

# TRAVAUX PRATIQUES

Le ver à soie, *Bombyx mori*, produit la soie naturelle. Son alimentation est exclusivement constituée de feuilles de mûrier. Le rendement de production dépend de la qualité des feuilles de mûrier et de l'état sanitaire des vers.

Le contrôle de qualité de cette production exige l'étude des microorganismes susceptibles d'infecter les feuilles ou les vers.

La première partie du travail proposé est une étude microbiologique qui portera sur deux microorganismes potentiellement incriminés.

Les allergies provoquées par la séricine de la soie sont prises en compte par la médecine du travail dans les magnaneries. Elles peuvent conduire à des troubles respiratoires limitant les échanges gazeux et donc le transport de dioxygène dans le sang.

Dans la deuxième partie de ce travail, différents tests et dosages biologiques seront réalisés afin d'étudier ces phénomènes allergiques.

## ETUDE MICROBIOLOGIQUE

### 1 Etude de *Sporobolomyces salmonicolor*, levure phytopathogène

La levure phytopathogène, *Sporobolomyces salmonicolor*, a été isolée à partir de feuilles de mûrier. Une description de la levure est donnée en **annexe 1**. Une infusion de feuilles de mûrier infectées par cette levure a été réalisée.

#### 1.1 Dénombrement en milieu liquide par la méthode 2 tubes

##### 1.1.1 Matériels et réactifs

séries de tubes de milieux Sabouraud ensemencés par des dilutions de l'infusion et incubés 24 heures à 30°C

##### 1.1.2 Résultats

Réaliser la lecture.

Déterminer la concentration en levure de l'infusion (nombre de levures par mL d'infusion) à l'aide de la table de Mac Grady donnée en **annexe 2**.

#### 1.2 Numération des levures en hématimètre

##### 1.2.1 Matériels et réactifs

aliquote de l'infusion en tube noté L

hématimètre de Malassez avec lamelle  
compte-globules

### 1.2.2 Mode opératoire

Réaliser une numération en hématimètre de Malassez (voir **annexe 3**).

### 1.2.3 Résultats

Calculer la concentration en levure de l'infusion (nombre de levures par mL d'infusion).

## 1.3 Conclusion

Comparer les deux valeurs obtenues et conclure.

# 2 Etude de moisissures, agents infectieux de Bombyx mori

## 2.1 Suivi de croissance de Beauveria bassiana

### 2.1.1 Matériels et réactifs

pré-culture de 18h de Beauveria bassiana en milieu Sabouraud notée « pré-culture BB »  
fiolle d'Erlenmeyer de 90 mL de milieu Sabouraud liquide  
pipette graduée 10 mL stérile  
acuboy (propipette électrique)  
6 cuves à électrophorèse avec portoir  
boîte avec Parafilm prédécoupé  
pipettes Pasteur  
pipette automatique avec 5 embouts « paille » adaptables  
spectrophotomètre  
flacon contenant 15 mL de milieu Sabouraud liquide stérile noté « Sabouraud »

### 2.1.2 Mode opératoire

#### Etape 1 :

Ensemencer avec 10 mL de « pré-culture de BB » les 90 mL de milieu Sabouraud liquide contenus dans la fiole d'Erlenmeyer. On obtient la « culture BB ».

#### Etape 2 :

Prélever **immédiatement** à l'aide d'une pipette Pasteur un aliquote de la « culture BB » et le transférer dans une cuve de spectrophotomètre à remplir au 2/3. Boucher la cuve avec du Parafilm.

Homogénéiser et lire l'absorbance à 600 nm contre le milieu Sabouraud liquide. Cette mesure correspond au temps  $t = 0$  minute.

#### Etape 3 :

Placer ensuite la fiole d'Erlenmeyer de « culture BB » dans l'agitateur thermostaté.

#### Etape 4 :

Prélever stérilement des aliquotes de « culture BB » pour mesurer l'absorbance à 600 nm aux temps  $t = 1$  heure,  $t = 2$  heures et  $t = 3$  heures.

### Etape 5 :

Aux temps  $t = 4$  heures et  $t = 5$  heures, effectuer une dilution de la « culture BB » directement dans la cuve pour mesurer l'absorbance à 600 nm :

- à l'aide d'une pipette paille, introduire 2 fois 1 mL de milieu Sabouraud stérile dans la cuve ;
- à l'aide de la même pipette paille, introduire 1 mL de la « culture BB » prélevée au temps = 4 heures ou 5 heures dans la cuve précédente.

Boucher la cuve avec un Parafilm.

Homogénéiser et lire l'absorbance à 600 nm.

Remarque : en fin de manipulation, vider les cuves dans une bassine de Javel.

#### 2.1.3 Exploitation des résultats

Présenter les résultats expérimentaux dans un tableau.

Tracer la courbe  $\text{Ln } A = f(t)$  sur papier millimétré.

Déterminer les paramètres de la croissance en justifiant les calculs.

## 2.2 Observation et identification des moisissures

La lame numérotée correspondant à un état frais d'une moisissure colorée au bleu coton.

Observer la lame au microscope. Montrer l'observation à un examinateur.

Faire un schéma légendé de l'observation.

A l'aide des **annexes 4A à 4E**, identifier la moisissure.

# TESTS ET DOSAGES BIOLOGIQUES

## 3 Etude de deux manifestations allergiques à la séricine

Des manifestations hématologiques et sérologiques peuvent survenir à la suite d'une réaction allergique. Elles sont étudiées chez un homme de 35 ans présentant des signes d'allergie à la séricine.

### 3.1 Etude des manifestations hématologiques

#### 3.1.1 Réalisation de frottis sanguins

A partir d'un échantillon de sang veineux du sujet prélevé sur EDTA, réaliser deux frottis sanguins dont un sera coloré par la technique de May-Grünwald Giemsa (mode opératoire fourni dans l'**annexe 5**).

#### 3.1.2 Lecture d'un frottis sanguin fourni coloré par la technique de May-Grünwald Giemsa

3.1.2.1 Réaliser l'examen cytologique et la formule leucocytaire.

Le nombre de leucocytes par litre de sang est indiqué sur la lame.

Conclure.

Donnée : tableau des valeurs de référence de la numération des leucocytes et de la formule leucocytaire chez l'adulte

Cellules	Nombre en Giga par litre de sang
leucocytes	4 à 10
polynucléaires neutrophiles	1,7 à 7
polynucléaires éosinophiles	0,05 à 0,5
polynucléaires basophiles	0,01 à 0,05
lymphocytes	1,5 à 4
monocytes	0,1 à 1

3.1.2.2 Montrer à l'examineur une cellule appartenant à la population cellulaire présente en nombre anormal sur le frottis.

## 3.2 Etude des manifestations sérologiques

### 3.2.1 Dosage des immunoglobulines E totales par la technique d'immunodiffusion radiale de Mancini

Réaliser ce dosage sur le sérum du sujet à l'aide du mode opératoire fourni en **annexe 6**.

### 3.2.2 Résultats

Lire les résultats obtenus sur une boîte après 48 heures d'incubation en chambre humide et les présenter dans le tableau de l'**annexe 7**.

En déduire la concentration en IgE totales du sujet. Conclure.

Donnée : valeur de référence de la concentration moyenne en IgE totales = 0,4 mg/L

## 4 Etude de la capacité de transport du dioxygène du sang

Le fer sérique est transporté dans le sang par une protéine, la transferrine. Dans la moelle osseuse, il est incorporé à l'hémoglobine des érythroblastes.

Le fer est un élément indispensable à l'érythropoïèse. Un bilan hématologique complet nécessite un dosage de la sidérémie parallèlement à la détermination de certains paramètres de la lignée rouge : taux d'hémoglobine, hématocrite et numération des globules rouges.

### 4.1 Dosage du fer sérique par méthode spectrophotométrique

#### 4.1.1 Matériel et réactifs

sérum à doser

surnageant de saturation noté « Ssat » obtenu selon le protocole donné en **annexe 8**

fiche technique du coffret Ferrimat-Kit (BioMérieux) donnée en **annexe 9**

réactifs du coffret Ferrimat-Kit (BioMérieux) :

solution de travail **déjà** prête à l'emploi

solution étalon à 2 mg de fer.L<sup>-1</sup> (R1)

#### 4.1.2 Mode opératoire

Le fer sera dosé sans déprotéinisation préalable selon la fiche technique donnée en **annexe 9**.

Préparer en tube à hémolyse, à partir de la solution étalon à  $2 \text{ mg fer.L}^{-1}$ , quatre solutions étalons de concentration de 0,5 à 2,0 mg de fer.L<sup>-1</sup>.

Doser le fer des quatre solutions étalons, du sérum à doser et du surnageant de saturation.

#### 4.1.3 Résultats

Expliquer la préparation des solutions étalons.

Présenter le protocole utilisé et les résultats dans un tableau.

Tracer la courbe d'étalonnage.

Déterminer la concentration molaire en fer du sérum à doser.

Déterminer la capacité totale de fixation du fer en  $\text{mmol.L}^{-1}$ .

Calculer le pourcentage de saturation de la transferrine du sérum à doser.

Donnée : CV de la méthode = 3 %

## 4.2 Dosage de l'hémoglobine érythrocytaire par méthode spectrophotométrique

### 4.2.1 Principe

En présence d'ammoniaque, la totalité de l'hémoglobine contenue dans l'échantillon se trouve sous forme d'oxyhémoglobine dont l'absorbance est mesurée à 580 nm.

La concentration en oxyhémoglobine de l'échantillon est déterminée par comparaison à un étalon.

### 4.2.2 Matériel et réactifs

solution d'ammoniaque à  $0,12 \text{ mol.L}^{-1}$

sang à doser

sang étalon à  $150 \text{ g hémoglobine.L}^{-1}$

### 4.2.3 Mode opératoire

Dans un tube à essai, introduire 10 mL d'ammoniaque à  $0,12 \text{ mol.L}^{-1}$ .

Ajouter 100  $\mu\text{L}$  de sang en introduisant le cône environ 1 cm en dessous de la surface de la solution d'ammoniaque. Bien rincer le cône avec la solution présente en surface.

Agiter. Lire l'absorbance à 580 nm après 1 minute.

### 4.2.4 Résultats

Calculer la concentration massique en hémoglobine du sang à doser.

Calculer la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine TCMH.

Données : CV de la méthode = 3%  
nombre d'hématies par litre de sang =  $4,5 \text{ T.L}^{-1}$

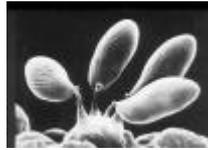
## ANNEXE 1

### Sporobolomyces salmonicolor

**Classe** Basidiomycètes

**Habitat** air, végétaux

**Description** capsule polysaccharidique contenant du xylose  
levure formant des bourgeonnements  
taille : 8 à 25  $\mu\text{m}$  sur 2,5 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre  
présence de basidiospores formées sur un stérigmate pointu  
basidiospores de grande taille : 6 à 18  $\mu\text{m}$  sur 2,5 à 7  $\mu\text{m}$  - aplaties sur un de leurs côtés



Basidiospores

**Pathogénicité** phytopathogène  
rarement impliquée en pathologie humaine  
à l'origine de pneumopathies et de septicémies chez le sidéen

## ANNEXE 2

### Table de Mac Grady 2 tubes

**Détermination du nombre le plus probable  
par une technique de dénombrement en milieu liquide**

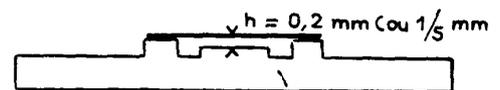
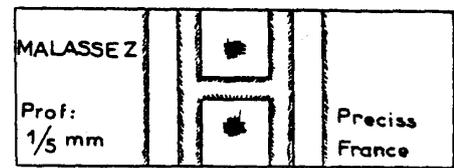
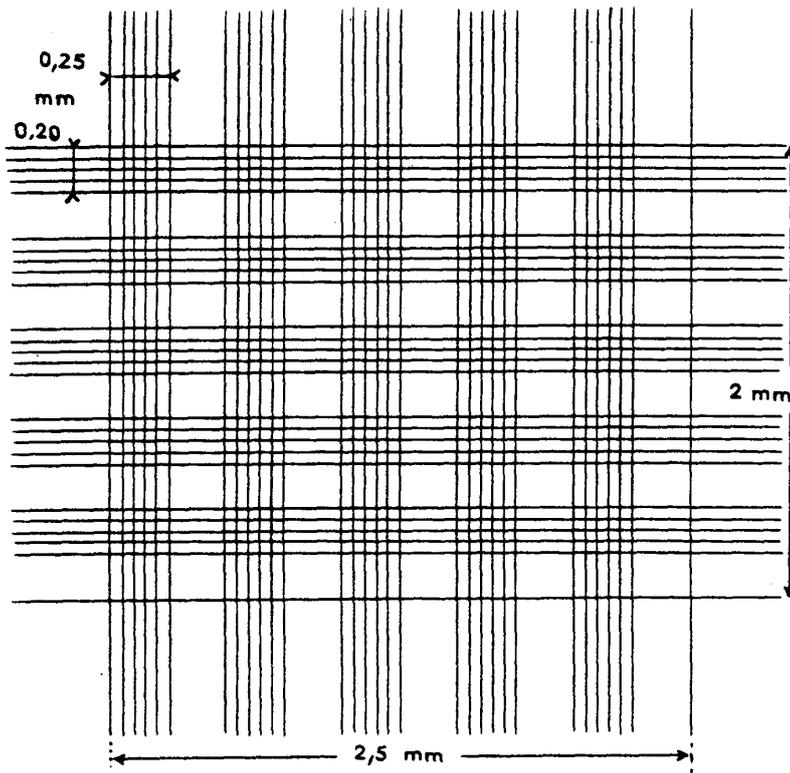
Nombre caractéristique	nombre de cellules par ml	Nombre caractéristique	nombre de cellules par ml
000	0.0	121	3.0
001	0.5	200	2.5
010	0.5	201	5.0
011	0.9	210	6.0
020	0.9	211	13.0
100	0.6	212	20.0
101	1.2	220	25.0
110	1.3	221	70.0
111	2.0	222	110.0
120	2.0		

## ANNEXE 3

### Caractéristiques de l'hématimètre de Malassez

**Chambre de comptage :** rectangle constitué de 100 petits rectangles (unités de comptage)  
longueur = 2,5 mm  
largeur = 2,0 mm  
profondeur = 0,2 mm

**Unité de comptage :** longueur = 0,25 mm  
largeur = 0,2 mm  
profondeur = 0,2 mm



## ANNEXE 4A

### Tableau d'identification des moisissures

<b>Groupes</b>	<b>Phycomycètes</b>	<b>Ascomycètes</b>	<b>Basidiomycètes</b>	<b>Deutéromycètes</b>
remarques générales	Phycomycètes vrais et zygomycètes	nombreuses levures	quelques espèces de levures	« Fungi imperfecti » nombreuses espèces de levures
septum	non (hyphes coenotypiques)	oui mycélium cloisonné (sauf les levures)	oui champignons supérieurs	oui
reproduction	sexuée par zygospores  asexuée (spores endogènes)	sexuée par ascospores  asexuée par sporulation exogène ou par bourgeonnement	sexuée par basidiospores (asexuée)	uniquement asexuée (sporulation exogène)
autres caractères distinctifs	champignons aquatiques	thalle lévuriforme présence d'asques	présence de basides	

## ANNEXE 4B

### MUCORALES

- Groupe des zygomycètes - ordre des Mucorales
- 4 genres différents : Rhizopus – Absidia – Mucor – Rhizomucor

#### CARACTERISTIQUES DU GROUPE

##### Aspect microscopique

mycélium non cloisonné coenocytique (mycélium siphonné : siphomycète)

reproduction sexuée (par zygospores)

reproduction asexuée par spores endogènes immobiles (type sporangiospore)

##### Aspect macroscopique

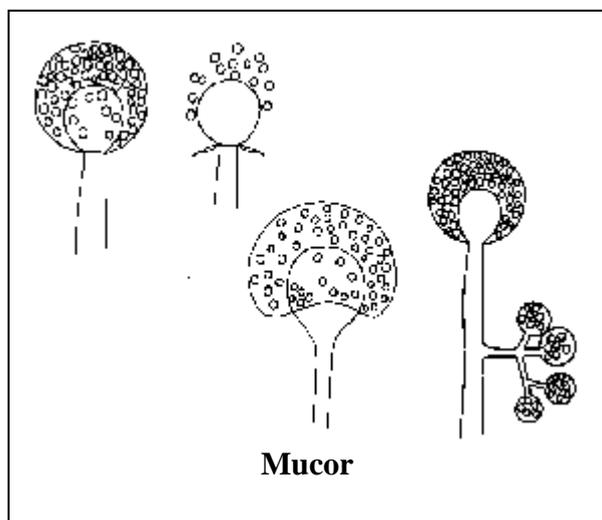
colonies assez cotonneuses avec mycélium aérien

croissance rapide

colonies blanc brun au départ puis gris noir par la suite

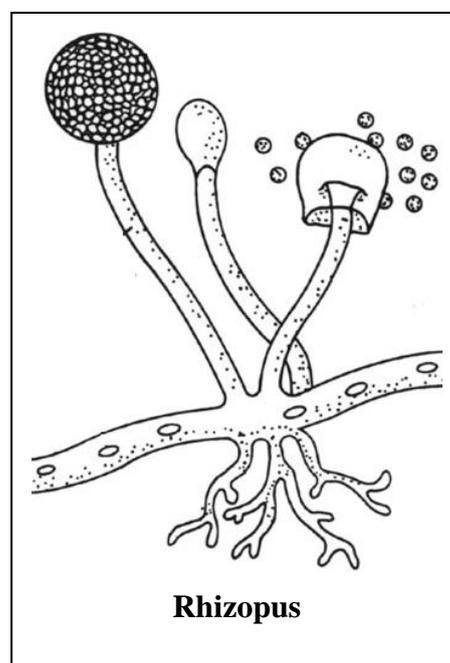
#### CARACTERISTIQUES DU GENRE

<b>Rhizopus</b>	<b>Absidia</b>	<b>Mucor</b>
rhizoïdes (sortes de racines)	rhizoïdes (sortes de racines)	
spores endogènes	spores endogènes	spores endogènes
sporangiophore ramifié éventuellement	sporangiophore piriforme	sporangiophore sphérique



D'après

<http://www.kcom.edu/faculty/chamberlain/Website/Lects/Fungi.htm>



D'après

<http://www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds/Aspergillus.html>

## ANNEXE 4C

### ASPERGILLUS

- Groupe des Deutéromycètes (champignons imparfaits)
- Genre Aspergillus

#### CARACTERISTIQUES DU GROUPE

##### Aspect microscopique

mycélium cloisonné

reproduction asexuée par spores exogènes (types conidiospores)

spores retrouvées en chaînette dues au bourgeonnement de cellules spécialisées appelées phialides

#### CARACTERISTIQUES DU GENRE

##### Conidiophore (organe de fructification portant les spores)

aspect plutôt renflé en forme de vésicule

porteur de phialides ou stérigmates (prolongements sur lesquels sont accrochées les spores ou conidies ou conidiospores)

phialides groupées en une ou plusieurs couronnes autour du conidiophore

tête aspergillaire : ensemble constitué du conidiophore et des phialides

#### CARACTERISTIQUES D'ESPECE

Trois espèces principales : *Aspergillus niger* - *Aspergillus fumigatus* - *Aspergillus flavus*

Différence entre les espèces : aspects macroscopique et microscopique

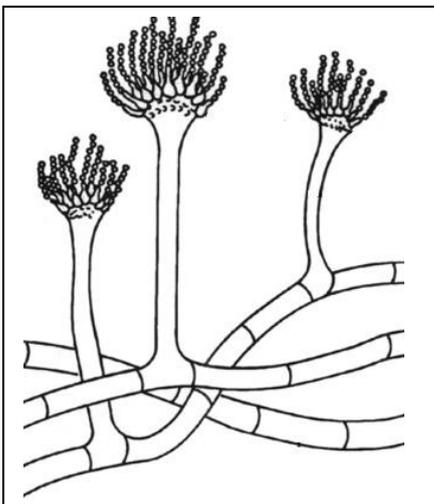
en particulier, aspect de la tête aspergillaire, unisériée (1 seule couronne de phialides autour du conidiophore) ou bisériée (2 couronnes de phialides autour du conidiophore)

#### Tableau d'identification :

	<b><i>Aspergillus niger</i></b>	<b><i>Aspergillus fumigatus</i></b>	<b><i>Aspergillus flavus</i></b>
<b>mycélium</b>			
aspect	granuleux	velouté avec touffes blanches et cotonneuses	poudreux irrégulier
couleur verso	brun foncé – noir	vert puis gris (ou blanc)	vert jaune
couleur revers	incoloré ou jaune pâle	incoloré à jaune puis rouge foncé	incoloré à jaunâtre puis brun
conidiophore	long, sphérique	court, incoloré et élargi	paroi piquetée et sphérique
stérigmates	unisériés	unisériés	unisériés ou bisériés
conidies	colonne divergente échinulée brunes	courtes chaînettes de spores globuleuses vertes ou échinulées	spores piriformes à globuleuses jaunes-vertes

échinulé : en forme d'oursin

piriforme : en forme de poire



D'après

<http://www.kcom.edu/faculty/chamberlain/Website/Lects/Fungi.htm>

## ANNEXE 4D

### GEOTRICHUM

- Groupe des Deutéromycètes
- Genre Geotrichum

#### CARACTERISTIQUES DU GROUPE

##### Aspect microscopique

mycélium cloisonné

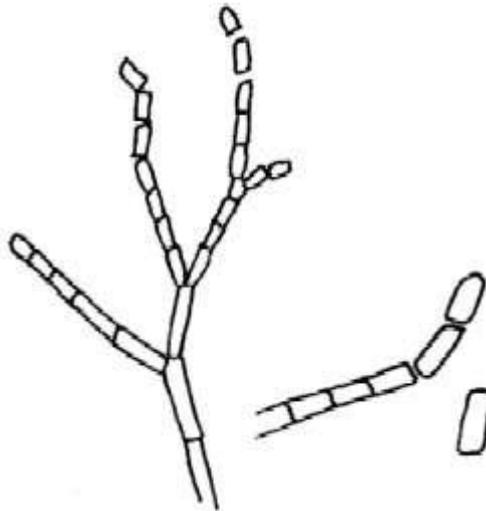
reproduction asexuée par spores exogènes (type arthrospore)

#### CARACTERISTIQUES DU GENRE

arthrosporulation

#### CARACTERISTIQUES D'ESPECE

espèce la plus connue : *Geotrichum candidum*



D'après

<http://www.univ-brest.fr/esmisab/sitesc/Myco/fiches/geotcand.html>

## ANNEXE 4E

### PENICILLIUM

- Groupe des Deutéromycètes (champignons imparfaits) ou des Ascomycètes
- Genre *Penicillium*

#### CARACTERISTIQUES DU GROUPE

##### Aspect microscopique

mycélium cloisonné

reproduction asexuée par spores exogènes (types conidiospores)

spores retrouvées en chaînette dues au bourgeonnement de cellules spécialisées appelées phialides

#### CARACTERISTIQUES DU GENRE

##### Appareil sporifère (organe de fructification portant les spores)

aspect non renflé en forme de pinceau

conidiophores souvent ramifiés à leurs extrémités en phialides sur lesquels sont accrochées les spores

conidiophores terminés par un pénicille (sorte de pinceau)

pénicilles constitués de verticilles (anneau formé d'une rangée de cellules situées entre le conidiophore et les conidies) :

verticilles simples de phialides : monoverticillé

verticilles ramifiés avec deux rangées de phialides : biverticillé

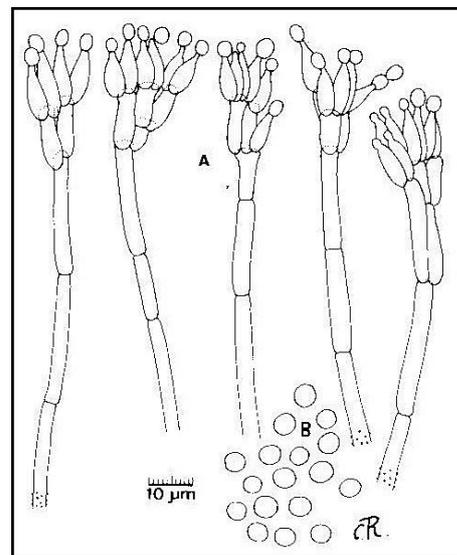
verticilles ramifiés avec plusieurs rangées de phialides : triverticillé, quadriverticillé

#### CARACTERISTIQUES D'ESPECE

Différence entre les espèces : basée sur les aspects macroscopique et microscopique

##### Tableau d'identification :

	<b><i>Penicillium chrysogenum</i></b>	<b><i>Penicillium camembertii</i></b>	<b><i>Penicillium italicum</i></b>
aspect du mycélium	colonies veloutées sous section velutina	colonies laineuses sous section lanata	colonies granuleuses sous-section fasciculata
conidiophore	triverticillé asymétrique phialides ampouliformes	triverticillé asymétrique	biverticillé en faisceau asymétrique phialides cylindriques
conidies	sphériques	sphériques en petite chaîne désordonnée	cylindriques à elliptoïdes
remarque	utilisé pour la production industrielle de pénicilline	aspect duveteux et laineux du camembert	responsable de la pourriture des agrumes



D'après

<http://www.univ-brest.fr/esmisab/sitesc/Myco/fiches/Pcamem>

## ANNEXE 5

### Coloration par la technique de May-Grünwald Giemsa

#### Fixation

Placer la lame, frottis vers le haut, horizontalement sur un support dans une boîte de Pétri.  
Recouvrir le frottis avec 15 à 20 gouttes de May-Grünwald.  
Fermer avec le couvercle et laisser agir 3 minutes.

#### Coloration par le colorant de May-Grünwald

Ajouter autant d'eau neutre que de gouttes de colorant, puis mélanger eau et colorant en inclinant doucement la lame.  
Laisser agir 1 minute.  
Rincer délicatement par un jet d'eau neutre.

#### Coloration par le colorant de Giemsa

Préparer la dilution du colorant de Giemsa pendant les temps d'attente : introduire dans la boîte de Laveran 30 mL d'eau neutre (éprouvette) et 40 gouttes de Giemsa dans un angle, sans mélanger.  
Placer la lame, frottis vers le bas, dans la boîte de Laveran. Fermer avec le couvercle et agiter doucement pour mélanger l'eau et le colorant.  
Laisser agir 10 minutes.  
Rincer délicatement par un jet d'eau neutre.

#### Séchage

Essuyer la face opposée au frottis avec du papier filtre et laisser sécher à l'air, en position inclinée.  
Attendre au moins 5 minutes avant l'examen microscopique du frottis.

## ANNEXE 6

### Dosage des Ig E totales dans un sérum par la technique de Mancini

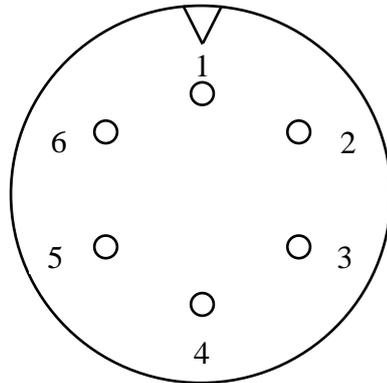
#### 1. Matériel et réactifs

plaque de gel contenant des Ac anti-IgE de lapin  
micropipette capillaire avec pipette automatique de 15  $\mu\text{L}$   
emporte-pièce pour perforer les puits (diamètre 2,5 mm)  
solutions étalons d'IgE titrées à 10  $\text{mg.L}^{-1}$  - 6  $\text{mg.L}^{-1}$  - 4  $\text{mg.L}^{-1}$  - 2  $\text{mg.L}^{-1}$  - 1  $\text{mg.L}^{-1}$   
50  $\mu\text{L}$  de sérum X du patient

#### 2. Mode opératoire

##### 2.1. Perforation des puits dans le gel

A l'aide de l'emporte pièce, creuser 6 puits selon la matrice ci-dessous.



##### 2.2. Dépôt des solutions d'IgE

**Solutions étalons d'IgE :** répartir 15  $\mu\text{L}$  de chaque solution étalon d'IgE dans les puits numérotés 1, 2, 4 et 5, en partant de la concentration la plus faible.

**Sérum X à doser :** répartir 20  $\mu\text{L}$  de sérum X dans les puits numérotés 3 et 6.

##### 2.3. Diffusion des solutions d'IgE dans le gel

Laisser diffuser à température ambiante (18°C à 20°C) pendant 48 à 50 heures en atmosphère humide.

## ANNEXE 7

### Tableau à rendre avec la copie

Poste n° : .....

Puits n°	1	2	3	4	5	6
concentration IgE totale ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )						
D (mm)						
D <sup>2</sup> (mm <sup>2</sup> )						

## ANNEXE 8

### Détermination de la capacité totale de fixation du fer d'un sérum

La capacité totale de fixation du fer par la transferrine est déterminée après saturation de celle-ci par une solution de fer ferrique et adsorption de l'excès sur hydroxycarbonate de magnésium.

#### Saturation de la transferrine :

Dans un tube à centrifuger conique, introduire :  
0,5 mL de sérum à doser,  
1 mL de solution saturante de fer.

Bien mélanger.

Laisser reposer 5 à 10 minutes.

Ajouter 200 mg d'hydroxycarbonate de magnésium et mélanger.

Attendre 20 à 30 minutes en agitant plusieurs fois.

Centrifuger 10 minutes à 1000 g.

On obtient le surnageant de saturation noté « Ssat ».

## ANNEXE 9

### Dosage du fer sérique par méthode spectrophotométrique

#### Ferrimat-Kit

Dosage du fer sans déprotéinisation, dans sérum et plasma humains.

#### INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

Un adulte sain possède environ 4 g de fer. Il se répartit en :

- Fer hémique (à l'état  $Fe^{++}$ ) : environ 60 % du fer de l'organisme se trouve dans l'hémoglobine et environ 5% dans la myoglobine. Une très faible quantité entre dans la composition d'enzymes respiratoires cellulaires (oxydases, peroxydases, catalases, enzymes du cycle de Krebs, cytochromes...).

- Fer non hémique (à l'état  $Fe^{+++}$ ) : environ 35 % du fer total est stocké (lié à la ferritine et à l'hémosidérine) dans le foie, la moelle osseuse, les cellules réticuloendothéliales de la rate et les cellules épithéliales de l'intestin. Une très faible proportion du fer de l'organisme correspond au fer circulant entre les différents compartiments du corps (fer plasmatique et interstitiel, lié à la transferrine). Le fer circulant est le reflet de la quantité totale de fer puisqu'il existe un équilibre entre les différentes fractions : le fer plasmatique est un carrefour obligatoire dans le cycle corporel de ce métal.

A l'état normal, le fer sérique est, pour plus de 95%, le fer sérique lié à la transferrine. Chaque molécule de transferrine peut transporter 2 atomes de fer. Normalement 30% des sites sont occupés. En saturant complètement les sites, il est possible de mesurer la capacité totale de fixation du fer (total iron binding

capacity = TIBC). TIBC et pourcentage de saturation de la transferrine sont habituellement déterminés en même temps que le fer sérique.

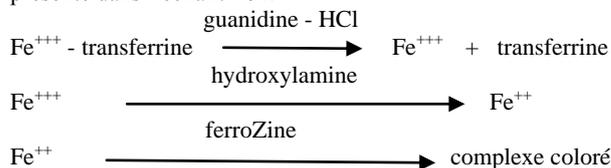
Une hyposidérémie est observée dans les anémies par carence en fer, mais aussi dans les syndromes inflammatoires ou les syndromes néphrotiques.

Une hypersidérémie est observée, entre autres, dans l'hémochromatose, les anémies hémolytiques et la cytolysé hépatique.

#### PRINCIPE

Ferrimat-Kit permet le dosage colorimétrique du fer dans le sérum et le plasma humains sans déprotéinisation, en présence de guanidine et en milieu acide, avec l'hydroxylamine comme réducteur et la ferroZine comme indicateur.

Le chlorhydrate de guanidine dénature les protéines transporteuses et les maintient en solution malgré le pH acide. Le fer ferrique est réduit en fer ferreux par l'hydroxylamine. L'ion  $Fe^{++}$  se chélate à la ferroZine pour donner un complexe magenta. La coloration mesurée est proportionnelle à la quantité de fer présente dans l'échantillon.



#### PRESENTATION ET COMPOSITION DU COFFRET

Réactif 1 étalon	R1	Fer	35,8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ou 2 $\text{mg.L}^{-1}$
Réactif 2 guanidine	R2	chlorhydrate de guanidine hydroxylamine Tampon acétate pH5	4,5 $\text{mol.L}^{-1}$ 230 $\text{mmol.L}^{-1}$
Réactif 3 réactif de coloration	R3	ferroZine tampon acétate pH5	44,4 $\text{mmol.L}^{-1}$

#### Réactifs nocifs :

- R 22 : nocif en cas d'ingestion
- R 36/38 : irritant pour les yeux et la peau
- R 43 : peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.

#### ETALONNAGE

Utiliser le réactif 1 dont le titre est de 35,8  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (2  $\text{mg Fe.L}^{-1}$ ).

#### ECHANTILLONS

Sérum ou plasma recueilli sur héparinate de sodium, héparinate de lithium ou héparine-iodoacétate.

#### MODE OPERATOIRE MANUEL

##### Préparation de la solution de travail

A 40 mL de réactif 2, ajouter 1.5 mL de réactif 3.

##### Réalisation du test

Longueur d'onde : 562 nm

Zéro de l'appareil :

- Lire le blanc échantillon contre le réactif 2
- Lire le dosage et l'étalon contre le blanc réactif.

Stabilité de la coloration : 30 minutes à 20 – 25 °C.

	Blanc réactif	Etalon	Blanc échantillon	Dosage
eau déminéralisée	200 $\mu\text{L}$	-	-	-
étalon	-	200 $\mu\text{L}$	-	-
échantillon	-	-	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
réactif 2	-	-	1 mL	-
solution de travail	1 mL	1 mL	-	1 mL

Mélanger.  
Attendre 10 minutes à 20 – 25 °C.  
Photométrer.

#### VALEURS ATTENDUES

Ces valeurs sont données à titre indicatif, il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs de référence sur une population rigoureusement sélectionnée.

	$\mu\text{mol.L}^{-1}$	$\text{mg.L}^{-1}$
Hommes	11 - 30	0,61 - 1,67
Femmes	9 - 28	0,50 - 1,56