVL9180®. La méthode de surcharge a été utilisée pour créer une gamme d'hémoglobine de concentrations croissantes variant de 0 à 3.6 g/L (0 à 216µmol/L). La limite de 10 % de variation a été choisie pour définir une influence sur la mesure. Les paramètres étudiés ont été classés en trois catégories : ceux qui ne présentent pas d'interférences décelables (Glucose, Urée, Acide urique, GGT, PAL et Sodium), ceux qui sont influencés positivement (ASAT, ALAT, LDH et Potassium) et ceux qui sont influencés négativement (Bilirubine totale et Bilirubine directe). Le moyen de prévention de cette interférence reste la maîtrise de l'étape pré-analytique ; à savoir le respect des bonnes conditions de prélèvement, de transport, de conservation et de prétraitement des échantillons notamment la centrifugation. D'autre part, la connaissance de la variabilité de cette interférence permet au biologiste d'adapter ses modalités de compte rendu dans le cas d'échantillons plasmatiques hémolysés.

Mots clés : Hémolyse, hémolysât, Interférence, Hémoglobine, LDH, K+, prélèvement

Summary

The study of the influence of hemolysis was determined experimentally for 12 biochemical parameters assayed on the ABBOTT® ARCHITECT Ci4100 Biochemistry Analyzer and the AVL9180® Electrolyte Analyzer. The over load method was used to create a hemoglobin range of increasing concentrations varying from 0 to 3.6 g / L (0 to 216µmol / L). The limit of 10% variation was chosen to define an influence on the measurement. The parameters studied were classified in three categories: those that do not exhibit detectable interferences (Glucose, Urea, and uric acid, GGT, PAL and Sodium), those that are positively influenced (ASAT, ALT, LDH and Potassium) and those which are negatively influenced (total bilirubin and direct bilirubin). The means of preventing this interference remains the control of the pre-analytical stage; namely the respect of the good conditions of sampling, transportation, preservation and pretreatment of samples the centrifugation in particular. On the other hand, the knowledge of the variability of this interference allows the biologist to adapt this reporting modalities in the case of hemolysis plasmatic samples.

Key words: Hemolysis, hemolysate, Interference, Hemoglobin, LDH, K +, specimen