



**HAL**  
open science

# Détermination de métalloprotéines par dilution isotopique associée à la spectrométrie de masse à plasma induit afin d'assurer la traçabilité métrologique en biochimie clinique

Marie Palos

## ► To cite this version:

Marie Palos. Détermination de métalloprotéines par dilution isotopique associée à la spectrométrie de masse à plasma induit afin d'assurer la traçabilité métrologique en biochimie clinique. Chimie analytique. UPPA, 2016. Français. NNT: . tel-01673370

**HAL Id: tel-01673370**

**<https://theses.hal.science/tel-01673370>**

Submitted on 29 Dec 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR  
École doctorale des Sciences Exactes et de leurs Applications

Présentée et soutenue le 5 Décembre 2016

par **Marie PALOS**

pour obtenir le grade de docteur  
de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour  
Spécialité : **Chimie Analytique et Environnement**

## DÉTERMINATION DE MÉTALLOPROTÉINES PAR DILUTION ISOTOPIQUE ASSOCIÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE À PLASMA INDUIT AFIN D'ASSURER LA TRACABILITÉ MÉTROLOGIQUE EN BIOCHIMIE CLINIQUE

Directrices de thèse : Pr. Florence PANNIER, Dr. Paola FISICARO  
Encadrante : Dr. Maria Estela DEL CASTILLO BUSTO

### MEMBRES DU JURY

#### RAPPORTEURS

- Philippe GILLERY
- Thierry GUÉRIN

Professeur / Université de Reims Champagne-Ardenne  
Chef du Département Contaminants chimiques des aliments / ANSES

#### EXAMINATRICES

- Joëlle VINH
- Sophie VASLIN-REIMANN

Directrice de recherche / ESPCI  
Responsable du Pôle Métrologie en Chimie et Biologie / LNE

#### DIRECTRICES

- Florence PANNIER
- Paola FISICARO

Professeur / Université de Pau et des Pays de l'Adour  
Responsable du Département Biomédical et Chimie Inorganique / LNE





# REMERCIEMENTS

J'ai le plaisir de vous présenter le travail qui a été réalisé durant ces trois années de thèse au sein du Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE) en collaboration avec le Laboratoire de Chimie Analytique, Bio-Inorganique et Environnement (LCABIE) de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour (UPPA). Ce travail a été mené à terme grâce à l'aide de nombreuses personnes que je tiens à remercier.

Je souhaite tout d'abord remercier sincèrement mes deux directrices de thèse, Florence Pannier (LCABIE) et Paola Fisicaro (LNE), pour l'accompagnement dans ces travaux qui n'a pas toujours été facilité par la distance Pau-Paris. Je vous remercie aussi pour votre disponibilité, vos conseils et votre confiance.

Je remercie chaleureusement, Estela Del Castillo Busto (LNE), mon encadrante, d'avoir consacré autant de temps pour me guider, m'aider et me conseiller durant ces trois années. Merci pour ta gentillesse et bonne continuation en Angleterre !

Mes remerciements vont également aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail : Philippe Gillery, Thierry Guérin, Joëlle Vinh et Sophie Vaslin-Reimann. Merci pour le temps consacré à la lecture de ce manuscrit ainsi que pour votre présence et vos appréciations lors de ma soutenance.

Je souhaite aussi remercier, mes collègues et ex-collègues, de l'open-space de m'avoir aussi bien intégré dans le groupe. Je tiens tout particulièrement à remercier : Anaïs, pour tous les très bons moments passés en dehors du boulot ; Caro, pour nos multiples pique-nique au parc qui ont été une bouffée d'oxygène, pour ta joie de vivre, ton dynamisme ainsi que tes connaissances et tes conseils ; et Marilyne, merci de m'avoir écouté lors de mes nombreux essais pour la synthèse de mon spike. Bien sûr je n'oublie pas les thésards du LNE et de l'UPPA (Pauline, Noémie, Paul, ...) avec qui on a pu échanger sur nos impressions et nos doutes ainsi que partager des moments de détente. Bon courage à tous ceux qui n'ont pas encore fini, je penserai à vous !!

Je remercie évidemment mes amis qui ont su me remotiver et me divertir quand j'en ai eu besoin. Merci de m'avoir rendu visite sur Paris pour profiter avec moi de cette merveilleuse ville.

Enfin, un grand merci à tous mes proches (mes parents, mon frère, ma cousine, ...), pour m'avoir soutenu et permis d'arriver jusqu'ici. Je voudrai simplement finir en remerciant Julien qui est resté à mes côtés pendant ces trois années malgré la distance et qui m'a toujours soutenu et accompagné dans mes décisions.



# SOMMAIRE

Listes des abréviations et acronymes .....	9
Liste des figures.....	13
Liste des tableaux .....	18
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>23</b>
<b>CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>29</b>
1. La métrologie .....	31
1.1. Définition générale .....	31
1.2. Traçabilité métrologique .....	33
1.3. Méthodes primaires pour la quantité de matière .....	34
1.4. Calcul des incertitudes.....	35
1.5. Intérêt de la métrologie en biochimie clinique .....	37
2. Le fer chez les êtres humains.....	39
2.1. Propriétés physico-chimiques.....	39
2.2. Répartition du Fe dans l'organisme.....	40
2.3. Métabolisme du Fe dans l'organisme.....	40
2.3.1. Absorption .....	41
2.3.2. Transport .....	42
2.3.3. Utilisation .....	42
2.3.4. Perte.....	43
2.3.5. Recyclage .....	43
2.3.6. Régulation .....	43
2.3.7. Stockage .....	43
2.4. Entre essentialité et toxicité.....	44
2.4.1. Les carences en Fe.....	45
2.4.2. Les surcharges en Fe .....	46
2.5. Zoom sur l'hémoglobine .....	48
2.5.1. Généralités.....	48
2.5.2. Structure de l'hémoglobine .....	48
2.5.3. Métabolisme .....	51
2.5.4. Maladies .....	52
3. Les méthodes de dosages dans les fluides biologiques pour l'analyse du Fe et des ferroprotéines.....	54
3.1. Méthodes analytiques pour la mesure du Fe total .....	54
3.1.1. Méthode de référence par spectrophotométrie .....	55

3.1.2.	Méthodes par spectrométrie d'absorption atomique.....	58
3.1.3.	Méthodes par spectrométrie de masse .....	59
3.2.	Méthodes analytiques pour la mesure de l'Hb .....	75
3.2.1.	Méthodes d'estimation de la teneur en Hb totale .....	75
3.2.2.	Méthodes par spectrophotométrie .....	77
3.2.3.	Méthodes par électrophorèse .....	80
3.2.4.	Méthodes chromatographiques.....	81
3.2.5.	Méthodes électrochimiques pour la détermination de l'Hb.....	88
3.2.6.	Méthodes de caractérisation et d'identification de l'Hb.....	88
3.2.7.	Méthodes de quantification de l'Hb totale par ICPMS .....	91
4.	Métrologie appliquée à l'analyse du Fe et de l'Hb.....	94
<b>CHAPITRE 2 : MISE EN PLACE D'UNE MÉTHODE PRIMAIRE POUR LA DÉTERMINATION DU FER DANS LE SÉRUM.....</b>		<b>97</b>
1.	Matériels et méthodes analytiques mis en œuvre .....	100
1.1.	Réactifs et solutions étalons .....	100
1.2.	Échantillons et traitement des échantillons .....	100
1.2.1.	Echantillons étudiés.....	100
1.2.2.	Matériel .....	101
1.2.3.	Traitement des échantillons.....	101
1.3.	Détection .....	102
1.3.1.	Instrumentation.....	102
1.3.2.	Optimisation de la détection.....	105
1.4.	Mise en place du protocole de la double ID-ICPMS.....	108
1.5.	Évaluation des incertitudes.....	113
2.	Résultats .....	116
2.1.	Caractérisation de l'étalon marqué en <sup>57</sup> Fe.....	116
2.2.	Validation de la méthode.....	117
2.3.	Évaluation de l'incertitude de mesure .....	120
3.	Application de la méthode à des échantillons inconnus de sérum et à d'autres matrices.....	122
3.1.	Échantillon BCR <sup>®</sup> -637 .....	122
3.2.	Échantillon B17 .....	122
3.3.	Seronorm <sup>TM</sup> .....	124
4.	Conclusion.....	125
<b>CHAPITRE 3 : DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODES POUR L'ANALYSE DE L'HÉMOGLOBINE TOTALE PAR DILUTION ISOTOPIQUE .....</b>		<b>127</b>
1.	Détermination de l'Hb par double (Fe)-ID-ICPMS .....	131

1.1.	Réactifs et matériels .....	132
1.2.	Instrumentation.....	132
1.3.	Procédures .....	133
1.3.1.	Mise en place du protocole de la double (Fe)-ID-ICPMS.....	133
1.3.2.	Ultrafiltration à 3 kDa .....	134
1.4.	Evaluation des incertitudes.....	135
1.5.	Résultats .....	135
1.5.1.	Validation de la méthode par double (Fe)-ID-ICPMS .....	135
1.5.2.	Comparaisons interlaboratoires .....	139
1.5.3.	Incertitudes .....	142
1.6.	Conclusions .....	143
2.	Détermination de l'Hb par HPLC-ICPMS .....	144
2.1.	Réactifs.....	144
2.2.	Préparation des étalons et échantillons.....	145
2.3.	Matériels.....	146
2.4.	Couplage HPLC-ICPMS .....	147
2.5.	Optimisation de la séparation de l'Hb.....	149
2.5.1.	Mécanisme d'échange de cations .....	149
2.5.2.	Mécanisme d'échange d'anions .....	159
2.5.3.	Spécificité.....	163
2.6.	Quantification en HPLC-ICPMS et HPLC-VISIBLE.....	165
2.6.1.	Quantification par étalonnage externe.....	165
2.6.2.	Ajouts dosés par colonne d'échange d'anions.....	175
2.6.3.	La dilution isotopique en spéciation élémentaire .....	181
3.	Conclusion.....	242
	<b>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>243</b>
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	249
	ANNEXES .....	263



## Listes des abréviations et acronymes

*(Les sigles utilisés sont sous la forme anglaise)*

### **Techniques analytiques**

AAS: Spectrométrie d'Absorption Atomique

CV: Voltamétrie Cyclique

ESI: Ionisation par électrospray

HPLC: Chromatographie Liquide à Haute Performance

ICPMS: Spectrométrie de masse à plasma induit

ID: Dilution Isotopique

IDA: Analyse par Dilution Isotopique

LC: Chromatographie Liquide

MALDI: Désorption-ionisation laser assistée par matrice

MC-ICPMS : Multi collecteur associé à la spectrométrie de masse à plasma induit

MS: Spectrométrie de masse

RP: Chromatographie en phase inverse

SEC: Chromatographie d'exclusion stérique

UV: Ultraviolet

### **Composés chimiques**

ACN: Acétonitrile

AF: Acide formique

AH: Hématine alcaline

AHD: Alcaline hématine détergent

Al: Aluminium

Alb: Albumine

Ar: Argon

Ca: Calcium

CA: Anhydrase carbonique

CA I: Anhydrase carbonique I

CA II: Anhydrase carbonique II

CAT: Catalase

Co: Cobalt

CO: Monoxyde de carbone

Cr: Chrome

Cu: Cuivre

DTT: Dithiothreitol  
EDTA: Acide éthylène diamine tétra acétique  
Fe: Fer  
FeCl<sub>3</sub>: Chlorure de fer III  
Ft: Ferritine  
Ga: Gallium  
H<sub>2</sub>: Hydrogène  
HAc: Acide acétique  
Hb: Hémoglobine  
HbCO: Carboxyhémoglobine  
HbO<sub>2</sub>: Oxyhémoglobine  
HCl: Acide chlorhydrique  
He: Hélium  
HiCN: Cyanméthémoglobine  
HiN<sub>3</sub>: Azoture de méthémoglobine  
HNO<sub>3</sub>: Acide nitrique  
IAM: Iodoacétamide  
In: Indium  
K: Potassium  
K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>: Ferricyanure de potassium  
KCN: Cyanure de potassium  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Dihydrogénophosphate de potassium  
Mb: Myoglobine  
MeOH: Méthanol  
MétHb: Méthémoglobine  
MgCl<sub>2</sub>: Chlorure de magnésium  
Mn: Manganèse  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Sulfate de sodium  
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
NaN<sub>3</sub>: Azoture de sodium  
NaNO<sub>2</sub>: Nitrite de sodium  
Ni: Nickel  
Se: Sélénium  
SLS: Laurylsulfate de sodium  
TCA: Acide Trichloroacétique  
Tf: Transferrine

TFA: Acide Trifluoroacétique

TGA: Acide thioglycolique

Zn: Zinc

### **Agences, organismes ou comités**

ANSM: Agence nationale de la sécurité du médicament et des produits de santé

BIPM: Bureau International des Poids et Mesures

CCQM: Comité Consultatif pour la Quantité de Matière

Cofrac: Comité français d'accréditation

EMRP: Programme Européen de Recherche en Métrologie

ESPCI: Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles

HAS: Haute Autorité de Santé

ICSH: *International Council for Standardization in Haematology*

IRMM: *Institute for Reference Materials and Measurements*

ISH: *International Society of Haematology*

IUPAC: Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée

JCTLM: *Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine*

NMI: Instituts Nationaux de Métrologie

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

ReCCS: *Reference Material Institute for Clinical Chemistry Standards*

### **Divers**

ACD: Anémie des maladies chroniques

CCT: Cellule de collision/réaction

CLF: Capacité Latente de Fixation

CMC: Capacité de mesures et d'étalonnages

CNQ: Contrôle national de qualité

CRM: Matériaux de Références Certifiés

CST: Capacité de Saturation de la Transferrine

CTF: Capacité Totale de Fixation

$E_N$ : Écart normalisé

GUM: Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure

KED: Discrimination par l'énergie cinétique

LD: Limite de détection

LQ: Limite de quantification

PEEK: Poly-éther-éther-cétone

pHi: point isoélectrique ou potentiel hydrogène isoélectrique

RSD: Coefficient de variation

SCE: Electrode Calomel Saturée

SD: Ecart-type

SEM: Multiplicateur d'électrons secondaires

SI: Système International des unités

SIDA: Syndrome de l'immunodéficience acquise

TfR: Récepteur de la transferrine

## Liste des figures

Figure 1 : Exemple de chaîne de traçabilité reliant un résultat de mesure d'un laboratoire aux unités SI [6].	33
Figure 2 : Approches pour l'évaluation de l'incertitude de mesure [12-14].	36
Figure 3 : Métabolisme du Fe dans le corps humain [33, 34].	41
Figure 4 : Composition chimique du corps humain pour un adulte [40].	44
Figure 5 : Structure de l'hémoglobine [60].	48
Figure 6 : Les différents niveaux de structure de l'hémoglobine [61].	49
Figure 7 : Les deux conformations du groupe hème selon la fixation ou non de l'oxygène sur l'atome de Fe [62].	50
Figure 8 : La composition macroscopique du sang total [73].	54
Figure 9 : Schéma général d'un spectrophotomètre [78].	55
Figure 10 : Étapes permettant la formation du complexe ferreux coloré [42].	57
Figure 11 : Schéma du spectromètre d'absorption atomique [93].	59
Figure 12 : Schéma général d'un spectromètre de masse à plasma induit [104].	60
Figure 13 : Schéma d'une torche à plasma [105].	61
Figure 14 : Représentation du quadripôle qui est l'élément essentiel du filtre de masse quadripolaire [105].	62
Figure 15 : Schéma d'un ICPMS à haute résolution (à secteur magnétique et électrique) [106].	63
Figure 16 : Processus de suppression des interférences à l'aide du mode He à partir de l'exemple du Fe ( $^{56}\text{Fe}$ interféré par $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ ) [109].	65
Figure 17 : Effet du niveau de Fe sur la composition isotopique du Fe dans des échantillons de sang. Les diamants correspondent aux échantillons de contrôle, les triangles correspondent aux patients atteint de l'hémochromatose et les carrés correspondent aux patients ACD [120].	68
Figure 18 : Illustration du principe de la dilution isotopique pour un élément bi-isotopique.	71
Figure 19 : Position des variants d'Hb les plus communs obtenus par électrophorèse sur acétate de cellulose [153].	81
Figure 20 : Chromatogramme d'un lysat de globules rouges humains par chromatographie par échange d'anions (colonne DEAE-Sepharose Fast Flow) à 4°C. Phase mobile A: 50 mM Tris-Ac, pH 8,5; phase mobile B: 50 mM Tris-Ac, pH 7,0. Le gradient est linéaire de 0 à 100 % de phase mobile B. ...	85
Figure 21 : Chromatogramme d'une solution d'Hb préparée à partir de cellules d'un adulte normal sur colonne C18 (Jupiter) à $\lambda = 280$ nm avec un débit de 2,0 mL/min. La phase mobile A est un mélange d'acétonitrile-méthanol, à 90:10 (v / v). La phase mobile B est constituée de 0,5% de TFA dans de l'eau déminéralisée à un pH de 2,6 [168].	86
Figure 22 : Chromatogramme obtenu par SEC de l'Hb A sur colonne Sepharose 12 à température ambiante, débit de 0,5 mL/min et détection à 540 nm. (A) La phase mobile utilisée est 50 mM de bis-	

tris/acétique, pH 7,4. (B) La phase mobile utilisée est 50 mM de bis-tris/acétique, 0,9 M MgCl <sub>2</sub> pH 7,4 [158].	87
Figure 23 : Chromatogrammes d'un échantillon d'érythrocytes humains après traitement obtenu par SEC et détection VISIBLE à 408 nm (courbe rouge) et ICPMS sur le <sup>56</sup> Fe (courbe noire) [169].	87
Figure 24 : Spectres de masse de 10 µmol/L Hb dans 100 mL/L de MeOH aqueux contenant 0,1 mL/L d'acide formique (pH 4; A) et 5 mmol/L de tampon acétate d'ammonium (pH 7; B) [175].	89
Figure 25 : Spectres de masse de l'Hb normale. Le spectre supérieur comprend les données brutes montrant les ions de cluster des deux chaînes de globine α et β. Le spectre du bas est le spectre déconvolué sur la véritable échelle de masse après transformation à l'aide d'un logiciel.	90
Figure 26 : Spectre de masse pour le <sup>56</sup> Fe et l'interfèrent <sup>40</sup> Ar <sup>16</sup> O en moyenne résolution d'une solution de Fe à 0,2 µg.kg <sup>-1</sup> .	105
Figure 27 : Représentation du signal théorique de l'uranium à l'isotope 238 et du signal mesuré.	106
Figure 28 : Les différentes étapes nécessaires pour appliquer la double ID comme méthode primaire.	109
Figure 29 : Principe de la double ID appliquée pour l'analyse du Fe dans du sérum par ID-ICPMS.	112
Figure 30 : Diagramme de causes et effets permettant de visualiser les facteurs pris en compte dans le calcul de l'incertitude de C <sub>s</sub> .	114
Figure 31 : Résultats de l'analyse du Fe total (µg.kg <sup>-1</sup> ) dans l'échantillon de sérum ERM-DA 120a. Les barres d'erreurs représentent les incertitudes-types. La ligne solide correspond à la valeur KCRV de 515.63 µg.kg <sup>-1</sup> Fe tandis que les lignes en pointillées représentent son incertitude-type associée pour un k=1. La valeur entourée en rouge correspond à la valeur déterminée par le LNE.	119
Figure 32 : Répartition des composantes d'incertitude sur la détermination de la concentration en Fe par ID-ICPMS en prenant en compte les trois instruments différents.	120
Figure 33 : Répartition des composantes d'incertitude sur plusieurs déterminations de la concentration en Fe par ID-ICPMS en prenant en compte les trois instruments différents.	121
Figure 34 : Répartition des méthodes de routine utilisées lors du CNQ ANSM 2012 pour la mesure du Fe.	123
Figure 35 : Résultats du CNQ de 2012 (sur l'échantillon B17). Les valeurs sont représentées avec les écart-types associés. Les limites acceptables de la valeur consensuelle (ligne pleine rouge) sont délimitées en pointillés.	123
Figure 36 : Evaluation de différentes applications de l'ID associée à l'ICPMS pour l'analyse de l'Hb totale dans de l'hémolysat.	130
Figure 37 : <i>Workflow</i> expliquant l'approche de la double (Fe)-ID-ICPMS pour la détermination de l'Hb dans de l'hémolysat.	131
Figure 38 : Schéma de la procédure de l'ultrafiltration.	134

Figure 39 : Représentation graphique des valeurs individuelles obtenues par double (Fe)-ID-ICPMS pour l'analyse du JCCRM 912-2L avec ou sans dilution initiale. La ligne en rouge représente la valeur moyenne obtenue associée à son incertitude en pointillé ( $78,0 \pm 0,9 \text{ g.L}^{-1} \text{ Hb}$ ).....	138
Figure 40 : Comparaison des valeurs d'Hb totale du CRM sur les trois niveaux de concentration en appliquant les méthodes HiCN, AHD et (Fe)-ID-ICPMS.....	140
Figure 41 : Fractions massiques de l'Hb et leurs incertitudes élargies correspondantes ( $k = 2$ ) obtenues avec les différentes méthodes pour JCCRM 912-2M. La valeur certifiée est représentée en orange et est égale à $132,1 \pm 1,5 \text{ g.kg}^{-1} \text{ Hb}$ [197].....	141
Figure 42 : Répartition des composantes de l'incertitude finale de $C_{\text{éch}}$ .....	142
Figure 43 : Chromatogrammes d'une solution étalon d'Hb à $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ avec une colonne Mono S, deux phases mobiles différentes et une détection à $415 \text{ nm}$ .....	151
Figure 44 : Chromatogrammes d'une solution étalon d'Hb à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ et d'un blanc par Mono S – ICPMS et une phase mobile constituée de TRIS.....	152
Figure 45 : Chromatogramme d'une solution étalon d'Hb à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ obtenu avec une colonne Mono S à $415 \text{ nm}$ . ....	153
Figure 46 : Chromatogrammes d'une solution étalon d'Hb à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ et d'un blanc (eau ultra pure) obtenus après séparation par colonne Mono S en détectant le $^{56}\text{Fe}$ par ICPMS.....	154
Figure 47 : Teneur en fer des différentes fractions de phase mobile A purifiée après élution dans la colonne Chelex.....	155
Figure 48 : Chromatogrammes d'une solution étalon d'Hb à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ et d'un blanc (eau ultra pure) obtenus après filtration des phases mobiles en amont de la séparation par colonne Mono S et détection du $^{56}\text{Fe}$ par ICPMS. ....	156
Figure 49 : Chromatogrammes obtenus par chromatographie d'échange de cations d'un matériau d'hémolyat certifié en Hb et d'un étalon d'Hb $A_0$ . ....	158
Figure 50 : Chromatogramme d'une solution étalon d'Hb à $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ obtenu avec une colonne Source 15 Q par détection VISIBLE à $415 \text{ nm}$ (A) et par détection ICPMS pour le $^{56}\text{Fe}$ (B). ....	161
Figure 51 : Chromatogrammes représentant l'analyse de la CA I par colonne d'échange d'anions associée à une détection VISIBLE à $415 \text{ nm}$ et une détection ICPMS à $^{56}\text{Fe}$ en comparaison avec l'étalon d'Hb et un blanc. ....	163
Figure 52 : Chromatogrammes représentant l'analyse de la CAT par colonne d'échange d'anions associée à une détection VISIBLE à $415 \text{ nm}$ et une détection ICPMS à $^{56}\text{Fe}$ en comparaison avec l'étalon d'Hb et un blanc. ....	164
Figure 53 : Exemple de calcul d'incertitude-type sous Wincert pour la préparation des étalons. ....	166
Figure 54 : Chromatogrammes (éch. cations) du CRM JCCRM 912-1L et d'une gamme d'étalonnage en Hb totale par absorption visible à $415 \text{ nm}$ (Figure A) et par détection ICP MS pour le $^{56}\text{Fe}$ (Figure B).....	169

Figure 55 : Chromatogrammes (ech. d'anions) du CRM JCCRM 912-1L et d'une gamme d'étalonnage en Hb totale par absorption visible à 415 nm (Figure A) et par détection ICP MS pour le <sup>56</sup> Fe (Figure B).....	171
Figure 56 : Chromatogrammes d'un blanc et d'un échantillon d'étalon d'Hb analysés par HPLC-ICPMS avec colonne par échange d'anions et une détection par ICPMS ( <sup>56</sup> Fe). .....	172
Figure 57 : Principe général de la méthode des ajouts dosés. ....	175
Figure 58 : Chromatogrammes par colonne SOURCE 15Q du CRM JCCRM 912-1L et de la gamme d'ajouts dosés en Hb totale par absorption visible à 415 nm (Figure A) et par détection ICPMS pour le <sup>56</sup> Fe (Figure B).....	178
Figure 59 : Application de l'ID en spéciation élémentaire pour l'analyse de l'Hb totale dans de l'hémolysat.....	182
Figure 60 : Configuration instrumentale pour la quantification de l'Hb par ID en mode <i>post-colonne</i> [211]. .....	184
Figure 61 : Chromatogrammes représentant les intensités obtenues suivant les différentes concentrations de l'étalon marqué injectée en comparaison avec le CRM à 50 µg.kg <sup>-1</sup> Hb. ....	186
Figure 62 : Chromatogramme d'intensités du JCCRM 912-1L à 50 mg.kg <sup>-1</sup> Hb par analyse <i>post-colonne</i> ID-HPLC-ICP-MS.....	188
Figure 63 : Chromatogramme du rapport isotopique <sup>56</sup> Fe/ <sup>57</sup> Fe du JCCRM 912-1L à 50 mg.kg <sup>-1</sup> Hb par analyse <i>post-colonne</i> ID-HPLC-ICPMS. ....	189
Figure 64 : Chromatogramme de débit massique du JCCRM 912-1L à 50 mg.kg <sup>-1</sup> Hb. ....	190
Figure 65 : Répartition du poids des différents paramètres de l'incertitude finale sur une détermination. ....	192
Figure 66 : Répartition du poids des différents paramètres de l'incertitude finale sur plusieurs déterminations. ....	193
Figure 67 : Caractérisations de l'étalon et étalon marqué d'Hb utilisé pour l'application de l'ID en mode spécifique. ....	195
Figure 68 : Stabilité de solutions d'étalon d'Hb à 1 mg.g <sup>-1</sup> Hb utilisés pour les analyses par (Fe)-ID-ICPMS des groupes C et D sur une durée de 6 mois.....	201
Figure 69 : Spectre nano ESI FTMS de la solution étalon d'Hb sur la protéine intacte. ....	204
Figure 70 : Identification de la série de pics multichargés correspondant aux deux globines alpha (espèce A) et bêta (espèce B). ....	204
Figure 71 : Spectre nano ESI FTMS déconvolué des espèces protéiques détectées sur la gamme 14 kDa - 17 kDa. ....	205
Figure 72 : Chromatogrammes de l'étalon d'Hb, la catalase ainsi que l'anhydrase carbonique par colonne d'exclusion stérique et détection VISIBLE à 280 nm et ICPMS à <sup>56</sup> Fe.....	207
Figure 73 : Traçabilité des différents étalons .....	208

Figure 74 : Principe général de la synthèse d'Hb enrichie avec un métal. ....	209
Figure 75 : Organigramme de la synthèse de l'Apo-Hb à partir de l'étalon d'Hb (H7379). ....	211
Figure 76 : Chromatogrammes de différentes solutions d'Apo-Hb obtenus par analyse HPLC avec la colonne C8 à 210 nm (A) et 415 nm (B). ....	213
Figure 77 : Chromatogrammes des essais de synthèse du Fe-hème utilisant des solutions de Fe en comparaison avec l'utilisation du <sup>56</sup> FeCl <sub>3</sub> commercial analysés par HPLC avec la colonne C8 à 415 nm. ....	215
Figure 78 : Chromatogrammes des essais de synthèse du Fe-hème utilisant une solution de FeCl <sub>3</sub> en comparaison avec l'utilisation du <sup>56</sup> FeCl <sub>3</sub> commercial analysés par HPLC avec la colonne C8 à 415 nm. ....	216
Figure 79 : Chromatogrammes des essais effectués avec le FeCl <sub>3</sub> aux isotopes 56 et 57. Les analyses sont réalisées par colonne C8-HPLC à 415 nm. ....	217
Figure 80 : Organigramme pour la synthèse du groupe hème enrichi en <sup>57</sup> Fe à partir d'une molécule de protoporphyrine. ....	218
Figure 81 : Chromatogrammes obtenus pour la reconstitution de l'Hb avec le groupe hème commercial en échange d'anions (A) et en phase inverse (B). ....	219
Figure 82 : Chromatogrammes des différentes solutions d'Hb synthétisées avec du <sup>56</sup> Fe et du <sup>57</sup> Fe comparés à l'étalon d'Hb. Les analyses sont effectuées par colonne échangeuse d'anions (Source Q) par détection VISIBLE à 415 nm. ....	221
Figure 83 : Organigramme pour la reconstitution de la molécule d'Hb enrichie en <sup>57</sup> Fe. ....	222
Figure 84 : Organigramme présentant le protocole final de synthèse de l'étalon marqué <sup>57</sup> Fe-Hb. ....	223
Figure 85 : Chromatogrammes de l'étalon d'Hb et de l'étalon marqué d'Hb obtenus par exclusion stérique et détection VISIBLE à 280 nm et ICPMS à <sup>56</sup> Fe et <sup>57</sup> Fe. ....	226
Figure 86 : <i>Workflow</i> expliquant l'approche quantitative de l'Hb par ID en mode spécifique. ....	227
Figure 87 : Evaluation de la concentration en Hb dans deux étalons marqués synthétisés d'Hb différents (1 et 2). Les valeurs correspondent à celles évaluées par ID inverse en mode spécifique. La ligne continue de couleur rouge représente la valeur moyenne obtenue et les lignes discontinues représentent l'incertitude associée à cette valeur moyenne. ....	231
Figure 88 : Profils chromatographiques obtenus par ID en mode spécifique. La courbe rouge représente l'intensité relative à l'isotope 57 du Fe et la courbe noire représente l'intensité relative à l'isotope 56 du Fe. ....	232
Figure 89 : Protocole de la double (Fe)-ID-ICPMS adapté pour l'utilisation de l'étalon marqué <sup>57</sup> Fe-Hb. ....	234
Figure 90 : Profils d'absorption pour les solutions de CRM, d'étalon d'Hb et de l'étalon marqué <sup>57</sup> Fe-Hb par analyse par spectrophotométrie. ....	235

Figure 91 : Profils d'absorptions du CRM (HbO <sub>2</sub> convertie en HiCN, AH et MétHb. par spectrophotométrie .....	239
Figure 92 : Profils chromatographiques obtenus par ID en mode spécifique après conversion des échantillons en HiCN. La courbe rouge représente l'intensité relative à l'isotope 57 du Fe et la courbe noire représente l'intensité relative à l'isotope 56 du Fe.....	241

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Unités de base du Système International [4]. .....	32
Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques du Fe [22, 23]. .....	39
Tableau 3 : Les quatre isotopes stables du Fe [25]. .....	39
Tableau 4 : Distribution du Fe dans le corps [21, 27, 30-32]. .....	40
Tableau 5 : Principales sources de Fe dans l'alimentation [37]. .....	42
Tableau 6 : Signes biologiques de l'évolution de la carence en Fe [42]. .....	46
Tableau 7 : Signes biologiques à surveiller selon les différentes surcharges en Fe [42, 52]. .....	47
Tableau 8 : Caractéristiques des différentes hémoglobines normales [33]. .....	50
Tableau 9 : Interférences spectrales des différents isotopes du Fe [107, 108]. .....	64
Tableau 10 : Applications de la cellule de collision/réaction pour l'analyse du Fe par ICPMS à filtre quadripolaire.....	66
Tableau 11 : Applications pour l'analyse du Fe dans des matrices biologiques par ICPMS à haute résolution.....	67
Tableau 12 : Exemples d'applications de l'analyse d'électrolytes dans les fluides biologiques par ICPMS et différentes méthodes de quantification.....	74
Tableau 13 : Quelques méthodes d'estimation de l'Hb par détermination visuelle [134, 136, 137].....	76
Tableau 14 : Conditions analytiques pour l'analyse de sang hémolysé par colonne d'échange de cations.....	83
Tableau 15 : Conditions analytiques pour l'analyse de sang hémolysé par colonne d'échange d'anions .....	84
Tableau 16 : Récapitulatif des informations relatives aux échantillons étudiés. ....	101
Tableau 17 : Conditions opératoires de l'Agilent 7700x ICP-Q-MS pour la détection du <sup>56</sup> Fe et <sup>57</sup> Fe. ....	102
Tableau 18 : Conditions opératoires de l'iCAP Qc ICP-Q-MS pour la détection du <sup>56</sup> Fe et <sup>57</sup> Fe.....	103
Tableau 19 : Conditions opératoires de l'ELEMENT XR™ HR-ICPMS pour la détection du <sup>56</sup> Fe et <sup>57</sup> Fe. ....	104
Tableau 20 : Temps morts utilisés pour les ICPMS de cette étude. ....	106
Tableau 21 : Paramètres moyens afin d'évaluer le biais en masse obtenus pour les ICPMS de cette étude pour les rapports mesurés <sup>56</sup> Fe/ <sup>57</sup> Fe. ....	107

Tableau 22 : Ecart normalisé pour la vérification d'absence d'interférences sur les isotopes 54, 56, 57 et 58 du Fe dans le matériau de référence SRM 1598a par HR-ICPMS. ....	108
Tableau 23 : Estimation des incertitudes-types pour chaque catégorie de paramètre pris en compte dans le calcul de l'incertitude finale sur la concentration de l'échantillon déterminée par ID.....	115
Tableau 24 : Abondances isotopiques de l'étalon marqué en <sup>57</sup> Fe d'Eurisotop déterminées par ICPMS sur une période de six mois. ....	116
Tableau 25 : Les abondances isotopiques de l'étalon marqué en <sup>57</sup> Fe de l'IRMM. ....	117
Tableau 26 : Concentrations en Fe de l'échantillon de sérum NIST SRM 1598a obtenues par double ID-ICPMS avec différents instruments. ....	117
Tableau 27 : Résultats de la comparaison CCQM-K107 (échantillon ERM®-DA-120a). ....	119
Tableau 28 : Concentration en Fe du BCR®-637 par ID-ICPMS en utilisant le SRM 1598a comme point de contrôle.....	122
Tableau 29 : Résultat de l'analyse du Seronorm™ par double ID-ICPMS. ....	124
Tableau 30 : Résultats obtenus sur les différents échantillons de sérum exprimés en $\mu\text{mol.L}^{-1}$ Fe avec leurs incertitudes élargies en %. ....	125
Tableau 31 : Détermination de l'Hb dans le CRM JCCRM 912-1 par double (Fe)-ID-ICPMS. ....	135
Tableau 32 : Détermination de l'Hb dans les différentes fractions du CRM JCCRM 912-1 par double (Fe)-ID-ICPMS .....	136
Tableau 33 : Bilan de récupération du CRM après l'ultrafiltration à 3 kDa. ....	136
Tableau 34: Détermination de l'Hb dans le CRM JCCRM 912-2 par double (Fe)-ID-ICPMS. ....	137
Tableau 35 : Résultats obtenus par double (Fe)-ID-ICPMS pour l'analyse du JCCRM 912-2L avec ou sans dilution initiale.....	137
Tableau 36 : Détermination de l'Hb dans les différentes fractions du CRM JCCRM 912-2 par double (Fe)-ID-ICPMS. ....	138
Tableau 37 : Concentrations d'Hb totale déterminées par (Fe)-ID-ICPMS et par mesure d'absorbance par spectrophotométrie sur le CRM 912-1. ....	139
Tableau 38 : Valeur certifiée, fractions massiques d'Hb, concentration massique d'Hb et les incertitudes correspondantes élargies ( $k = 2$ ) à partir des différentes méthodes appliquées sur le JCCRM 912-2M [197]. ....	141
Tableau 39 : Contributions principales sur les incertitudes élargies ( $k=2$ ) des différentes méthodes interlaboratoires.....	143
Tableau 40 : Caractéristiques de la colonne Mono S™ .....	146
Tableau 41 : Caractéristiques de la colonne Source 15Q .....	147
Tableau 42 : Caractéristiques opératoires de l'ICPMS haute résolution. ....	148
Tableau 43 : Résultats de l'évaluation de la teneur en Fe de phases mobiles par étalonnage externe. ....	150
Tableau 44 : Conditions analytiques de la séparation chromatographique .....	156

Tableau 45 : Performances analytiques pour la séparation avec échange de cations par détection ICPMS ( <sup>56</sup> Fe) et VISIBLE (415nm).....	158
Tableau 46 : Conditions analytiques de la séparation chromatographique. ....	161
Tableau 47 : Performances analytiques pour la séparation avec échange d'anions par détection ICPMS ( <sup>56</sup> Fe) et VISIBLE (415nm).....	162
Tableau 48 : Résultats obtenus pour le CRM JCCM 912-1L sur 3 jours distincts par étalonnage externe avec la colonne par échange de cations par HPLC-ICPMS et par détection ICPMS ( <sup>56</sup> Fe) et VISIBLE (415 nm). ....	169
Tableau 49 : Récapitulatif des valeurs des différentes contributions de l'incertitude sur l'étalonnage externe par colonne d'échange de cations.....	170
Tableau 50: Résultats obtenus pour le CRM JCCM 912-1L sur 3 jours distincts par étalonnage externe avec la colonne par échange d'anions par HPLC-ICPMS et par détection ICPMS ( <sup>56</sup> Fe) et VISIBLE (415 nm). ....	173
Tableau 51 : Récapitulatif des valeurs des différentes contributions de l'incertitude sur l'étalonnage externe par colonne d'échange d'anions. ....	173
Tableau 52 : Récapitulatif des résultats obtenus par étalonnage externe de l'analyse du JCCRM 912-1L par détection ICPMS ( <sup>56</sup> Fe) et par colonne d'échange d'anions et de cations.....	174
Tableau 53 : Résultats obtenus pour le CRM JCCM 912-1L sur 3 jours distincts par ajouts dosés avec la colonne d'échange d'anions par HPLC-ICPMS et par détection ICPMS ( <sup>56</sup> Fe) et VISIBLE (415 nm). ....	179
Tableau 54 : Récapitulatif des valeurs des différentes contributions de l'incertitude sur les ajouts dosés par colonne d'échange d'anions.....	180
Tableau 55 : Récapitulatif des résultats obtenus sur l'analyse du JCCRM 912-1L par étalonnage externe et par ajouts dosés en utilisant une séparation par colonne d'échange d'anions et une détection par ICPMS ( <sup>56</sup> Fe).....	180
Tableau 56 : Détermination de la masse injectée avec une boucle d'injection de 50 µL par gravimétrie. ....	185
Tableau 57 : Récapitulatif des différents paramètres utilisés pour la mise en place de l'ID en mode <i>post-colonne</i> pour l'analyse de l'Hb totale.....	187
Tableau 58 : Résultats de l'analyse du CRM JCCRM 912-1 par ID-HPLC-ICPMS en mode <i>post-colonne</i> . ....	191
Tableau 59 : Précisions inter et intra essais des mesures effectuées par ID en mode <i>post-colonne</i> sur le CRM JCCRM 912-1.....	192
Tableau 60 : Récapitulatif des résultats obtenus sur l'analyse du JCCRM 912-1L par ajouts dosés et par ID en mode <i>post-colonne</i> en utilisant une séparation par échange d'anions et une détection par ICPMS ( <sup>56</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe). ....	194

Tableau 61 : Résultats de la fraction massique d'eau contenue dans l'étalon d'Hb (H7379) par un titrage coulométrique.....	196
Tableau 62 : Résultats de la fraction massique d'eau contenue dans l'étalon d'Hb (H7379) par séchage au dessiccateur (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ).....	196
Tableau 63 : Résultat de l'analyse de l'échantillon JCCRM 912-1M par spectrophotométrie avec la méthode AHD.....	198
Tableau 64 : Résultats des analyses de solutions étalons d'Hb par spectrophotométrie - AHD.....	198
Tableau 65 : Résultats de l'analyse de la solution étalon d'Hb par (Fe)-ID-ICPMS selon différentes préparations d'échantillons. ....	200
Tableau 66 : Détermination du Fe dans l'étalon d'Hb par (Fe)-ID-ICPMS avec traitement par ultrafiltration à 3 kDa. ....	201
Tableau 67 : Protocole de la digestion en solution de l'étalon d'Hb. ....	203
Tableau 68 : Résultats de la caractérisation protéique de l'étalon d'Hb après une digestion par trypsine et analyse par LC-MS/MS.....	205
Tableau 69 : Conditions analytiques de la séparation chromatographique avec la colonne d'exclusion stérique (Sephacrose 6). ....	206
Tableau 70 : Essais d'optimisation des paramètres de la synthèse d'Apo-Hb.....	212
Tableau 71 : Conditions analytiques de la séparation chromatographique par colonne en phase inverse (C8).....	212
Tableau 72 : Essais et résultats de synthèse du <sup>57</sup> Fe-hème (p représente le nombre de jour).....	214
Tableau 73 : Récapitulatif des différents essais effectués pour reconstituer la molécule d'Hb avec du <sup>56</sup> Fe et du <sup>57</sup> Fe afin de déterminer les conditions idéales.....	220
Tableau 74 : Caractérisation isotopique de l'étalon marqué <sup>57</sup> Fe-Hb selon différents modes de préparation de l'échantillon.....	224
Tableau 75 : Abondances isotopiques obtenues pour les différents étalons marqués de <sup>57</sup> Fe-Hb synthétisés. ....	225
Tableau 76 : Résultats de l'analyse du JCCRM 912-2L par ID en mode spécifique lors d'une première détermination.....	231
Tableau 77 : Résultats de l'analyse de la solution de JCCRM 912-2L par double (Fe)-ID-ICPMS comparés à ceux obtenus lors de la validation de la méthode dans le paragraphe 1. ....	233
Tableau 78 : Résultats de l'analyse de la solution de JCCRM 912-2L par double (Fe)-ID-ICPMS en utilisant l'étalon marqué <sup>57</sup> Fe-Hb comparés à ceux obtenus lors de la validation de la méthode (Tableau 34). ....	234
Tableau 79 : Longueurs d'ondes caractéristiques des espèces d'Hb étudiées. ....	235
Tableau 80 : Longueurs d'ondes caractéristiques des principales espèces d'Hb étudiées.....	236

Tableau 81 : Récapitulatif de tous les modes de conversion effectués sur le CRM, l'étalon d'Hb et l'étalon marqué <sup>57</sup> Fe-Hb.....	238
Tableau 82 : Résultats de l'analyse du CRM JCCRM 912-2, convertis en MétHb, AH ou HiCN, par ID en mode spécifique.....	239

# INTRODUCTION GÉNÉRALE



Au fil des années, la réglementation en biochimie clinique s'appuie progressivement sur des concepts métrologiques permettant d'assurer la fiabilité des mesures et des contrôles qualité. Améliorer l'exactitude des résultats de mesures biologiques permet notamment de diminuer les coûts, liés par exemple à des erreurs de diagnostic et/ou à des traitements inadaptés. Les principaux outils à la disposition des laboratoires d'analyses de biologie médicale (LBM), mais aussi des industriels et des instances en charge du contrôle de la qualité des mesures sont l'utilisation des matériaux de références certifiés (CRM) et la participation à des essais interlaboratoires disposant d'une valeur de référence fiable et indépendante. Cependant, à l'heure actuelle un nombre insuffisant de CRM existe et lorsqu'ils existent, leur traçabilité au Système International des unités (SI) n'est pas toujours assurée. Pour améliorer la qualité des mesures, des méthodes de mesures dites « primaires » sont mises en œuvre et permettent le raccordement direct au SI. Dans l'organisation actuelle de la métrologie, et du Bureau International des Poids et Mesures (BIPM), les Instituts Nationaux de Métrologie (NMI) développent de telles méthodes primaires de mesure et les utilisent pour la dissémination de la traçabilité vers les utilisateurs. Le coût de la mise en place de la métrologie est bien évidemment à limiter et à adapter selon les besoins nécessaires. En ce sens, la démarche doit être la plus pragmatique possible. Aujourd'hui, l'apport de la métrologie dans les LBM est indéniable et l'ensemble des acteurs commencent à s'approprier ses principes.

Le Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE) est l'institut national de métrologie de la France et il est responsable du développement, du maintien et de la diffusion des étalons nationaux primaires pour la chimie. Dans le domaine de l'analyse biomédicale, le LNE contribue à combler les besoins en matière de méthodes de référence et de normes en concordance avec le champ d'application du JCTLM (Comité commun pour la traçabilité en médecine de laboratoire). Ces activités contribuent pleinement aux exigences imposées par la prochaine réforme de la biologie médicale en France. Dans ce cadre, tous les LBM français doivent être accrédités selon la norme ISO EN 15189 d'ici 2020, une norme de référence selon laquelle la traçabilité métrologique des résultats devrait être établie soit par l'utilisation d'un CRM soit par l'application d'une méthode de référence primaire. Depuis plusieurs années, le LNE développe des méthodes pour la détermination de la concentration totale de métaux et plus récemment il a développé des méthodes d'analyse en spéciation élémentaire (Sélénoprotéines, Transferrine, Tributylétain, ...). Ce projet a été mené en collaboration avec le Laboratoire de Chimie Analytique, Bio-Inorganique et Environnement (LCABIE) de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, reconnu pour ses compétences dans le domaine des analyses de spéciation dans les domaines du vivant et de l'environnement.

Un des enjeux majeurs en biochimie clinique consiste à améliorer la fiabilité de l'analyse de marqueurs couramment mesurés. La fiabilité des résultats de mesure pour le dosage du fer (Fe) ainsi

que des ferroprotéines comme l'hémoglobine (Hb) constitue un enjeu important afin de disposer d'un diagnostic fiable et d'adapter au mieux les traitements. En effet, le Fe est un élément essentiel pour l'organisme et donc un apport suffisant, à travers notre alimentation, doit être effectué afin d'éviter la carence en Fe pouvant entraîner une anémie ferriprive. Des maladies liées à l'excès de Fe peuvent aussi être rencontrées comme l'hémochromatose. Le Fe est aussi présent dans de nombreuses molécules (ferroprotéines) de l'organisme qui participent au métabolisme du Fe. L'Hb, ferroprotéine majoritaire, est responsable du transport de l'oxygène dans le sang. L'Hb totale est principalement analysée pour le diagnostic de l'anémie. Cependant, il n'existe ni méthode de référence, ni matériau de référence reconnu par le JCTLM pour le dosage du Fe et pour le dosage de l'Hb totale dans des fluides biologiques.

Pour chacun de ces composés, Fe et Hb, l'objectif final de l'étude est de disposer, au sein du LNE, de procédures de mesures de référence pour leur analyse. Ces procédures doivent être validées et permettre un raccordement du résultat avec le SI. Les techniques analytiques reposent sur la Dilution Isotopique (ID) associée à la Spectrométrie de Masse à Plasma Induit (ICPMS) afin d'obtenir le caractère primaire pour les méthodes développées. L'utilisation de l'ICPMS est effectuée soit pour réaliser des mesures en concentration totale, soit en couplage avec une méthode de séparation, la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). Une fois ces méthodes développées, le LNE sera en mesure de fournir des valeurs de références traçables au SI pour ces analytes lors d'essais interlaboratoires ou dans le cadre de la certification de matériaux de références.

Ce travail s'articule autour de trois chapitres :

- Le **Chapitre 1** s'intéresse à la **métrologie appliquée au dosage du Fe et de l'Hb**. Une présentation générale de la métrologie est exposée à travers ses différents aspects et son fonctionnement au niveau international par le BIPM ainsi qu'au niveau national grâce aux NMI. Le concept de méthode dite « primaire » est présenté afin de s'assurer que les résultats de mesures sont traçables au SI. D'autre part, une synthèse bibliographique portant sur les propriétés générales des composés étudiés (le Fe et l'Hb) ainsi que sur les méthodes spécifiques utilisées par les laboratoires de routine et de recherche est présentée.
- Le **Chapitre 2** est consacré au développement d'une **méthode primaire par ID-ICPMS pour l'analyse du Fe total dans des fluides biologiques**. Il regroupe les choix analytiques employés : la détection ICPMS optimisée dans le but de mener l'ID, la mise en place d'un protocole métrologique et le principe de calcul des incertitudes de mesure.
- Le **Chapitre 3** porte sur le développement de **méthodes primaires pour l'analyse de l'Hb totale dans des hémolysats par ID-ICPMS**. Il se divise en trois parties principales. La première partie est consacrée à la transposition de la méthode développée dans le Chapitre 2, ciblée sur le Fe de

la molécule d'Hb. La deuxième partie expose la mise en place de l'analyse de spéciation élémentaire par HPLC-ICPMS. Le choix de la méthode de séparation ainsi que l'évaluation des performances analytiques sont présentés. Deux types de mécanismes sont utilisés pour séparer l'Hb totale dans de l'hémolysat : échange de cations et échange d'anions. La troisième partie met en avant la quantification par ID en spéciation élémentaire avec le développement des deux modes existants : le mode non-spécifique et le mode spécifique. Pour mener à bien ce développement, deux paramètres sont abordés : la caractérisation de l'étalon commercial d'Hb et la synthèse d'un étalon d'Hb isotopiquement marqué sur l'atome de Fe.

Les principaux résultats obtenus à l'issue de ces travaux sont synthétisés dans la dernière partie du document (conclusion générale).



# CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE



# 1. La métrologie

## 1.1. Définition générale

Le concept de la métrologie est défini comme la science des « mesurages » dans le Vocabulaire International de Métrologie [1]. Son principe repose sur l'action de mesurer. C'est un processus permettant d'obtenir expérimentalement une valeur qu'il est raisonnable d'attribuer à un phénomène. L'étude des mécanismes et des moyens utilisés pour effectuer une mesure se définit comme étant la métrologie. Elle comprend donc tous les aspects théoriques et pratiques des mesurages, quel que soit le domaine d'application. Son objectif principal est d'assurer la comparabilité et la fiabilité des résultats entre eux.

Pour en comprendre le fonctionnement, la métrologie peut se distinguer en trois familles [2]:

- la métrologie « fondamentale » ou « scientifique » : c'est un outil permettant d'assurer la réalisation d'étalons du Système International d'unités (SI). Le SI apparaît en 1960 pour permettre une homogénéisation des unités. Il est fondé sur sept grandeurs de base (**Tableau 1**). Ce domaine comporte une part importante de recherche fondamentale appliquée vers la réalisation et l'amélioration de techniques de mesure ou d'étalons.

- la métrologie « industrielle » : c'est un outil pour la performance économique. Son rôle est de garantir la confiance dans les résultats de mesure utilisés pour concevoir, analyser, maintenir un processus de fabrication. Elle regroupe l'ensemble des techniques permettant d'effectuer des mesures, de garantir leur exactitude et de les interpréter. Elle permet d'assurer la traçabilité et la fiabilité des mesures dans l'industrie pour maîtriser les procédés de fabrication et veiller à la qualité de leurs produits. La métrologie peut donc apporter une contribution majeure à la compétitivité des entreprises.

- la métrologie « légale » : c'est un outil réglementaire s'appliquant aux mesurages, aux unités de mesures, aux instruments de mesure et aux méthodes de mesure. Elle regroupe un ensemble d'exigences et de procédures de contrôle imposées par l'État pour garantir la fiabilité de certains instruments de mesure (balances, pompes à essence, taximètres,...) afin d'assurer la protection du consommateur, la loyauté des échanges et la bonne application des lois et règlements.

D'une manière générale, la métrologie, et plus particulièrement la mesure, permet d'accroître la connaissance, protéger les personnes, régir les transactions et améliorer l'innovation ainsi que la compétitivité des industries [3].

**Tableau 1 : Unités de base du Système International [4].**

<b>Mètre (m)</b>	Le mètre est la longueur du trajet parcouru dans le vide par la lumière pendant une durée de 1/299 792 458 de seconde.
<b>Kilogramme (kg)</b>	Le kilogramme est la masse du prototype en platine iridié qui a été commandé par la Conférence Générale des Poids et Mesures tenue à Paris en 1889 et qui est déposé au Bureau International des Poids et Mesures.
<b>Seconde (s)</b>	La seconde est la durée de 9 192 631 770 périodes de la radiation correspondant à la transition entre les deux niveaux hyperfins de l'état fondamental de l'atome de césium 133.
<b>Ampère (A)</b>	L'ampère est l'intensité d'un courant électrique constant qui, maintenu dans deux conducteurs parallèles, rectilignes, de longueur infinie, de section circulaire négligeable et placés à une distance de un mètre l'un de l'autre dans le vide, produirait entre ces conducteurs une force de $2 \cdot 10^{-7}$ newton par mètre de longueur.
<b>Kelvin (K)</b>	Le kelvin est la fraction 1/273,16 de la température thermodynamique du point triple de l'eau.
<b>Mole (mol)</b>	La mole est la quantité de matière d'un système contenant autant d'entités élémentaires qu'il y a d'atomes dans 0,012 kilogrammes de carbone 12.
<b>Candela (cd)</b>	La candela est l'intensité lumineuse, dans une direction donnée, d'une source qui émet un rayonnement monochromatique de fréquence $540 \cdot 10^{12}$ hertz et dont l'intensité énergétique dans cette direction est 1/683 watt par stéradian.

Au niveau international, le Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) a été établi afin de garantir la comparabilité des résultats à travers le monde en conservant des références uniques. Les Instituts Nationaux de Métrologie (NMI) permettent de relayer au niveau national le pilotage de la métrologie (le LNE en France, la PTB en Allemagne, le NIST aux États-Unis,...). Leur principal objectif est d'assurer la diffusion du SI au sein de leur état.

Différents moyens sont mis en œuvre afin de remplir cette tâche :

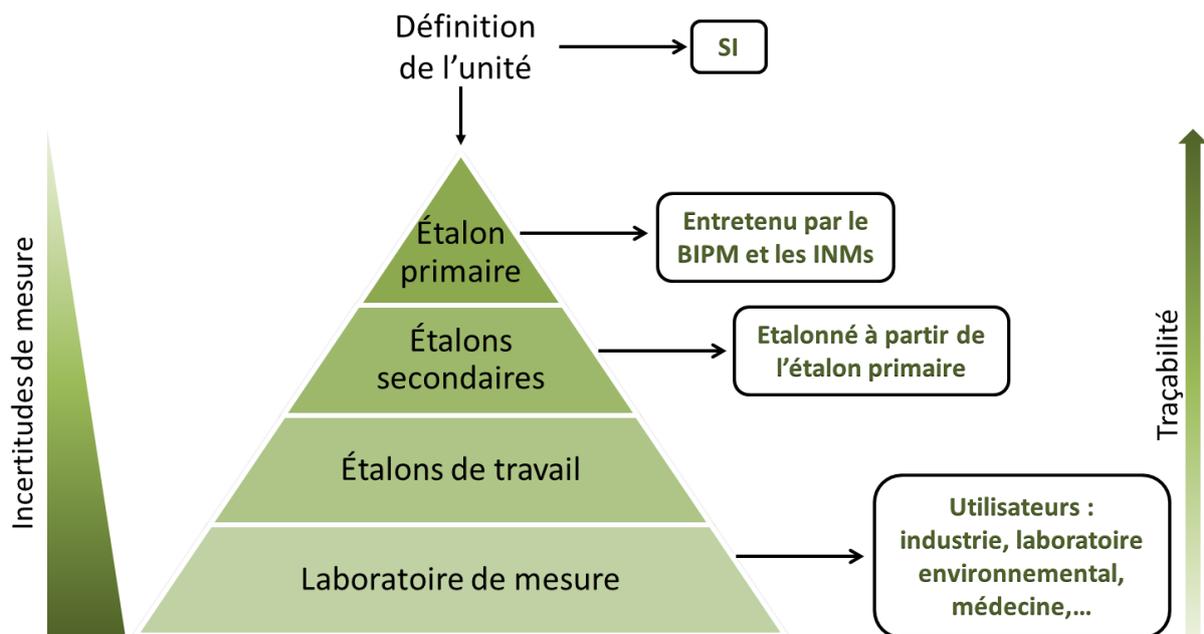
- la participation à des comparaisons internationales de mesurages, nommées comparaisons clé (désignées K, de l'anglais Key) qui permettent une reconnaissance des capacités de mesures des NMI,
  - la participation à des comparaisons internationales de mesurages supplémentaires (désignées P, de l'anglais *Pilot study*) qui établissent un état de l'art et démontrent les capacités actuelles de mesures,
  - l'établissement par les NMI de systèmes de qualité et de démonstration de leurs compétences.
- Ainsi, grâce à leur participation aux comparaisons internationales, les NMI peuvent déclarer des aptitudes en matière de mesures et d'étalonnage (CMC).

## 1.2. Traçabilité métrologique

Pour assurer la comparabilité des résultats, il est essentiel de relier tous les résultats de mesure individuels à une entité commune comme une référence stable dans le temps ou un étalon de mesure. Les résultats peuvent être comparés à travers leur relation à cette référence. Cette stratégie qui permet de lier les résultats à une référence ; est appelée « traçabilité » [5].

La traçabilité métrologique est définie comme étant « la propriété d'un résultat de mesure selon laquelle ce résultat peut être relié à une référence par l'intermédiaire d'une chaîne ininterrompue et documentée d'étalonnages dont chacun contribue à l'incertitude de mesure » [1].

Cette définition implique le besoin d'efforts aux niveaux international et national pour fournir des étalons de référence, mais aussi au niveau des laboratoires de mesure pour démontrer les liens nécessaires à travers les étalons. C'est grâce au raccord à ces différents étalons que la traçabilité au SI peut être possible. L'incertitude de mesure tend ainsi à augmenter avec la longueur de la chaîne de traçabilité. La **Figure 1** présente un exemple de chaîne de traçabilité reliant un résultat de mesure aux unités SI.



**Figure 1 : Exemple de chaîne de traçabilité reliant un résultat de mesure d'un laboratoire aux unités SI [6].**

Afin d'établir la traçabilité d'une mesure, différents points doivent être respectés [5] :

- L'identification du mesurande, plus communément désignée comme la grandeur que l'on veut mesurer. Il s'agit d'identifier l'analyte (c'est-à-dire la substance mesurée), de prendre connaissance des conditions de mesures spécifiques (matrices,...), de prévoir éventuellement une correction pour le recouvrement si la quantité de matière provient d'une molécule.

- Le choix d'une méthode de mesure appropriée afin d'analyser le plus précisément le mesurande identifié. La méthode doit être, soit sélectionnée parmi des méthodes existantes, soit développée par le laboratoire.

- La démonstration que les calculs et la procédure de mesure sont adéquats, à travers la validation de la méthode. Cette validation peut s'effectuer soit par l'utilisation de matériaux de référence certifiés (CRM) soit par la participation à des comparaisons internationales. La validation est un élément essentiel de la traçabilité.

- L'identification de l'importance relative de chaque quantité. Il s'agit dans ce cas de mettre en évidence les différents effets que peuvent avoir des quantités autres que l'analyte d'intérêt. Il s'agit d'identifier les quantités représentant un effet majeur.

- Le choix et l'application des étalons de référence appropriés. Pour s'assurer que toutes les valeurs mesurées ainsi que les valeurs tabulées utilisées dans l'équation finale sont traçables, il est nécessaire que tout soit étalonné et contrôlé à partir d'étalons de référence. Dans le cas où ces étalons ne sont pas à disposition, il est nécessaire d'effectuer des contrôles suffisants par des méthodes appropriées.

- L'estimation de l'incertitude de mesure. Il faut dans un premier temps s'assurer que l'on dispose d'informations suffisamment précises sur les références utilisées, puis dans un second temps, il faut fournir des informations similaires sur le résultat de mesure.

À la vue de ces recommandations, il est donc nécessaire d'avoir à notre disposition des méthodes d'ordre supérieur fournissant des résultats de mesures traçables au SI.

### **1.3. Méthodes primaires pour la quantité de matière**

Une méthode dite « primaire » est une méthode de mesure qui possède les qualités métrologiques les plus élevées. Une méthode est considérée primaire, si le résultat final est obtenu sans relation à un étalon de même nature que l'échantillon mesuré [1]. Le rôle des méthodes primaires de mesures est de produire un résultat objectif qui est correctement exprimé en unités SI. En général, l'incertitude associée à ce résultat est plus faible que celle obtenue avec d'autres méthodes qui ne sont pas primaires.

Le Comité Consultatif pour la Quantité de Matière (CCQM) est l'organisation en charge de référencer les méthodes qui sont potentiellement primaires [7]. Il en a identifié quatre en chimie analytique [8-10]:

- La gravimétrie : l'analyte d'intérêt est séparé de l'échantillon sous une forme pouvant être pesée. Cette méthode permet d'établir une traçabilité au SI à partir des unités de masse. Certaines limites à cette méthode peuvent être rencontrées : la nécessité de posséder une large gamme de poids pour la justesse des pesées ; il doit être démontré que seul l'analyte d'intérêt est mesuré et enfin c'est une méthode laborieuse lorsque l'on a un grand nombre d'échantillons.

- La titrimétrie : l'analyte est déterminé par mesure du volume équivalent d'une solution titrante de concentration connue réagissant avec ce dernier. Cette méthode est proche de la gravimétrie car la détermination de la concentration de la solution titrante se fait par gravimétrie.

- La coulométrie : l'analyte est directement déterminé par mesure du courant électrique et du temps d'application lors d'une réaction électrochimique.

- La dilution isotopique (ID) associée à la spectrométrie de masse : cette méthode consiste à déterminer la concentration d'un élément dans un échantillon par l'ajout d'une quantité connue d'un étalon marqué de ce même élément dont la composition isotopique a été artificiellement modifiée. Ce mélange subit toutes les étapes du protocole d'analyse. La spectrométrie de masse permet d'analyser le rapport isotopique du mélange. L'incertitude globale peut être facilement déterminée sur la base de l'équation de mesure. Si elle est appliquée correctement, l'ID peut directement relier le résultat de mesure au SI avec des incertitudes significativement plus petites que celles obtenues par d'autres méthodes.

D'autres méthodes peuvent présenter les caractéristiques de méthodes potentiellement primaires sans avoir eu la reconnaissance officielle au CCQM. La spectrométrie d'absorption est une technique où l'atome absorbe un quantum d'énergie lumineuse correspondant à une longueur d'onde spécifique et entraînant l'excitation de cet atome. La mesure de quantité de lumière absorbée permet de déterminer la concentration de l'élément dans l'échantillon (loi Beer-Lambert) [10]. L'analyse par activation neutronique consiste à bombarder le matériau à analyser avec un flux de neutrons et à en identifier les isotopes radioactifs formés. La méthode est unique parmi les méthodes d'analyse par le fait que l'excitation concerne le noyau de l'atome ; c'est une méthode multi-élémentaire et très sensible [11].

#### 1.4. Calcul des incertitudes

Dans le cadre d'une mesure de quantité de matière, plusieurs approches sont à disposition pour quantifier les incertitudes de mesures. Une différenciation entre deux modes distincts d'évaluation est possible : l'approche menée par un laboratoire seul (intra-laboratoire) et celle basée sur des études issues de plusieurs laboratoires au cours de collaborations (inter-laboratoires) [12]. La **Figure 2** représente les différentes approches pour la détermination des incertitudes.

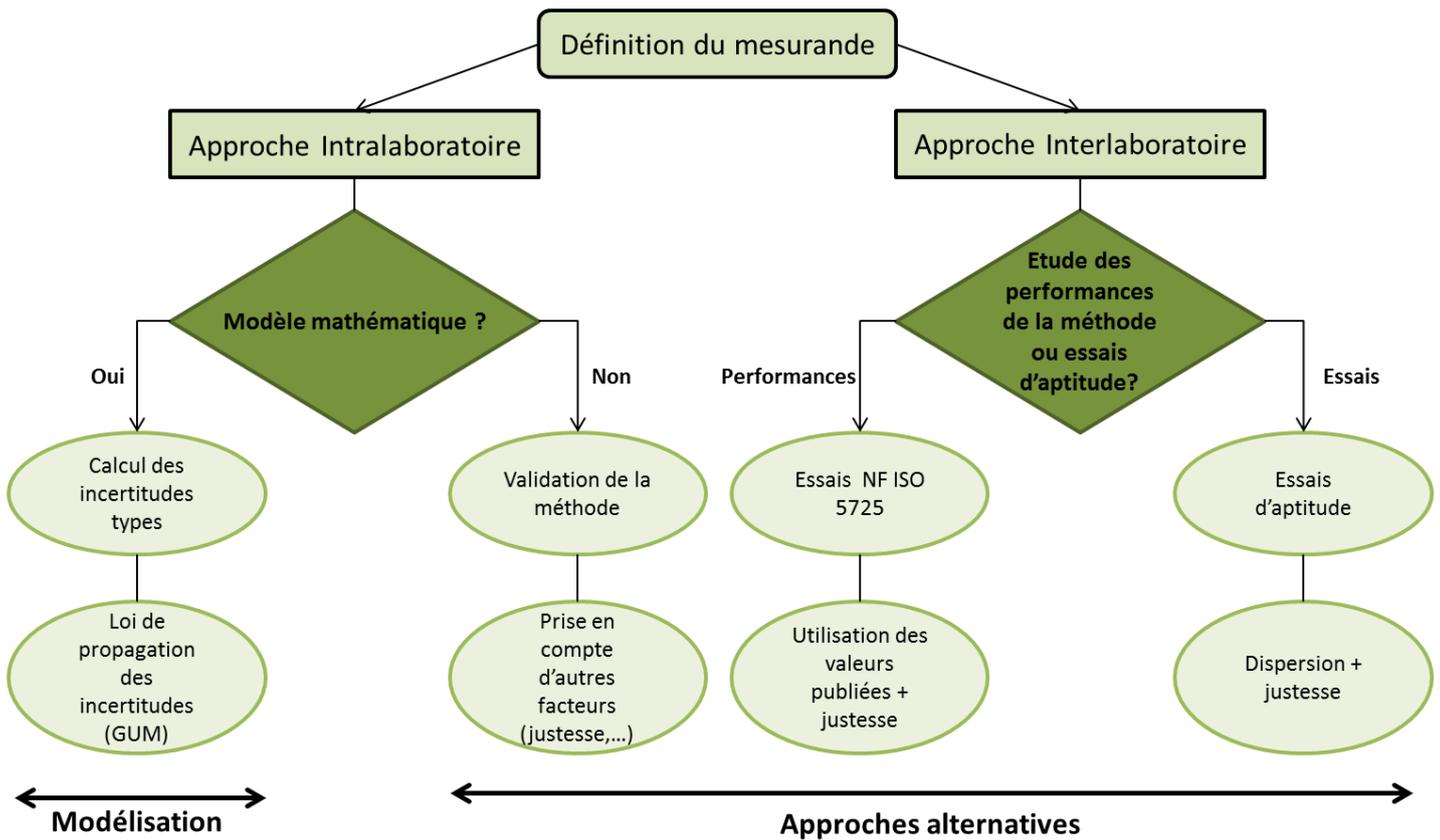


Figure 2 : Approches pour l'évaluation de l'incertitude de mesure [12-14].

L'approche intralaboratoire repose, par définition, sur l'utilisation de toutes les données internes au laboratoire. Dans le cas où un modèle mathématique peut être associé au résultat du processus de mesure alors l'approche décrite par le guide GUM (Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure) est utilisée [15]. Si aucun modèle ne peut décrire le processus de mesure, il est alors nécessaire de répéter les mesures en faisant varier tous les facteurs influents. Ainsi la reproductibilité du processus d'analyse peut être estimée à partir de la dispersion des mesures. L'association de cette valeur à d'autres paramètres influents, comme l'estimation de justesse, permet une évaluation de l'incertitude du résultat.

L'approche interlaboratoire repose sur les résultats d'un essai d'intercomparaison mené pour évaluer une méthode et dont les résultats ont été statistiquement analysés selon la norme NF ISO 5725 pour fournir des écarts-types de répétabilité et reproductibilité (données publiées). Dans ce cas de figure, il est aussi important d'évaluer la justesse de la méthode pour pleinement estimer l'incertitude de mesure. Une seconde alternative est possible, via la participation du laboratoire à un essai d'aptitude ainsi l'exploitation des dispersions des résultats entre laboratoires peut être un indicateur de l'incertitude de mesure [12, 13].

La méthode préconisée par le GUM permet d'estimer les incertitudes de mesures sans la participation à des intercomparaisons tout en limitant le nombre d'essai à réaliser. De plus, elle autorise l'identification des paramètres les plus influents sur le résultat final ce qui permet de déterminer les paramètres cibles afin d'améliorer l'incertitude. C'est l'une des méthodes les plus utilisées pour la détermination des incertitudes de mesures.

Le GUM a été établi suite aux recommandations éditées par le BIPM pour l'expression de l'incertitude expérimentale. Ces recommandations font suite à une volonté de créer un consensus international sur l'évaluation de l'incertitude et avaient pour objectifs de contribuer à une information complète sur la manière dont est exprimée l'incertitude, fournir une base pour la comparaison des résultats de mesure.

La démarche associée à la méthode GUM peut être décrite en quatre étapes :

- Exprimer mathématiquement la relation entre mesurande et les grandeurs d'entrée
- Evaluer l'incertitude-type de chaque grandeur d'entrée
- Déterminer l'incertitude-type composée du mesurande via la propagation des incertitudes-types des grandeurs d'entrée
- Donner le résultat accompagné de son incertitude élargie [15].

Ainsi grâce aux différentes approches, l'évaluation des incertitudes est envisageable pour la mesure d'une quantité de matière.

### 1.5. Intérêt de la métrologie en biochimie clinique

En France, une réforme en biologie médicale, adoptée en 2013, rend obligatoire l'accréditation par le Comité français d'accréditation (Cofrac) de tous les laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 d'ici 2020 [16]. Cette norme implique que les laboratoires disposent d'un matériau ou d'une méthode de référence qui permettent de garantir la traçabilité des mesures au SI [1]. Or, on constate que contrairement aux autres domaines de la mesure, les résultats des analyses en biologie médicale n'étaient pas toujours traçables à des références reconnues internationalement (comme par exemple des matériaux de référence certifiés), et que les incertitudes de mesure n'étaient pas systématiquement évaluées.

De plus, le décret n°2016-46 du 26 janvier 2016 relatif à la biochimie clinique rendant obligatoire la détermination de valeurs cibles associées aux échantillons de contrôle de qualité par une méthode de référence est désormais obligatoire en France, ce qui rend nécessaire le développement de méthodes de référence [17].

En biologie médicale, les méthodes de référence ainsi que les CRM existants sont répertoriés par le *Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM)*. Ce comité a été créé en 2002 en réponse à la mise en œuvre de la Directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*. Il regroupe les métrologues, les biologistes médicaux, les organismes

d'accréditation ainsi que les industriels. Actuellement, dans la base de données du JCTLM, sont dénombrés environ 300 CRM et 170 méthodes de références pour des composés chimiques et biologiques. Ces composés correspondent à des protéines, des hormones, des métaux non électrolytes, des enzymes, des métabolites, des électrolytes, des médicaments et des acides nucléiques [18].

Ainsi, un des objectifs de la métrologie en biologie clinique est de développer et de valider des méthodes pour des marqueurs d'intérêts afin de fournir des mesures de référence pour permettre aux laboratoires de biologie médicale de se raccorder au SI.

En effet, un des enjeux majeurs en biochimie clinique consiste à améliorer la fiabilité des analyses de biomarqueurs couramment utilisés. La fiabilité des résultats de mesure pour le dosage du fer représente un enjeu important afin de disposer d'un diagnostic fiable et d'adapter au mieux les traitements. Cependant, il n'existe ni méthode de référence, ni matériau de référence répertoriés sur le site du JCTLM pour le dosage du fer dans du sérum humain [19]. Il existe toutefois, à notre connaissance, deux matériaux de référence certifiés en fer dans du sérum. Le SRM 1598a *Inorganic constituents in animal serum* du NIST (le Laboratoire national de métrologie des États-Unis) n'est pas certifié par une méthode primaire mais par analyse par activation neutronique. Le JCCRM 322-5 *Serum iron* (sérum humain) du ReCCS, *Reference Material Institute for Clinical Chemistry Standards* (Institut d'étalonnage du Japon, accréditation internationale) est certifié par une méthode de référence (analyse par spectrophotométrie) définie par l'*International Council for Standardization in Haematology* (ICSH) en 1978, cependant cette méthode de référence ne fournit pas des résultats traçables aux unités SI [20].

De ce fait, le développement d'une méthode de référence traçable au SI pour l'analyse du fer dans le sérum humain est un objectif important en biochimie clinique.

## 2. Le fer chez les êtres humains

### 2.1. Propriétés physico-chimiques

Le fer est le 4<sup>ème</sup> élément majeur de la croûte terrestre ( $\approx 5\%$  en masse) et le second métal le plus abondant (le premier métal est l'aluminium, Al). Son symbole chimique est Fe provenant du latin *ferrum* [21]. Le métal pur de Fe est blanc et brillant mais au contact de l'air humide, il s'oxyde rapidement, le rendant brun-rouille. Il est relativement dur, ductile et malléable. Ses principales propriétés physico-chimiques sont décrites dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques du Fe [22, 23].**

<b>Numéro atomique</b>	26
<b>Poids atomique</b>	$55,845 \pm 0,002$ u
<b>Structure électronique</b>	[Ar] $3d^{10}4s^24p^4$
<b>États d'oxydation</b>	-2 à +6
<b>Densité</b>	7,86
<b>Point de fusion</b>	1808 K
<b>Point d'ébullition</b>	3023 K

La chimie du Fe est assez complexe. En effet, le Fe existe sous différents degrés d'oxydation (voir **Tableau 2**), mais, dans les systèmes biologiques, il est présent sous forme d'ions ferreux ( $Fe^{2+}$ ), et d'ions ferriques ( $Fe^{3+}$ ). Le Fe s'oxydant très facilement en présence d'oxygène, il peut former trois oxydes :  $FeO$ ,  $Fe_2O_3$  et  $Fe_3O_4$  où le Fe se trouve en Fe(II) et Fe(III) [21].

À l'état naturel, le Fe est composé de quatre isotopes stables dont les masses atomiques ainsi que leur abondance à l'état naturel sont présentées dans le **Tableau 3**. De plus, il existe 24 isotopes instables ayant une durée de vie comprise entre 20 millisecondes ( $^{46}Fe$ ) et 1,5 millions d'années ( $^{60}Fe$ ) [24].

**Tableau 3 : Les quatre isotopes stables du Fe [25].**

Isotopes	Abondances (%)	Masses atomiques (u)
$^{54}Fe$	$5,845 \pm 0,023$	53,9396
$^{56}Fe$	$91,754 \pm 0,024$	55,9349
$^{57}Fe$	$2,119 \pm 0,007$	56,9354
$^{58}Fe$	$0,282 \pm 0,003$	57,9333

## 2.2. Répartition du Fe dans l'organisme

Le corps humain contient entre 3 à 5 g de Fe répartis dans différents compartiments physiologiques [26]. L'apport nutritionnel recommandé est de 8 mg/jour pour un adulte (cette quantité augmente à 18 mg/jour pour les femmes lors de leur menstruation). L'apport maximal toléré est de 45 mg/jour [23]. Les valeurs physiologiques du Fe dans le sérum chez l'être humain sont comprises entre 10 et 30  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  [27].

Le Fe est présent dans de nombreuses molécules (ferroprotéines) de l'organisme. On peut élaborer une répartition des principales molécules contenant du Fe qui participent au métabolisme du Fe. Les ferroprotéines peuvent être classées en trois groupes: les protéines hémiques (hémoglobine (Hb), myoglobine (Mb)), les enzymes hémiques (cytochrome c, peroxydase) et les composés non-hémiques (ferritine (Ft), transferrine (Tf), enzymes flavines-Fe). Les composés ferriques hémiques représentent ainsi près de 70% de la teneur totale en Fe dans l'organisme tandis que 29% sont stockés sous forme de Ft et d'hémosidérine, moins de 1% sont présents dans les enzymes hémiques et moins de 0,2% se trouvent dans la circulation plasmatique lié à la Tf [28, 29]. Le **Tableau 4** met en évidence les principales ferroprotéines présentes dans le corps humain associées à leur valeur physiologique.

**Tableau 4 : Distribution du Fe dans le corps [21, 27, 30-32].**

	Protéine	Emplacement	Teneur en Fe (mg)	Valeurs physiologiques	
				Unités usuelles*	Unités SI*
<b>Hémique</b>	Hémoglobine	Globules rouges	3000	Homme 130 – 180 g/L Femme 120 – 160 g/L	8 – 11,2 mmol/L 7,5 – 9,9 mmol/L
	Myoglobine	Tissus musculaires	200	3 – 65 $\mu\text{g/L}$	0,2 – 3,7 nmol/L
<b>Non hémique</b>	Ferritine	Foie, moelle osseuse, rate	0 - 1000	Homme 30 – 300 $\mu\text{g/L}$ Femme 20 – 150 $\mu\text{g/L}$	67 – 674 pmol/L 45 – 337 pmol/L
	Transferrine	Plasma	10	2 – 4 g/L Coefficient de Saturation en Fe de la Tf (CST)	25 – 50 $\mu\text{mol/L}$ Homme 20 – 40 % Femme 15 – 35 %

\*Les concentrations sont exprimées en teneur de protéines

## 2.3. Métabolisme du Fe dans l'organisme

Le métabolisme du Fe, élément présentant la particularité d'être fortement retenu dans l'organisme, est lié à la vie de l'hématie, dans les conditions physiologiques normales. Sa principale caractéristique est qu'il s'agit d'un système quasiment clos. Dans l'organisme sa régulation est régie par de multiples mécanismes afin d'en maintenir une teneur constante (l'homéostasie). La **Figure 3** représente le métabolisme du Fe dans le corps humain qui se construit en sept catégories de mécanismes détaillés dans les paragraphes suivant.

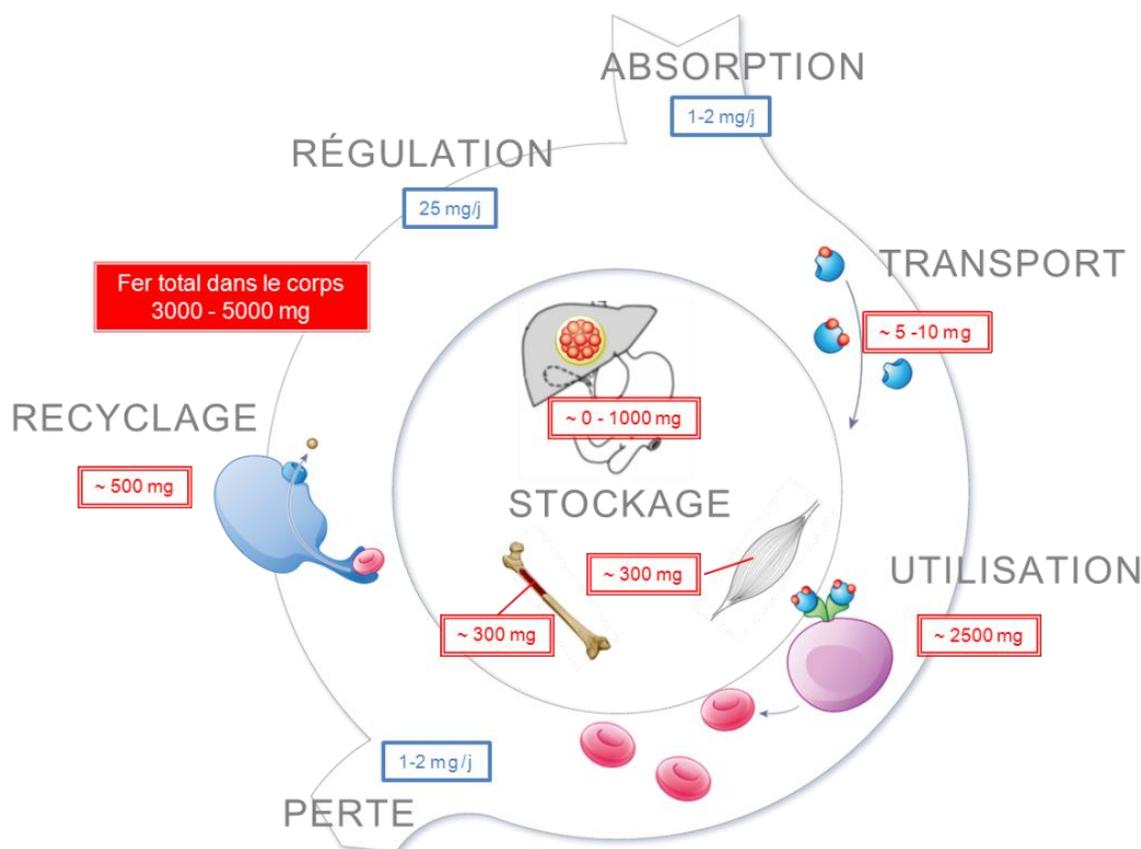


Figure 3 : Métabolisme du Fe dans le corps humain [33, 34].

### 2.3.1. Absorption

Les apports quotidiens en Fe sont au minimum de 10 mg pour une alimentation équilibrée mais seulement 5 à 10 % sont absorbés par l'organisme, ce qui représente environ 1 à 2 mg par jour de Fe. Le Fe provenant de l'alimentation est absorbé par l'organisme dans le duodénum [35]. Sa biodisponibilité dépend de sa forme physico-chimique et de la présence éventuelle de substances alimentaires pouvant modifier son absorption. Il existe deux sources de Fe biodisponible dans l'alimentation :

- le Fe héminique (Fe incorporé dans la structure de l'hème), très biodisponible, présent dans la viande et les produits d'origines animales (viande, poisson, volaille, foie),
- le Fe non héminique ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ), faiblement biodisponible, présent dans les céréales, les fruits, les légumes,... [28, 36].

Pour une bonne couverture des besoins en Fe, les facteurs déterminants sont la qualité du Fe ainsi que la fréquence de consommation. Le **Tableau 5** énumère, de manière non exhaustive, les principales sources de Fe présentes dans notre alimentation.

**Tableau 5 : Principales sources de Fe dans l'alimentation [37].**

Principales sources en Fe	Catégories	Exemples en mgFe/100g
<b>Source animale</b>	Abats	Boudin : 23
	Viandes rouges	Bœuf : 5
	Coquillages	Palourde : 15
	Poissons	Bar : 2
<b>Source végétale</b>	Légumes secs	Lentilles, pois chiche : 3
	Céréales	Muesli : 6
	Cacao	Chocolat 70% cacao : 10
	Thym	30
	Épices	Cumin : 65 Curry : 30

Sachant que la forme ferrique est moins assimilable par l'organisme que la forme ferreuse, une réduction est alors nécessaire. Certains composants alimentaires sont capables de participer à la réduction du Fe tels que le carotène, la cystéine ou l'histidine [38]. La vitamine C peut aussi effectuer cette réduction ce qui augmente ainsi l'absorption du Fe non héminique d'un facteur 3 [39].

### 2.3.2. Transport

Le Fe libre étant extrêmement toxique, le corps utilise de nombreuses protéines permettant de le séquestrer [21]. Son transport dans le sérum se fait principalement après fixation sur la Tf [33]. La Tf est une glycoprotéine, organisée en deux chaînes polypeptidiques semblables, de masse moléculaire d'environ 80 kDa [26]. Chaque chaîne possède un site de fixation pour un seul atome de Fe sous forme d'ion  $Fe^{3+}$ . Elle peut donc contenir au maximum deux atomes de Fe. La Tf peut aussi fixer du manganèse (Mn), de l'Al, du cuivre (Cu) et du zinc (Zn) mais elle possède plus d'affinité avec le Fe. Ensuite la Tf libère le Fe dans les cellules en se fixant à des récepteurs spécifiques (TfR) [21]. La Tf est saturée environ au 1/3 de sa capacité (Capacité Totale de Fixation du Fe ou CTF). Ainsi les 70 % de sites libres définissent la Capacité Latente de Fixation (CLF). Le rapport concentration du Fe dans le sérum sur CLF représentant la Capacité de Saturation de la Tf (CST) est d'environ 30 %. Le Fe transporté sert ainsi à la synthèse de protéines et à l'approvisionnement des réserves en Fe [23].

### 2.3.3. Utilisation

La majorité du Fe soit environ 2000 mg de Fe est utilisée pour l'érythropoïèse c'est-à-dire le processus par lequel l'organisme assure la production des globules rouges. Les érythrocytes ou globules rouges sont majoritairement composés d'Hb (protéine contenant 4 atomes de Fe héminique). La synthèse de l'Hb se déroule dans les érythroblastes de la moelle osseuse à partir du Fe libéré de son récepteur, la Tf. En moindre quantité, environ 400 mg, le Fe sert à la synthèse d'enzymes impliquées dans la respiration cellulaire et la synthèse de l'ADN [32].

### 2.3.4. Perte

Il n'y a pas de mécanisme d'excrétion du Fe. La quantité de Fe éliminée par jour est d'environ 1 à 2 mg, ces pertes sont régulières. La desquamation de la peau et des muqueuses est la cause principale de la perte en Fe. Cependant, cette valeur peut augmenter lors d'hémorragie ou lors des menstruations pour les femmes (0,006 mg Fe/kg/jour) [28]. Par exemple, 1 g de Fe peut être perdu au cours de l'accouchement [21].

### 2.3.5. Recyclage

Le cycle de vie d'un érythrocyte est d'environ 120 jours et environ 200 milliards doivent être renouvelés tous les jours, ce qui correspond à environ 25 mg de Fe. L'hémolyse se déroule principalement dans le foie et la moelle osseuse [34]. Les globules rouges âgés sont détruits et subissent une lyse dans les macrophages. Les composants du globule rouge sont ensuite dégradés et la dégradation du groupe hème entraîne la libération du Fe.

### 2.3.6. Régulation

L'absorption du Fe est inversement proportionnelle à l'importance des réserves. Pour compenser le bilan négatif en Fe et maintenir les réserves en Fe de l'organisme, des mécanismes de régulation sont mis en place. L'hepcidine est un régulateur clé lié à l'homéostasie du Fe. C'est une hormone qui permet d'adapter l'absorption du Fe aux besoins de l'organisme. Elle est majoritairement sécrétée par le foie. Sa production et sa concentration sanguine sont inversement proportionnelles à la quantité de Fe de l'organisme. Sa principale action est de réguler, au niveau de diverses cellules (les entérocytes et les macrophages), la synthèse des transporteurs membranaires de Fe (par exemple : la ferroportine). Ainsi la dégradation de ces transporteurs entraîne une rétention du Fe dans les entérocytes et les macrophages [38].

### 2.3.7. Stockage

Dès que la concentration en Fe dans le plasma augmente, le Fe est stocké afin de ne pas être toxique. La Ft et l'hémosidérine sont les principales protéines stockant le Fe, sous forme  $Fe^{3+}$ , présentes dans le foie, la rate et la moelle osseuse. La quantité de Fe liée à ces protéines de stockage est très variable d'un individu à un autre (0 – 1000 mg) [32]. La Ft et l'hémosidérine représentent respectivement 70 % et 30 % du pool du stockage. La Ft est une glycoprotéine de masse moléculaire élevée (450 kDa), soluble dans l'eau, et qui peut stocker jusqu'à 4500 atomes de Fe en son centre [21, 26]. Dans les conditions physiologiques, elle est saturée seulement à 50 %. L'hémosidérine est une protéine insoluble dans l'eau, constituée de ferritine dégradée [35]. Elle est produite par l'organisme lorsque le nombre d'atomes de Fe par molécule de ferritine atteint environ 4000 [21]. Cette forme de réserve ne libère que très lentement le Fe donc elle peut être considérée comme un dépôt.

## 2.4. Entre essentialité et toxicité

Le Fe pour l'organisme peut être à la fois un élément essentiel et toxique suivant les teneurs. Un élément essentiel est un élément chimique exigé par l'organisme pour se développer en bonne santé. Il existe un grand nombre d'éléments essentiels (**Figure 4**). Ces éléments peuvent être classés en trois catégories : les éléments majoritaires, les macro minéraux, appelés aussi les éléments mineurs, et les éléments traces. Le Fe est l'élément trace ayant la teneur la plus élevée dans le corps humain. Un élément trace se définit comme un élément ayant une concentration inférieure à 100 mg/g dans l'organisme. Un élément trace peut être considéré comme un élément essentiel si :

- Il est présent dans les tissus sains de l'organisme
- Sa concentration est relativement constante entre différents organismes
- Une carence en cet élément engendre des modifications biochimiques spécifiques
- Les modifications sont accompagnées d'anomalies présentes dans plusieurs espèces
- Ces anomalies sont corrigées par l'utilisation de compléments alimentaires [21]

Il existe 18 éléments traces qui sont considérés comme essentiels. Ces éléments ont une fonction très importante dans le corps humain. Leurs principaux rôles sont d'être des cofacteurs dans des enzymes et protéines essentielles, des stabilisateurs dans les membranes, des éléments structurels et des éléments essentiels pour la fonction hormonale.

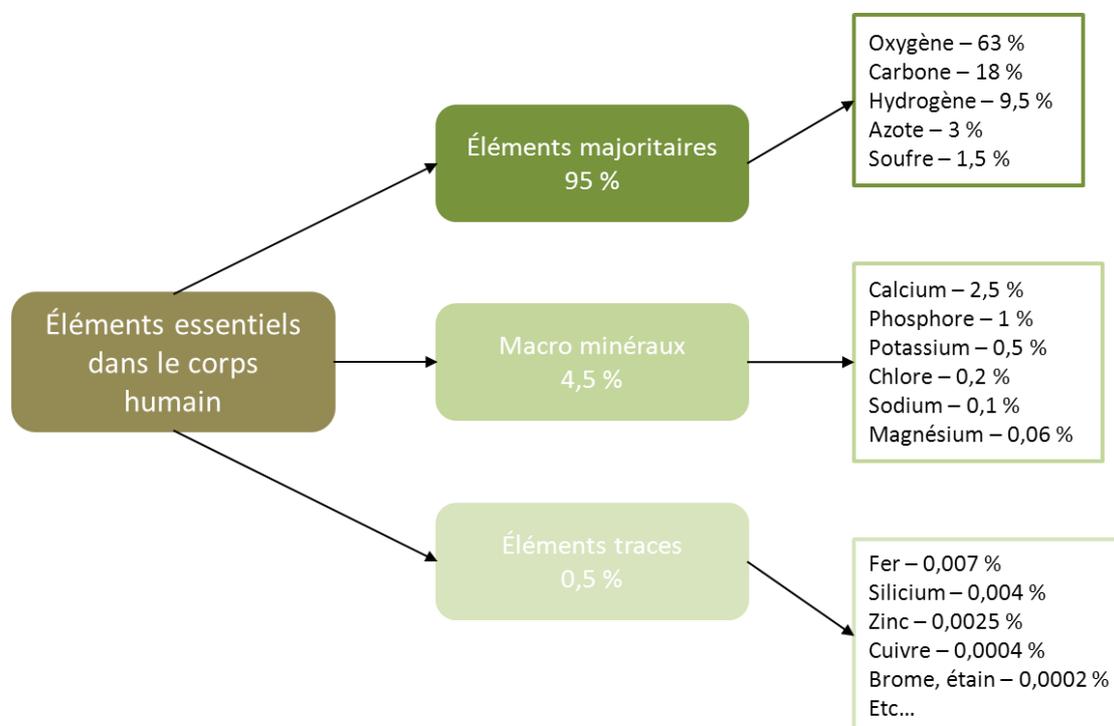


Figure 4 : Composition chimique du corps humain pour un adulte [40].

Les éléments essentiels sont soumis à des mécanismes de contrôle permettant de maintenir l'équilibre de certaines constantes du milieu intérieur de l'organisme, il est donc important d'en assurer un approvisionnement optimal. Tout élément essentiel devient toxique lorsqu'il pénètre dans un organisme en quantité trop importante et d'autre part, un apport insuffisant peut altérer le mécanisme des fonctions cellulaires [41].

### 2.4.1. Les carences en Fe

La carence en Fe est très répandue chez les êtres humains. Elle s'installe progressivement en 3 phases :

- Phase 1 : la carence latente qui correspond à une baisse des réserves en Fe
- Phase 2 : la carence modérée, débutante qui correspond à une carence en Fe
- Phase 3 : la carence avancée, clinique qui correspond à une anémie ferriprive (la conséquence la plus commune). La concentration en Hb dans le sang diminue due au manque de Fe dans l'organisme [21, 42].

Les deux premières phases de carence en Fe (latente et modérée) sont marquées par l'absence d'anémie ferriprive. Durant la phase 1, les réserves en Fe sont progressivement appauvries mais le Fe présent dans l'organisme reste suffisant pour un fonctionnement correct de l'érythropoïèse. Lorsque les réserves de Fe diminuent de plus en plus et que le niveau de Fe en circulation dans le sang chute, la phase 2 est déclarée. Bien que la fonction érythropoïétique soit compromise, cela n'engendre pas une baisse de concentration en Hb [36]. Les symptômes observés sont un état de fatigue due à la diminution du stockage de l'oxygène [43], une réduction de l'activité physique ainsi que l'augmentation du risque d'infection [44]. De plus, des études récentes montrent qu'une carence en Fe pourrait accentuer l'asthme [45]. Les principales causes de carence en Fe sont la faible biodisponibilité du Fe et un apport insuffisant dans l'alimentation [28]. Des pertes de sang intestinales liées à des parasitoses peuvent aussi en être la cause [46].

En présence de la dernière phase de carence, l'anémie ferriprive est déclarée. Les réserves en Fe sont épuisées et la baisse de Fe en circulation dans le sang affecte considérablement l'érythropoïèse d'où la baisse significative de l'Hb [36]. En 2002, l'anémie ferriprive a été considérée comme un facteur majoritaire contribuant à la charge mondiale des maladies [47]. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit l'anémie comme la condition où le nombre de globules rouges est insuffisant pour les besoins physiologiques. Ces besoins sont dépendants de l'âge, du sexe, de l'altitude,...[48]. Les conséquences physiques sont : la pâleur des ongles des mains et des muqueuses buccales, la diminution des performances physiques, des complications durant la grossesse, la tachycardie et dans des cas extrêmes, des œdèmes [21, 49].

Le traitement des carences en Fe et plus particulièrement de l'anémie ferriprive est une association d'un régime alimentaire riche en Fe avec l'utilisation de compléments ferriques. Il existe un grand nombre de suppléments ferriques. De manière générale, les doses administrées par jour pour un adulte en anémie ferriprive sont comprises entre 100-200 mg de Fe élémentaire. Pour les enfants ces doses doivent être adaptées en considérant environ 3-6 mg/kg/jour. Afin de reconstituer les réserves en Fe de l'organisme, il est nécessaire de continuer le traitement entre 3 à 6 mois. Dans le cas où la supplémentation en Fe n'a pas fonctionné, d'autres traitements peuvent être utilisés comme des thérapies par injection intramusculaire ou intraveineuse de Fe mais aussi la transfusion de globules rouges. Ces traitements restent rarement utilisés [50].

Il existe d'autres types d'anémies comme les anémies inflammatoires et/ou les anémies des maladies chroniques. Toutes les inflammations entraînent une diminution du Fe sérique, un stockage anormal du Fe dans les macrophages et une diminution de l'absorption du Fe par le duodénum. De ce fait, le Fe n'est plus disponible pour la synthèse de l'Hb, ce qui induit une anémie. Les anémies inflammatoires sont fréquentes et peuvent s'observer au cours de nombreuses pathologies. Dans de nombreux pays, en particulier ceux en voie de développement, l'anémie peut être due au fait de la déclaration de certaines maladies comme le paludisme, la thalassémie ou de virus comme le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) ou d'infection. Le traitement consiste essentiellement à traiter la maladie initiale ayant provoqué l'apparition de l'anémie [21, 42].

Le **Tableau 6** met en évidence les principaux biomarqueurs nécessaires à suivre pour identifier les différentes carences en Fe.

**Tableau 6 : Signes biologiques de l'évolution de la carence en Fe [42].**

	<b>Fe</b>	<b>Transferrine</b>	<b>Ferritine</b>	<b>Hémoglobine</b>
<b>Sain</b>	12 - 30 $\mu$ mol/L	2 - 4 g/L	20 - 300 $\mu$ g/L	120 - 180 g/L
<b>Carence latente</b>	N	N	↓	N
<b>Carence modérée</b>	↓	↑	↓↓	N
<b>Carence avancée</b>	↓↓	↑↑	↓↓↓	↓
<b>Anémie inflammatoire</b>	↓	N ou ↓	N ou ↑	↓

N : valeurs physiologiques

#### 2.4.2. Les surcharges en Fe

L'excès de Fe est le résultat de plusieurs troubles et peut entraîner des dommages au niveau des organes ainsi qu'accroître la mortalité. Les surcharges en Fe peuvent être classées selon deux catégories : les surcharges génétiques (principalement l'hémochromatose) et les surcharges acquises.

L'hémochromatose est une maladie héréditaire autosomique récessive caractérisée par une absorption anormale de Fe dans l'intestin avec une accumulation progressive du métal dans divers organes en particulier le foie [51]. L'hémochromatose peut se classer sous deux formes : les formes adultes et les formes juvéniles. Dans 80% des cas de formes adultes, la forme Type 1 est rencontrée et

elle est due à la mutation du gène HFE. Elle se manifeste par un dysfonctionnement de l'absorption du Fe alimentaire et par une affinité excessive du Fe pour les cellules hépatiques. Concernant les formes juvéniles, elles sont exceptionnelles et leur évolution rapide et sévère [42]. Les surcharges génétiques non hémochromatosiques peuvent être dues soit à une mutation du gène de la ferroportine soit à une acéruplasminémie héréditaire, affection autosomique récessive (plus rare) [52]. Sans traitement, cette maladie peut entraîner des atteintes hépatiques sévères (cirrhose, hépatocarcinome), un dysfonctionnement sexuel, diabète, cardiomyopathie et arthrites. Dans les cas extrêmes, la quantité de Fe peut atteindre jusqu'à 60 g [21, 53].

Il existe différents types de surcharges acquises : les transfusions, les apports par voie parentérale ou par voie placentaire, les maladies chroniques du foie (comme la cirrhose) et plus rarement l'alcoolisme. Lors de certaines maladies comme les thalassémies et la drépanocytose, des transfusions à répétition sont nécessaires, ce qui engendre un apport en Fe très important (200-250 mg de Fe). Or, l'organisme absorbe et élimine environ 1 mg de Fe par jour [54]. De plus, la fonction excrétoire en Fe n'est pas extensible ce qui signifie que seulement 1 mg de Fe est éliminé par jour. Les apports par voie parentérale interviennent après une transfusion. Les réserves en Fe saturent et le Fe en excès circule dans le plasma jusqu'à ce que les capacités de saturation de Tf soient au maximum (voir **Tableau 7**). Les apports par voie placentaire ont lieu durant la grossesse : le Fe circulant dans le plasma maternel est transféré dans la circulation fœto-placentaire à travers les trophoblastes. Ce phénomène s'accroît lors du dernier trimestre de grossesse [55]. Ces excès de Fe peuvent entraîner des troubles digestifs et avoir des effets néfastes sur le foie, le pancréas et l'activité cardiaque.

**Tableau 7 : Signes biologiques à surveiller selon les différentes surcharges en Fe [42, 52].**

	Fe	Saturation Tf	Transferrine	Ferritine
<b>Sain</b>	12 - 30 $\mu\text{mol/L}$	15 - 40%	2 - 4 g/L	20 - 300 $\mu\text{g/L}$
<b>Surcharges génétiques</b>	↑	↑↑	N	↓
<b>Surcharges acquises</b>	↑	↑	↓	↓↓

N : valeurs physiologiques

Les hémochromatoses sont généralement traitées par les soustractions sanguines (les saignées). Environ 400 à 500 mL de sang par semaine sont prélevés en début de diagnostic. Ces saignées sont répétées tous les 7 à 10 jours afin d'éviter que les réserves de Fe ne se reconstituent entre chaque prélèvement [53]. Puis ces soustractions sanguines sont espacées une fois la concentration de Ft revenu proche des valeurs physiologiques. Pour les autres types de surcharges, l'utilisation de chélateurs de Fe peut être envisagée.

## 2.5. Zoom sur l'hémoglobine

### 2.5.1. Généralités

Comme décrit précédemment, le Fe du corps humain est présent en grande majorité sous la forme d'hémo protéines comme l'Hb.

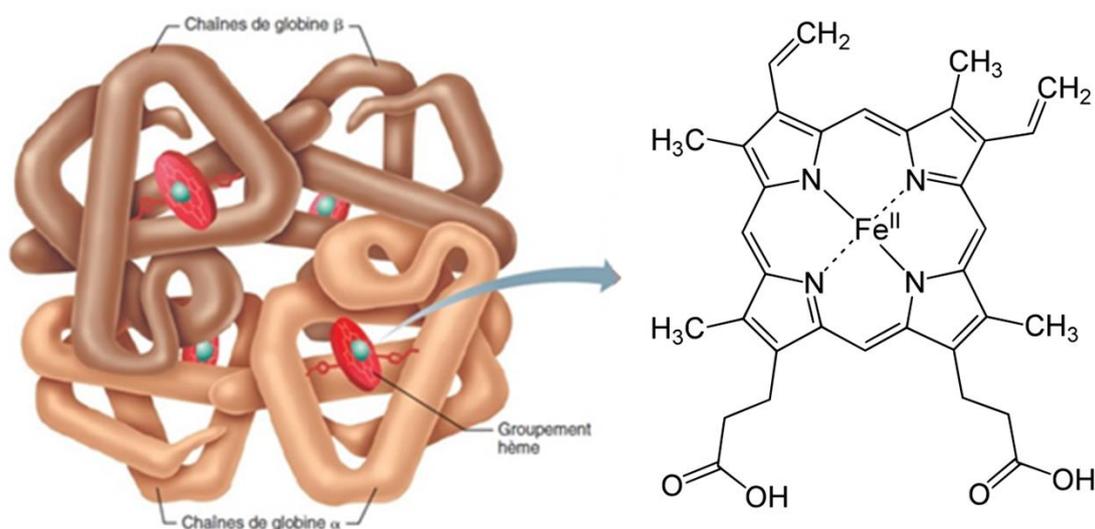
Les hémo protéines remplissent trois fonctions différentes :

- Transporteur d'oxygène : Hb et Mb
- Activateur d'oxygène : oxydases, peroxydases, oxygénases, oxydoréductases
- Transporteur d'électrons : cytochrome [32]

C'est en 1862 qu'apparaît le terme « hémoglobine » afin de désigner le pigment respiratoire transportant l'oxygène, présent dans les globules rouges, grâce au physiologiste allemand Hoppe-Seyler [56]. L'Hb est une protéine majeure contenant du Fe, présente dans les globules rouges chez les mammifères et d'autres animaux [57]. Elle est responsable du transport et du stockage de l'oxygène ce qui signifie qu'elle est essentielle. Sa masse moléculaire est de 64 458 Da (anhydre), avec une fraction massique d'Hb-Fe de 0,00347 [58]. L'Hb a un point isoélectrique (pHi) de 6,81 [59].

### 2.5.2. Structure de l'hémoglobine

La structure des Hb est constituée de quatre chaînes polypeptidiques de globine identiques deux à deux, nommées les chaînes de globine, dont chacune possède une cavité accueillant une molécule hème contenant un atome de Fe [57]. Le groupe hème est lié à la chaîne de globine grâce à une liaison non covalente avec le résidu histidine. La **Figure 5** représente la structure générale de l'Hb.

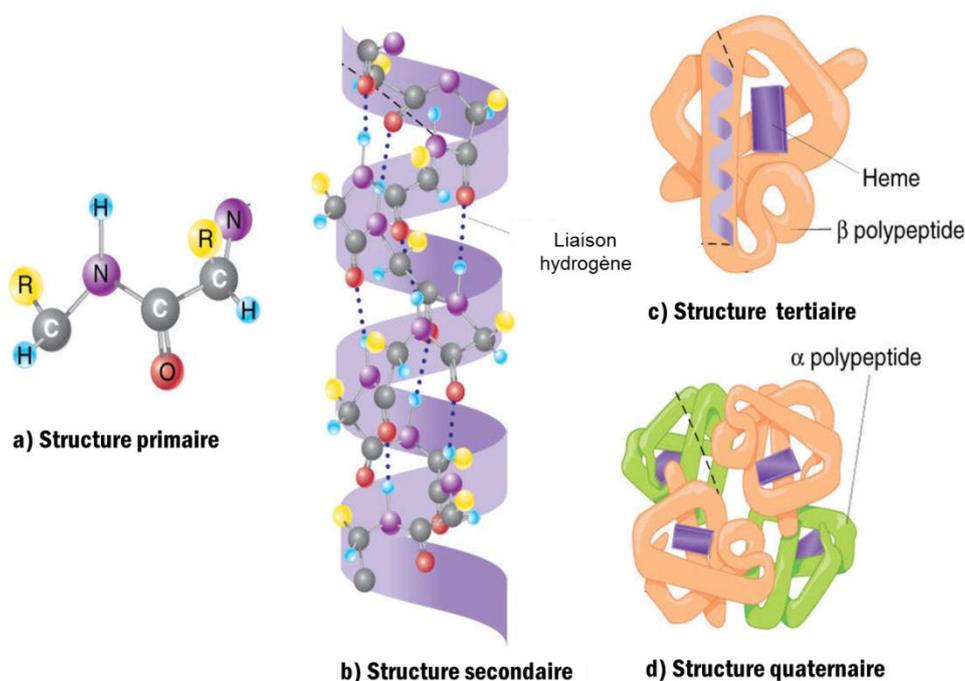


**Figure 5 : Structure de l'hémoglobine [60].**

La structure tétramérique de l'Hb est fondamentale pour ses fonctions. L'Hb possède différents niveaux de structure (voir **Figure 6**):

- la structure primaire qui correspond à l'enchaînement des acides aminés ;
- la structure secondaire qui correspond à des motifs structuraux de base comme l'hélice alpha, le feuillet bêta, tours et coudes. Dans le cas de l'Hb, elle se trouve sous forme d'hélice  $\alpha$ . Cette structure est due à la formation de liaisons hydrogènes entre le groupe carboxyle (COOH) d'un acide aminé et le groupe amine (NH) d'un autre acide aminé.
- la structure tertiaire qui correspond à l'organisation interne d'une sous-unité. C'est le résultat d'autres liaisons hydrogènes entre les groupes R fortement polaires, des liaisons ioniques entre les groupes carboxyles et les acides aminés ionisés et des interactions hydrophobes entre les chaînes non polaires et les ponts disulfure. Ainsi la structure secondaire se trouve repliée sur elle-même ;
- la structure quaternaire qui correspond à l'organisation complexe d'une protéine possédant plusieurs sous-unités. L'Hb possède quatre sous-unités.

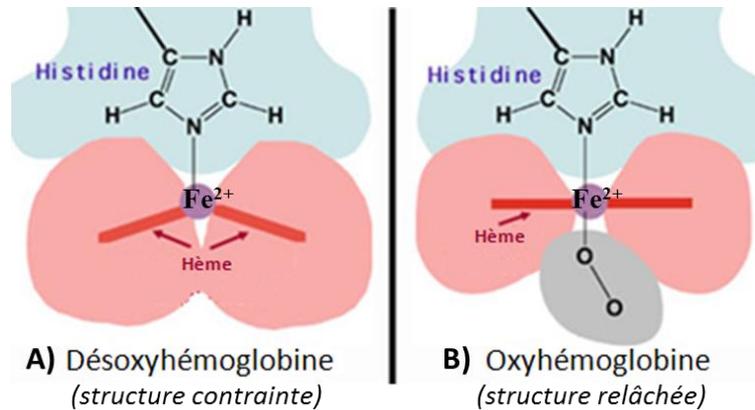
Une alternation dans la structure primaire peut affecter toutes les autres structures [57].



**Figure 6 : Les différents niveaux de structure de l'hémoglobine [61].**

De plus, l'Hb a comme particularité d'être une molécule à structure déformable réversiblement. En effet, la fonction principale de l'Hb est le transport de l'oxygène dans le sang. Or, lorsque la liaison entre l'atome de Fe et l'oxygène se fait, la molécule subit une déformation : plusieurs liaisons hydrogènes et ioniques situées à l'intérieur des sous-unités sont rompues lors de ce processus. La forme T (structure contrainte) correspond à la désoxyhémoglobine où les chaînes de globine sont liées très fortement entre elles empêchant l'entrée de l'oxygène (**Figure 7A**). La forme R

(structure relâchée) correspondant à l'oxyhémoglobine (HbO<sub>2</sub>) où les liaisons entre les chaînes ont laissé entrer facilement l'oxygène (**Figure 7B**) [32]. Ainsi la fixation d'oxygène sur la désoxyhémoglobine conduit à l'HbO<sub>2</sub>.



**Figure 7 : Les deux conformations du groupe hème selon la fixation ou non de l'oxygène sur l'atome de Fe [62].**

Enfin une autre structure de l'Hb peut être rencontrée lorsque le Fe ferreux (Fe<sup>2+</sup>) s'oxyde en Fe ferrique (Fe<sup>3+</sup>) : la méthémoglobine (MétHb). Cela se traduit par une perte de la capacité à créer une liaison avec l'oxygène. Les causes de formation de la MétHb sont soit congénitales, soit acquises. Les méthémoglobinémies héréditaires peuvent être divisées en deux catégories : celles dues à une modification de la forme de l'Hb (variantes d'Hb M) et celles dues à un défaut enzymatique (déficit en NADH réductase) qui diminue la vitesse de réaction de réduction du Fe dans l'Hb. La méthémoglobinémie acquise est généralement due à l'ingestion ou à l'exposition de la peau à des agents oxydants (nitrates, nitrites, chlorates, naphthalène, etc) présents dans des médicaments, dans des produits manufacturés, dans diverses substances,... D'autres causes liées une alimentation inadéquate (légumes contaminés, eau de puit contenant des nitrates, etc) et une méthémoglobinémie idiopathique peut survenir suite à une acidose systémique [63].

Toute l'Hb présente dans l'organisme ne se trouve pas sous la même forme. La distinction des différentes Hb se fait à partir des variances dans les chaînes de globine ainsi que des interactions pouvant exister entre ces chaînes. Les Hb normales et ses constituants sont résumés dans le **Tableau 8**.

**Tableau 8 : Caractéristiques des différentes hémoglobines normales [33].**

Hémoglobines	Pourcentage par rapport à l'Hb totale	Chaînes de globine	Remarques
Hb A	Hémoglobine A <sub>0</sub>	α <sub>2</sub> β <sub>2</sub>	Fraction majeure de l'Hb A
	Hémoglobine A <sub>1</sub>	α <sub>2</sub> β <sub>2</sub>	Sous fractions : Hb A <sub>1a</sub> , Hb A <sub>1b</sub> , Hb A <sub>1c</sub>
	Hémoglobine A <sub>2</sub>	α <sub>2</sub> δ <sub>2</sub>	
	Hémoglobine F	α <sub>2</sub> γ <sub>2</sub>	

Très tôt, les Hb communes sont nommées comme Hb A pour Hb adulte et Hb F pour Hb fœtale. Hb A<sub>2</sub>, découverte en 1955 grâce à l'électrophorèse [64], est désignée sous cette nomenclature lors du congrès de l'*International Society of Hematology* (ISH) en 1957 [65]. En effet, durant l'âge adulte, l'Hb majoritaire, nommée l'Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ), représente 97 % de l'Hb totale. Les autres types d'Hb sont rencontrés de façon minoritaire comme l'Hb A<sub>2</sub> (<3.5%,  $\alpha_2\delta_2$ ) et l'Hb F (<2.0%,  $\alpha_2\gamma_2$ ) [33].

Grâce à l'utilisation de la chromatographie par échange de cation, une subdivision de l'Hb A en deux pics est repérée : Hb A<sub>I</sub> et Hb A<sub>II</sub> (nom attribué selon l'ordre d'élution) [66]. Plus tard, la division de l'Hb A<sub>I</sub> en cinq petits pics est observée où l'appellation se fait en attribuant une lettre (a, b, c, d, et e) dans l'ordre de l'élution [67]. Cependant, l'Hb A<sub>Ie</sub> est considérée comme un artefact de stockage, tandis que les Hb A<sub>I a,b,c</sub> sont glyquées [68]. Enfin l'Hb A<sub>Id</sub> est due à la combinaison entre un glutathion et un résidu cystéine qui augmente avec le vieillissement du globule rouge [57]. Afin d'éviter la confusion entre l'Hb A<sub>II</sub> et l'Hb A<sub>2</sub>, l'Hb A<sub>II</sub> est renommée en Hb A<sub>0</sub>. Une conséquence de ces différentes nomenclatures est que l'Hb A découverte par électrophorèse correspond aux Hb A<sub>I</sub> et A<sub>0</sub> lors de l'analyse par chromatographie d'échange de cation. Ainsi toutes les variantes d'Hb possèdent la caractéristique d'être séparée en deux pics comme par exemple, l'Hb F est séparée Hb F<sub>0</sub> et Hb F<sub>1</sub>. Les Hb normales ayant été nommées, les variantes des Hb découvertes par la suite se voient attribuer une lettre de l'alphabet [57].

De plus, l'Hb peut être soumise à des modifications post-traductionnelles comme la glycation. La glycation correspond à une fixation irréversible non enzymatique d'un sucre réducteur (glucose ou fructose) ou d'un aldéhyde sur les résidus de la protéine et la fonction amine N-terminale (le radical NH<sub>2</sub>). Le glucose est le principal ose à se lier à la protéine du fait de son abondance dans l'organisme. La glycation est d'autant plus facile que le site de fixation de l'ose sur la protéine est libre d'accès. C'est pour cette raison que pour l'Hb, le site majeur de glycation est l'extrémité N-terminale (la valine) des chaînes  $\beta$ . Lorsque l'Hb est glyquée sur son site majeur, ses propriétés physico-chimiques (potentiel hydrogène isoélectrique, pHi) sont suffisamment modifiées pour permettre une séparation par chromatographie ou par électrophorèse : c'est l'Hb A<sub>1</sub>. Comme décrit dans le paragraphe précédent, il existe plusieurs fractions d'Hb A<sub>1</sub> nommées en fonction de leur ordre d'élution en chromatographie d'échange de cations : Hb A<sub>1a</sub> (comprenant elle-même deux sous-fractions Hb A<sub>1a1</sub> et Hb A<sub>1a2</sub>), Hb A<sub>1b</sub>, Hb A<sub>1c</sub>. L'Hb A<sub>1c</sub> constitue la forme majeure de l'Hb A<sub>1</sub> (environ 80 %) soit 4 à 6 % de l'Hb totale. Or, lorsque l'Hb est glyquée sur d'autres sites, aucune modification significative de son pHi est observée [69].

### 2.5.3. Métabolisme

La synthèse de l'Hb est complexe. La molécule hème est synthétisée partiellement dans les mitochondries et dans le cytosol. Quatre étapes de réaction avec différentes enzymes (par exemple : *ALA synthétase*, *ALA deshydrase*, *hème synthétase*) sont requises pour synthétiser la protoporphyrine

III. Ensuite, dans les mitochondries, cette molécule fixe en son centre un atome de Fe ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) pour aboutir à l'hème. Les chaînes de globine sont synthétisées par les ribosomes et sont codées par des gènes de globines présents dans deux clusters, un sur le chromosome 16 et l'autre sur le chromosome 11. Les gènes pour les chaînes  $\zeta$  et  $\alpha$  se situent sur le chromosome 16 tandis que les gènes correspondants aux chaînes  $\varepsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$  et  $\delta$  sont localisés sur le chromosome 11. Les chaînes  $\alpha$  sont synthétisées en excès par rapport aux chaînes  $\beta$ . Enfin, la chaîne  $\alpha$  va alors former un dimère avec la chaîne  $\beta$ . Chaque dimère de chaînes de globine incorpore une molécule hème par l'intermédiaire fixation sur une histidine avant de s'associer à un autre dimère pour former un tétramère d'Hb. Cette liaison se déroule dans le cytosol [57].

#### 2.5.4. Maladies

L'Hb totale représente un des marqueurs analysé pour le diagnostic de l'anémie [70]. Le nombre de variants d'Hb anormales identifié excède 700 [32]. La plus grande majorité des variants de l'Hb ne possède qu'un seul acide aminé substitué sur une chaîne de globine [71]. Les maladies ou anomalies d'Hb peuvent être dues soit à un défaut dans la production des chaînes de globine, soit à une mutation d'un gène.

Les hémoglobinopathies sont un groupe de maladies génétiques où une atteinte des gènes de régulation de la synthèse des globines est présente. Les thalassémies appartiennent à ce groupe et présentent soit une diminution de la vitesse de synthèse soit l'absence d'une ou deux chaînes de globine. Les défauts de synthèse de l'Hb sont le plus souvent dus à une mauvaise formation ou maturation des globules rouges [32]. Les thalassémies sont parmi les maladies génétiques les plus rencontrées dans la région méditerranéenne, dans le subcontinent indien, en Asie du Sud-Est et en Afrique de l'Ouest. Les patients atteints de thalassémie ne produisent plus assez d'Hb A car leurs cellules ne synthétisent plus de chaînes de globine  $\alpha$  ou  $\beta$ . Un classement des thalassémies est possible selon la chaîne de globine touchée : les  $\alpha$ -thalassémies ( $\alpha^0$  et  $\alpha^+$ ), les  $\beta$ -thalassémies ( $\beta^0$  et  $\beta^+$ ), la  $\delta\beta^+$  thalassémie (production de l'Hb Lepore), la Hb E thalassémie,...[72]. Les principales conséquences des thalassémies sont des déformations osseuses, fatigue, essoufflement, mort périnatale [73].

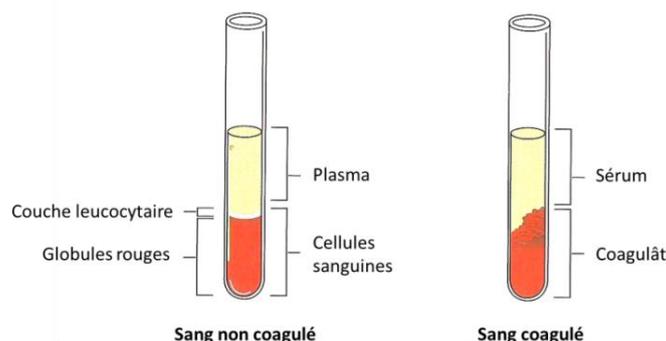
Les hémoglobinoses représentent un groupe où une atteinte des gènes de structure ou une mutation ponctuelle engendrent la synthèse d'une chaîne de globine contenant une anomalie ponctuelle. La principale maladie est la drépanocytose qui résulte d'un défaut d'un seul gène causé par la substitution d'une valine par l'acide glutamique en position 6 de la chaîne  $\beta$  de l'Hb. L'Hb résultant de cette mutation est nommée Hb S (S pour *Sickle-cell disease*, nom de la maladie en anglais). Cette mutation ponctuelle provoque la précipitation et la polymérisation de l'Hb S désoxygénée qui induit des globules rouges falciformes [32]. Les hématies falciformes bloquent les petits vaisseaux sanguins et peuvent causer des anémies, des asplénies fonctionnelles, des épisodes de douleur intense. La

drépanocytose est la maladie génétique la plus répandue dans le monde : plus de 5 millions de personnes atteintes [73].

Le métabolisme du Fe joue un rôle important dans l'organisme. Lors de son dysfonctionnement, des carences et surcharges en Fe peuvent être engendrées ce qui impacte le bon fonctionnement du corps humain. De plus, le Fe est présent en grande majorité sous la forme d'hémoprotéines, notamment en Hb qui est impliquée dans de nombreuses maladies. Un intérêt majeur pour le dosage du Fe et de l'Hb est donc établi afin de prévenir l'apparition de certaines maladies, de diagnostiquer des anomalies et d'adapter au mieux les traitements.

### 3. Les méthodes de dosages dans les fluides biologiques pour l'analyse du Fe et des ferroprotéines

Le fluide biologique est un terme générique désignant tous les fluides bio-organiques produits par l'organisme. Il en existe plusieurs types : sang, sérum, plasma, urine, salive... Les fluides sanguins sont ceux qui ont le plus d'intérêt pour l'analyse du Fe et des ferroprotéines. Le sang est constitué de plasma (liquide aqueux) contenant des cellules (globules rouges et globules blancs) et des fragments cellulaires (plaquettes). Le plasma et le sérum sont séparés après centrifugation du sang coagulé ou non. La **Figure 8** montre les différentes fractions obtenues après centrifugation. La couche leucocytaire est composée des leucocytes ainsi que des plaquettes sanguines. Le plasma représente 55% du volume du sang total et est constitué principalement d'eau (91%). Il contient 7 % de protéines sanguines (fibrinogène, albumine, globulines) et 2 % de nutriments, d'hormones et d'électrolytes. Le sérum est constitué des mêmes composants que le plasma mais il est libéré des facteurs de coagulation et du fibrinogène.



**Figure 8 : La composition macroscopique du sang total [74].**

#### 3.1. Méthodes analytiques pour la mesure du Fe total

La détermination d'éléments traces comme le Fe dans le domaine biomédical a plusieurs enjeux : la quantification d'oligo-éléments dans des conditions normales ou de maladies, la détection de métaux potentiellement toxiques et le diagnostic de maladies liées à un déficit d'oligo-éléments. Les matériaux biologiques comme les fluides ou les tissus sont des matrices complexes pour l'analyse d'éléments traces à cause de la présence en grande quantité de protéines, de sels inorganiques et de petites molécules organiques. Cependant beaucoup d'avancées durant ces dernières décennies ont permis d'améliorer la précision et la sensibilité des analyses d'éléments traces [41].

À ce jour, il existe différentes méthodes de dosage du Fe que l'on peut classer en trois groupes: les méthodes colorimétriques, les méthodes par spectrométrie d'absorption atomique et les méthodes par spectrométrie de masse [75]. Les techniques par spectrophotométrie et par spectrométrie

d'absorption atomique sont utilisées en routine dans les laboratoires de biologie médicale. La technique d'analyse du Fe par spectrophotométrie est considérée comme la méthode de référence [20]. Les méthodes utilisant la spectrométrie de masse ne sont quasiment utilisées qu'au sein de laboratoires de référence et des NMI. Dans ce travail, nous nous sommes surtout intéressés au dosage du Fe dans le sérum, mais son analyse peut être réalisée dans différents tissus et fluides organiques comme l'urine, les cheveux, la salive, les ongles, ... [76].

Le dosage du Fe dans le sérum est abondamment réalisée dans les laboratoires de biologie médicale de routine pour le diagnostic de l'anémie (5,3 millions d'analyses pour un montant remboursé de 7,3 millions d'euros remboursés en 2015) [77]. La fiabilité des résultats de mesure pour le dosage du Fe représente donc un enjeu important afin de disposer d'un diagnostic fiable et d'adapter au mieux les traitements.

### 3.1.1. Méthode de référence par spectrophotométrie

La méthode de référence de mesure du Fe dans le sérum, définie par l'ICSH en 1970, est une méthode colorimétrique reposant sur la spectrophotométrie [78]. La spectrophotométrie permet l'analyse de solutions colorées en mesurant l'absorbance à une longueur d'onde prédéfinie pouvant se situer dans l'infrarouge (>800 nm), le visible (380 à 800 nm) ou l'ultraviolet (<380 nm). La source lumineuse est émise soit par une lampe à filament de tungstène utilisable pour les longueurs d'ondes du visible ou d'infrarouge soit par une lampe de deutérium utilisable pour les longueurs d'ondes de l'ultraviolet. La lumière arrive au monochromateur qui décompose la lumière blanche en radiations de différentes longueurs d'ondes. À la sortie du dispositif, la lumière monochromatique émet une intensité incidente  $I_0$  qui traverse la cuve contenant la solution étudiée. Ensuite la lumière d'intensité émergente  $I$  arrive au détecteur (photocellule, photodiode ou photomultiplicateur). Enfin le signal est amplifié puis envoyé au système de lecture. La **Figure 9** schématise le principe d'un spectrophotomètre [79].

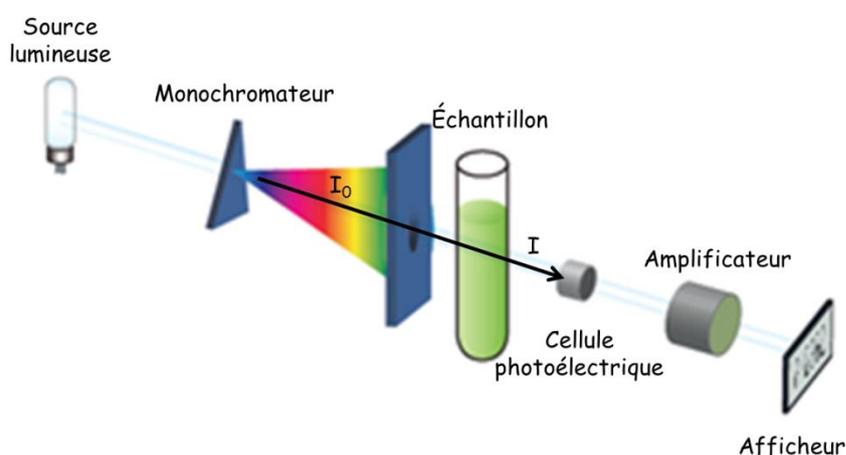


Figure 9 : Schéma général d'un spectrophotomètre [79].

Cette technique est régie par la loi de Beer-Lambert qui permet d'exprimer la transmittance d'un échantillon de la manière suivante :

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-klc} \quad \text{Équation 1}$$

Avec :

- $T$  représente la transmittance de l'échantillon
- $k$  est une constante
- $l$  est la longueur du trajet optique plus précisément la longueur de la cuve qui est généralement de 1 cm
- $c$  correspond à la concentration de la solution exprimée en  $\text{mol.m}^{-3}$

À partir de cette loi, la quantité absorbée, nommée l'absorbance, est définie de manière linéaire comme :

$$A = -\log T = \log \left( \frac{I_0}{I} \right) \text{ d'où } A_\lambda = \varepsilon_\lambda lc \quad \text{Équation 2}$$

Avec :

- $A_\lambda$  est l'absorbance de la solution étudiée pour une longueur d'onde donnée  $\lambda$ . L'absorbance est une valeur positive et sans unité.
- $\varepsilon_\lambda$  est le coefficient d'extinction molaire de la substance absorbante en solution dont l'unité est  $\text{m}^3.\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . Ce coefficient est caractéristique de la substance d'intérêt et défini précisément sous certaines conditions (longueur d'onde, solvant, température,...) [80].

Le principe de la méthode de référence du dosage du Fe dans le sérum repose sur la formation d'un complexe coloré de Fe. En milieu acide, le Fe présent dans le sérum sous forme libre ou associé à la Tf est libéré puis sous l'action d'un agent réducteur, il est réduit sous forme de  $\text{Fe}^{2+}$ . Enfin, un complexe coloré ferreux est formé après l'ajout d'un chromogène.

Le réactif utilisé pour cette méthode contient deux solutions différentes:

- ✓ Une solution permettant la précipitation des protéines composée d'une solution aqueuse contenant 0,6 mol d'acide trichloracétique (TCA), 0,4 mol d'acide thioglycolique (TGA) et 1 mol d'acide chlorhydrique (HCl) par litre. Ce mélange doit être conservé dans une bouteille ambrée et sa stabilité est d'environ 2 mois.
- ✓ Une solution de chromogène contenant de l'acétate de sodium à  $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$  et du disodium-4,7-diphényl-1,10-phénanthroline disulfonate (bathophénanthroline) à  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ . Au cours du temps, ce chromogène a été substitué par deux autres chromogènes plus sensibles et moins coûteux : le ferrozine (3 - (2-pyridyl) -5,6-bis- (5-phényle acide sulfonique)] -1,2,4- triazine) qui est 25% plus sensible et le férène (disodium 3-(2-pyridyl)-5,6-bis-[2-(5-furyle acide sulfonique)]-1,2,4-triazine) qui est 50% plus sensible [81].

Une solution en Fe à  $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$  préparée à partir d'une solution mère de fil de Fe dissous est utilisée pour l'étalonnage [81]. La **Figure 10** représente les différentes étapes nécessaires pour la formation du complexe ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) coloré.



**Figure 10 : Étapes permettant la formation du complexe ferreux coloré [42].**

Le complexe coloré est ensuite mesuré par spectrophotométrie. L'absorbance des mélanges est mesurée par rapport à un blanc d'eau distillée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 535 nm, pour le chromogène bathophénanthroline, après avoir effectué un étalonnage [82]. Les longueurs d'ondes de lecture du férène et du ferrozine sont respectivement 593 nm et 562 nm. La concentration en Fe est calculée directement en utilisant la formule suivante, d'après la méthode définie par l'ICSH :

$$\text{Fe sérum } (\mu\text{M}) = \frac{(\text{Absorbance}_{\text{sérum}} - \text{Absorbance}_{\text{blanc}})}{(\text{Absorbance}_{\text{étalon}} - \text{Absorbance}_{\text{blanc}})} \times 40 \quad \text{Équation 3}$$

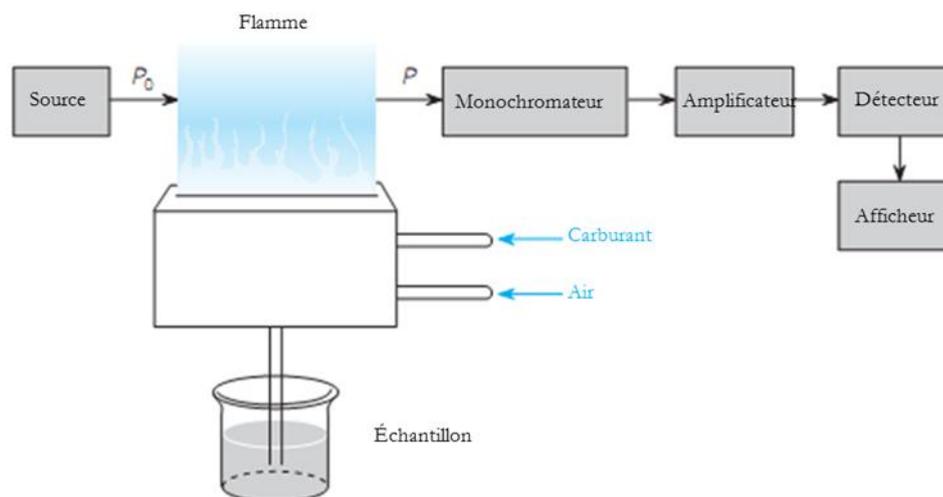
Cette formule est applicable pour l'utilisation de cuves de 1 cm et une détection du complexe coloré ferreux à 535 nm [20].

Ce type de méthode est facile à mettre en œuvre, rapide et représente un faible coût. Le principal inconvénient de cette méthode est le risque d'une mauvaise estimation de la concentration en Fe. Les sources d'erreurs sont le prétraitement initial des échantillons, notamment la dissociation incomplète du Fe lié aux protéines, la co-précipitation du Fe avec des protéines et la réduction incomplète du Fe(III) en Fe(II). De plus, la présence d'autres composés dans le sérum comme la bilirubine et les lipides peuvent donner des interférences spectrophotométriques [83-85]. Cependant grâce à la déprotonisation, la plupart des interférences sont éliminées (bilirubine, Hb, médicaments) [42]. Enfin, certains chromogènes utilisés, comme le ferrozine, réagissent également avec le Cu mais à des concentrations physiologiques cette interférence reste faible [20]. La Haute Autorité de Santé (HAS) a publié un rapport d'évaluation sur les choix des examens du métabolisme du Fe en cas de suspicion de carence en Fe en mars 2011 montrant le résultat du dosage du Fe sérique par plus de 3400 laboratoires différents. La quasi-totalité des laboratoires utilisent une technique colorimétrique. Le coefficient de variation obtenu est de 8,2 % pour le sérum en concentration de Fe basse ( $12 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) et de 6 % pour les sérums plus dosés ( $24 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), des difficultés rencontrées avec certaines techniques pour le dosage des faibles concentrations pourraient expliquer cet écart de coefficient de variation [86].

### 3.1.2. Méthodes par spectrométrie d'absorption atomique

Une autre méthode proche de la spectrophotométrie est aussi utilisée pour la détermination du Fe dans du sérum humain : c'est la spectrométrie d'absorption atomique (AAS). La mesure du Fe dans le sérum nécessite soit une déprotéinisation de l'échantillon par ajout d'acide soit une simple dilution de l'échantillon [87-89]. L'utilisation de la déprotéinisation a notamment pour but d'éliminer les protéines comme l'Hb qui peuvent interférer sur l'analyse du Fe. Un risque de surévaluer la concentration en Fe est possible lors d'une simple dilution due à une hémolyse non visible [90]. Cependant, des études ont montré que les résultats obtenus après une dilution de l'échantillon étaient concordants avec ceux obtenus avec la méthode de référence [91]. L'échantillon est ensuite analysé par AAS. La mesure de la quantité de lumière absorbée permet de déterminer la concentration de l'élément dans l'échantillon (Beer-Lambert). La longueur d'onde utilisée pour la détection du Fe est de 248,3 nm [92].

Le principe de l'AAS repose sur l'absorption de lumière par l'atome libre. Ainsi cette méthode d'analyse élémentaire impose que l'élément à analyser soit transformé en atome libre. La solution contenant l'élément à doser est transformée en un aérosol grâce au nébuliseur et à la chambre de nébulisation. Ce brouillard pénètre ensuite dans le brûleur du spectromètre et l'échantillon est porté à une température de 2000 à 3000 °C dans la flamme. Le mélange air-acétylène dans la flamme est le mélange de gaz le plus répandu pour ce type d'analyse. L'utilisation d'un four cylindrique en graphite à la place d'une flamme permet l'analyse de plus petite quantité. La température de la flamme engendre la destruction des combinaisons chimiques dans lesquelles l'élément est engagé. L'élément d'intérêt se disperse ainsi dans la flamme. La source lumineuse est fournie grâce à une lampe à cathode creuse constituée d'un alliage contenant l'élément à doser. Le faisceau de lumière passe à travers la flamme et se concentre sur la fente d'entrée du monochromateur. Le rôle du monochromateur consiste à éliminer toute la lumière ayant une longueur d'onde différente de celle souhaitée. La longueur d'onde sélectionnée arrive ensuite au détecteur. La **Figure 11** représente le schéma de principe d'un spectromètre d'absorption atomique [93].



**Figure 11 : Schéma du spectromètre d'absorption atomique [94].**

Ce type de technique est sujette à différents types d'interférences pouvant perturber l'analyse : les spectrales ou les non spectrales. Pour les interférences spectrales, l'absorption est faussée par la présence d'autres espèces qui absorbent aussi la lumière. Ces interférences sont relativement peu nombreuses. Les interférences non spectrales sont observées lorsque le rendement d'atomisation est différent entre le milieu de l'échantillon et le milieu de la gamme d'étalonnage. Elles sont de plusieurs types : chimiques, d'ionisation, physiques et spectrales.

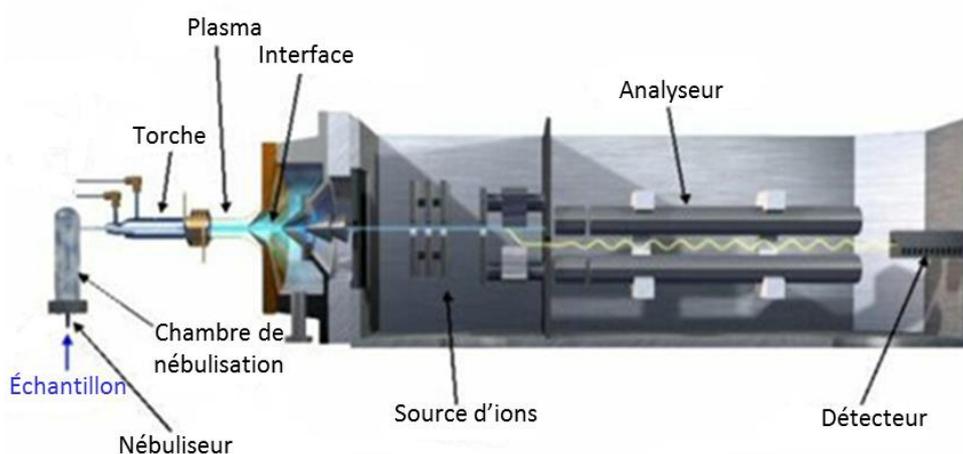
L'AAS est une technique robuste, facile à mettre en œuvre et spécifique qui permet également l'analyse d'autres métaux. De plus, le nombre d'éléments détectables simultanément est de 1 à 10. Cependant, les limites de détection sont assez élevées (de l'ordre du ppb : partie par milliard) et la gamme de travail est limitée ce qui oblige à une dilution des échantillons de concentrations élevées [95]. Pour l'analyse du Fe, la limite de détection est d'environ 1 à 4  $\mu\text{g}$  par litre [88, 93].

### 3.1.3. Méthodes par spectrométrie de masse

Afin de pallier les différentes contraintes rencontrées avec les méthodes de routine, la spectrométrie de masse à plasma induit (ICPMS) peut être utilisée. L'ICPMS est l'une des techniques les plus sensibles pour le dosage de métaux traces dans les milieux biologiques [96]. Les études sur l'analyse du Fe dans les fluides biologiques comme le sérum par ICPMS ont émergé dans les années 90. La préparation d'échantillon est le plus souvent une dilution avec de l'eau ultra pure ou de l'eau acidifiée mais une digestion acide à chaud peut également être réalisée afin d'éliminer la matrice avec plus d'efficacité [97-103].

### 3.1.3.1. Principe de la spectrométrie de masse à plasma induit (ICPMS)

Cette technique repose sur la détection d'ions élémentaires (à l'exception de C, H, O, N) en analysant leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Une torche plasma est connectée via une interface au spectromètre de masse. La solution à analyser est transférée dans le nébuliseur pour la convertir en un aérosol grâce à une pompe péristaltique. L'aérosol est transporté grâce à l'argon (Ar) jusqu'au centre du plasma. La température très élevée du plasma permet de vaporiser et d'ioniser l'échantillon et d'envoyer les ions dans le spectromètre de masse. Les éléments d'intérêts sont détectés à partir de leur rapport  $m/z$  [104]. La **Figure 12** représente le schéma d'un ICPMS.

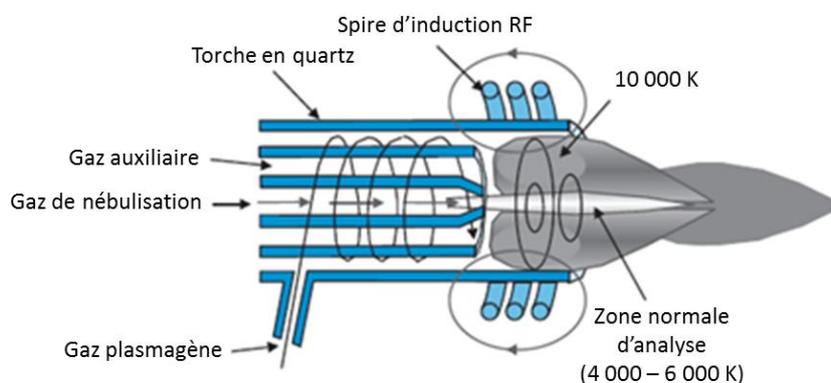


**Figure 12 : Schéma général d'un spectromètre de masse à plasma induit [105].**

Suivant la nature des échantillons, différents types de nébuliseurs peuvent être utilisés : les nébuliseurs concentriques, les micronébuliseurs et les nébuliseurs ultrasoniques. Le nébuliseur concentrique constitué de verre borosilicate est le plus répandu pour les matrices biologiques. L'aérosol se forme lorsque le gaz vecteur (l'argon, Ar) passe à travers un capillaire jusqu'à la chambre de nébulisation. La chambre de nébulisation permet de sélectionner les gouttelettes de l'aérosol selon leur taille afin d'obtenir un aérosol homogène. Seulement 1 % à 3 % de l'échantillon est transmis au plasma.

La torche à plasma est composée de trois tubes de quartz concentriques et d'une bobine d'induction qui est connectée à un générateur Radiofréquence (27,12 MHz le plus souvent). Le courant Radiofréquence alimentant la spire conduit à la génération d'un champ magnétique, qui induit à son tour un courant dans le flux d'argon. La création d'une décharge en sortie de la torche permet l'ionisation de l'argon et la transformation du milieu gazeux en plasma suite à un mécanisme de collisions en chaîne. Alors que le tube le plus extérieur permet de véhiculer, avec un débit proche de  $14 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , l'argon plasmagène à l'origine de la création du plasma, un débit d'argon nettement plus faible, compris entre  $0,7$  et  $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , est utilisé dans le tube intermédiaire pour décoller le plasma de

la torche et éviter sa détérioration. Le tube le plus interne, l'injecteur, permet d'amener, à un débit compris entre 0,6 et 1,2 L.min<sup>-1</sup>, l'argon de nébulisation, qui joue à ce niveau-là le rôle de vecteur de l'échantillon (**Figure 13**).



**Figure 13 : Schéma d'une torche à plasma [106].**

L'échantillon introduit dans le plasma subit différentes étapes successives qui conduisent ainsi à l'obtention d'ions :

- Désolvatation : le plasma élimine le solvant, c'est-à-dire la plupart du temps l'eau à la surface de l'analyte ;
- Vaporisation : il s'agit de la décomposition des particules obtenues en un gaz de molécules individuelles ;
- Dissociation : les molécules ainsi formées sont dissociées en atomes ;
- Excitation et ionisation : ces deux étapes sont rendues possibles par la température du plasma et par les collisions entre les atomes, les ions et les électrons.

Ensuite les ions arrivent à l'interface qui permet de baisser la température et diminuer la pression avant d'arriver au spectromètre de masse. Elle est constituée de deux cônes successifs en nickel ou platine, résistants à la chaleur et chimiquement inertes :

✓ Le cône échantillonneur ayant un orifice de 0,5 mm qui extrait les ions provenant du plasma. Ce cône doit être refroidi de manière efficace avec de l'eau réfrigérée. Derrière cette première ouverture, un vide de 10<sup>2</sup> mTorr est établi à l'aide d'une pompe primaire ; il se produit alors un jet supersonique en aval de cet orifice.

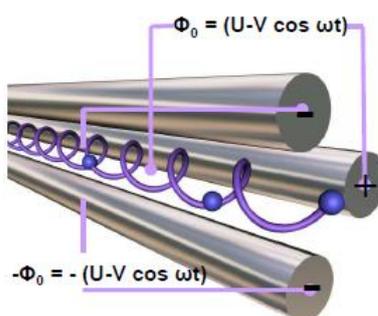
✓ Le cône écrêteur est placé à seulement quelques millimètres derrière le cône échantillonneur. Il permet de prélever le centre de ce jet supersonique et assure le passage des ions vers une seconde chambre, où règne un vide plus poussé (10<sup>-1</sup> mTorr).

A la sortie du second cône, les ions divergent : il faut donc les focaliser avant l'entrée dans le filtre de masse. C'est le rôle de l'optique ionique, constituée d'un ensemble de lentilles

électrostatiques, portées à des potentiels négatifs. Des déflecteurs permettent de dévier le faisceau ionique de l'axe, afin d'éviter que les photons n'atteignent le détecteur et ne le détériorent.

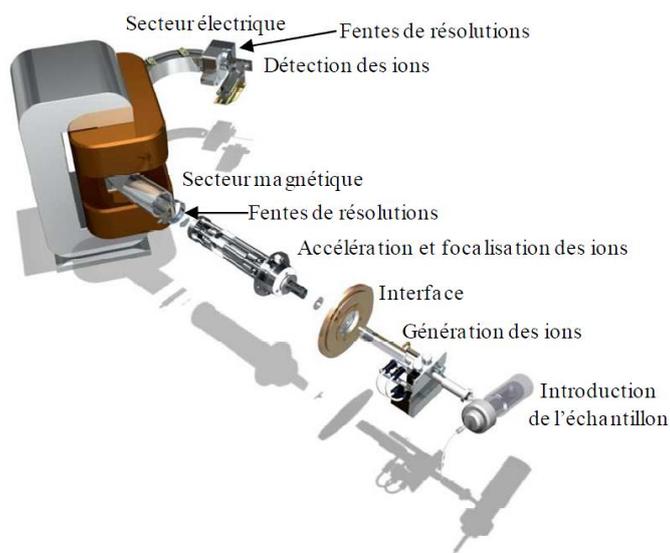
Enfin, le spectromètre de masse permet de détecter les molécules chargées en fonction de leur  $m/z$  et fonctionne sous vide extrêmement poussé ( $10^{-4} - 10^{-5}$  mTorr<sup>1</sup>). Il se compose, d'une source d'ions, d'un analyseur et d'un détecteur (**Figure 12**). La source d'ions, pouvant être de diverses natures suivant le type d'échantillon, permet la production d'ions en phase gazeuse. L'analyseur permet ensuite de séparer les ions produits en fonction du rapport  $m/z$ . Il existe différents types d'analyseurs (filtre quadripolaire, trappe ionique, temps de vol, à transformée de Fourier, orbitrap, à secteur magnétique...) permettant d'obtenir des résolutions variées.

Les deux analyseurs utilisés pendant cette thèse ont été le filtre quadripolaire et l'analyseur à secteur magnétique. Le filtre quadripolaire est composé de 4 électrodes parallèles de section cylindrique sur lesquelles sont appliquées des tensions continues et alternatives (d'amplitudes respectives  $U$  et  $V$ ). Les barres opposées ont le même potentiel et les deux paires ont des tensions continues opposées et des tensions alternatives de même amplitude, mais de signe opposé. Les ions pénétrant au centre des barres adoptent une trajectoire stable ou instable suivant leur rapport  $m/z$  et les tensions appliquées (**Figure 14**).



**Figure 14 : Représentation du quadripôle qui est l'élément essentiel du filtre de masse quadripolaire [106].**

L'analyseur à secteur magnétique fonctionne en faisant circuler le faisceau d'ions au travers d'un aimant ce qui induit un champ magnétique. Les ions sont ensuite filtrés, de par leur angle de mouvement, vers la fente d'entrée de l'analyseur électrostatique. Celui-ci effectue un filtre en énergie du faisceau d'ions en conduisant les ions de faibles écarts d'énergie vers la fente de sortie conduisant au détecteur. La **Figure 15** montre la configuration typique d'un ICPMS à haute résolution.



**Figure 15 : Schéma d'un ICPMS à haute résolution (à secteur magnétique et électrique) [107].**

Après l'analyseur se trouve le détecteur, qui est un compteur et amplificateur de signaux des ions, et qui permet de transformer un courant ionique faible en un signal mesurable. Enfin un système informatique collecte toutes les données à partir de ces trois éléments pour en générer un spectre de masse.

Les principales caractéristiques analytiques de cette technique sont les suivantes :

- Très grande sensibilité (limite de détection: 0001 à 0,1 ng.L<sup>-1</sup>).
- L'analyse multi-élémentaire et multi-isotopique.
- L'analyse isotopique directe possible (rapport isotopique mesuré et dilution isotopique).
- Une interprétation simple des spectres de masse.
- L'analyse quantitative et/ou semi-quantitative.
- Le système d'introduction échantillon simple et facile à coupler à d'autres techniques (la chromatographie liquide à haute performance, la vaporisation électrothermique, l'ablation laser, l'électrophorèse capillaire, l'électrophorèse sur gel ou la chromatographie en phase gazeuse).
- Bonne précision dans la détermination des éléments traces par étalonnage externe avec des étalons internes (2-5%) ou par dilution isotopique (1-3%).

Bien que l'ICPMS soit l'une des techniques d'analyse élémentaire ou de détermination de rapports isotopiques la plus répandue dans le domaine de la biologie clinique, les résultats obtenus peuvent parfois être difficiles à interpréter à cause de la présence d'interférences.

### 3.1.3.2. Interférences en spectrométrie de masse

Un des inconvénients de l'ICPMS est l'existence d'interférences spectroscopiques qui peuvent affecter la mesure. En effet, du fait que le spectromètre de masse discrimine à partir du rapport masse sur charge, les interférences proviennent principalement du chevauchement de masse :

- ✓ les interférences polyatomiques sont dues à des recombinaisons ayant lieu dans la torche à plasma. Les recombinaisons comprennent les oxydes, les chlorures, les nitrures, les sulfures et les espèces composées avec de l'Ar.
- ✓ les interférences isobariques sont présentes lorsque deux éléments possèdent un isotope de même masse nominale.
- ✓ les ions doublement chargés se forment pour les éléments ayant des potentiels d'ionisation faibles comme le calcium (Ca), le strontium, le baryum et les lanthanides [108].

Pour l'analyse du Fe par ICPMS, il existe des interférences polyatomiques avec des recombinaisons avec l'Ar ou le Ca et des interférences isobariques comme présentées dans le **Tableau 9**.

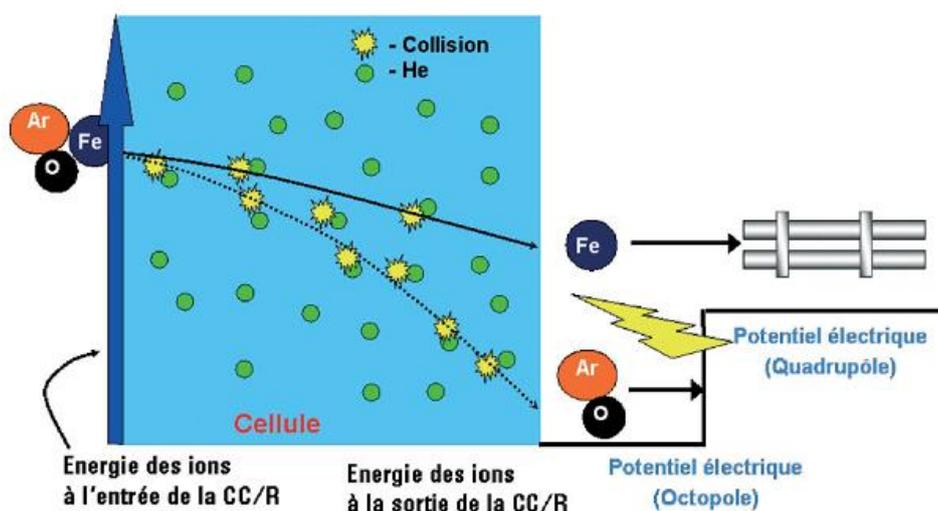
**Tableau 9 : Interférences spectrales des différents isotopes du Fe [108, 109].**

	<sup>54</sup> Fe	<sup>56</sup> Fe	<sup>57</sup> Fe	<sup>58</sup> Fe
<b>Interférences isobariques</b>	<sup>54</sup> Cr (73900)			<sup>58</sup> Ni (28000)
<b>Interférences polyatomiques (Ar)</b>	<sup>40</sup> Ar <sup>14</sup> N <sup>+</sup> (2090) <sup>38</sup> Ar <sup>15</sup> NH <sup>+</sup> <sup>38</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>+</sup> (2990) <sup>36</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>+</sup> (1990)	<sup>40</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>+</sup> (2500)	<sup>40</sup> Ar <sup>17</sup> O <sup>+</sup> (-) <sup>40</sup> Ar <sup>16</sup> OH <sup>+</sup> (1920) <sup>38</sup> Ar <sup>18</sup> OH <sup>+</sup> (1660) <sup>40</sup> Ar <sup>15</sup> NH <sup>+</sup> (1580)	<sup>40</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>+</sup> (2050) <sup>40</sup> Ar <sup>17</sup> OH <sup>+</sup> (7700)
<b>Interférences polyatomiques (Ca)</b>		<sup>40</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>+</sup> (2480)	<sup>40</sup> Ca <sup>16</sup> OH <sup>+</sup> (1900)	<sup>40</sup> Ca <sup>18</sup> O <sup>+</sup> (2040) <sup>42</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>+</sup> (2860)

La résolution nécessaire pour séparer ces interférences est indiquée entre parenthèses.

Ces interférences peuvent être en partie éliminées en utilisant une cellule de collision/réaction (CCT), un ICPMS haute résolution ou des corrections mathématiques [109]. Le principe de la cellule de collision-réaction consiste à introduire un gaz efficace dans la cellule pressurisée pour interagir avec l'analyte ou l'interfèrent. Cette cellule se situe à la sortie des cônes et permet de modifier ou supprimer l'interférence par un mécanisme collisionnel ou réactionnel. Le choix du gaz est primordial. En effet, suivant le gaz utilisé, on se situera soit dans un mécanisme collisionnel (Helium, Ar, Xénon, N<sub>2</sub>, ...) soit dans un mécanisme réactionnel (H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub>, NO, N<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub>, CH<sub>4</sub>, ...) [106]. Lorsque l'on utilise le gaz de collision Hélium (He), alors les interférents entrent plus ou moins en collision avec l'He. Les interférents polyatomiques comme <sup>40</sup>Ar<sup>16</sup>O ont un rayon ionique plus important que les analytes comme le <sup>56</sup>Fe, ainsi ils subissent plus de collision avec l'He. Ceci a pour conséquence de baisser leur énergie cinétique et leur détection n'est plus possible (voir **Figure 16**). Le

processus de suppression est alors un processus physique et non chimique. Ainsi la réaction de dissociation par collision des interférents polyatomiques est la suivante :  $\text{ArO}^+ + \text{He} \rightarrow (\text{Ar} + \text{O})^+ + \text{He}$ .



**Figure 16 : Processus de suppression des interférences à l'aide du mode He à partir de l'exemple du Fe ( $^{56}\text{Fe}$  interféré par  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ ) [110].**

Un autre moyen de supprimer les interférences par un processus de collision est la discrimination par l'énergie cinétique (KED). Les ions entrant dans la cellule pressurisée subissent des collisions avec les molécules de gaz et perdent une partie de leurs énergies cinétiques. La section efficace de collision étant plus grande pour les ions polyatomiques, l'énergie cinétique perdue sera plus importante que celle perdue par les ions monoatomiques. Par conséquent, les ions polyatomiques sortiront de la cellule de collision-réaction avec une énergie plus faible que les ions monoatomiques à analyser.

Différents types de réaction peuvent avoir lieu pour permettre la suppression d'interférences. Le gaz de réaction comme l'hydrogène ( $\text{H}_2$ ) induit les réactions suivantes :

- Transfert de charge :  $\text{ArO}^+ + \text{H}_2 \rightarrow \text{ArO} + \text{H}_2^+$
- Transfert de protons :  $\text{ArH}^+ + \text{H}_2 \rightarrow \text{Ar} + \text{H}_3^+$
- Transfert d'atome d' $\text{H}_2$  :  $\text{Ar}^+ + \text{H}_2 \rightarrow \text{ArH}^+ + \text{H}$  [111, 112].

La CCT permet de supprimer la majorité des interférents du Fe simultanément en ajoutant les gaz appropriés comme l' $\text{H}_2$  et l'He [113]. Cependant, afin d'éliminer l'interférence  $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$  sur le  $^{54}\text{Fe}$ , l'utilisation de gaz comme Kr,  $\text{D}_2$  et  $\text{N}_2$  peut être rencontrée [108]. Le **Tableau 10** montre des applications de ce type de cellule pour l'analyse du Fe dans des matrices biologiques. Le Fe est principalement dosé dans le sérum humain en utilisant soit de l' $\text{H}_2$  soit de l'He avec la CCT. Les différentes études du **Tableau 10** s'intéressent généralement à deux isotopes du Fe : 56 et 57.

**Tableau 10 : Applications de la cellule de collision/réaction pour l'analyse du Fe par ICPMS à filtre quadripolaire.**

Analyte	Matrice	Conditions ICPMS	Préparation échantillon
$^{57}\text{Fe}$ [100]	Sérum humain	Mode standard ICP-Q-MS	Dilution
$^{57}\text{Fe}$ [102]	Sérum ou plasma humain	$3.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1} \text{ He}$	Mélange $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{O}_2$ au <i>hotblock</i>
$^{56}\text{Fe}$ [103]	Sérum ou sang humain	KED 10% $\text{H}_2/\text{He}$	Micro-ondes
$^{56}\text{Fe}$ , $^{57}\text{Fe}$ , $^{54}\text{Fe}$ [109]	Sérum humain	$\text{CO}$ , $\text{NH}_3$ et $\text{N}_2$	Dilution avec $0,14 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ HNO}_3$
$^{56}\text{Fe}$ , $^{57}\text{Fe}$ , $^{54}\text{Fe}$ [108]	Matériaux biologiques	Différents gaz de collision ( $\text{He}$ , $\text{Ar}$ , $\text{Kr}$ , $\text{H}_2$ , $\text{D}_2$ et $\text{N}_2$ )	-
$^{56}\text{Fe}$ , $^{57}\text{Fe}$ [114]	Sérum humain	$\text{H}_2$	-
$^{56}\text{Fe}$ , $^{57}\text{Fe}$ [115]	Hémolysat	$\text{H}_2$	Dilution
$^{56}\text{Fe}$ , $^{57}\text{Fe}$ [116]	Hémolysat	$\text{H}_2$	Dilution
$^{56}\text{Fe}$ , $^{57}\text{Fe}$ [117]	Hémolysat	$\text{H}_2$	Dilution

Cependant une autre alternative peut être utilisée : la technique d'ICPMS à haute résolution. Cette technique est basée sur la déflexion des ions en fonction de leur masse et de leur énergie par un champ magnétique et un champ électrique. Son principe est expliqué dans le paragraphe 3.1.3.1. La trajectoire des ions, longue de près de deux mètres, permet d'obtenir un pouvoir de résolution (défini comme étant le rapport entre la masse moyenne de l'analyte et de l'interfèrent, divisée par la différence de masse entre ces deux ions) de plus de 10000. Le pouvoir de résolution numérique requis pour la mesure est indiqué entre parenthèses dans le **Tableau 9**. Les interférents et les ions sont séparés physiquement par l'augmentation de la résolution et ainsi quasiment tous les interférents sont éliminés par l'utilisation de la moyenne résolution ( $R = m/\Delta m = 4500$ ). Le **Tableau 11** présente des exemples d'applications pour l'analyse du Fe dans des matrices biologiques en utilisant l'ICPMS à haute résolution pour s'affranchir des interférences. Le pouvoir de résolution utilisé est compris entre 3000 et 6000 pour l'analyse du Fe dans du sérum humain. Ainsi les interférences polyatomiques avec l'Ar et le Ca sont éliminées.

**Tableau 11 : Applications pour l'analyse du Fe dans des matrices biologiques par ICPMS à haute résolution.**

Analyte	Matrice	Conditions ICPMS	Préparation échantillon
$^{56}\text{Fe}$ [97]	Sérum humain	R = 3000 (Premier ELEMENT)	Dilution ( $0,14 \text{ mol.L}^{-1} \text{ HNO}_3$ )
$^{56}\text{Fe}$ [98]	Sérum humain	R = 3000	Dilution ( $0,14 \text{ mol.L}^{-1} \text{ HNO}_3$ ) vs digestion par micro-ondes
$^{56}\text{Fe}$ [99]	Sérum humain et bovin	R = 3000	Dilution
$^{56}\text{Fe}$ [101]	Sérum humain et bovin	R = 3000	Dilution
$^{56}\text{Fe}$ , $^{57}\text{Fe}$ , $^{54}\text{Fe}$ [108]	Matériaux biologiques	R = 3000	-
$^{56}\text{Fe}$ , $^{57}\text{Fe}$ , $^{54}\text{Fe}$ [109]	Sérum humain	R = 3000	Dilution avec $0,14 \text{ mol.L}^{-1} \text{ HNO}_3$
$^{56}\text{Fe}$ [102]	Hémolysat	R = 6000	Mélange $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ au <i>hotblock</i>
$^{56}\text{Fe}$ , $^{57}\text{Fe}$ [118]	Sérum humain	R = 3000	Dilution
$^{56}\text{Fe}$ , $^{54}\text{Fe}$ [119]	Sérum humain	R = 4000	Dilution

L'application des corrections mathématiques peut être utilisée pour les interférences isobariques qui ne peuvent pas être éliminées par la CCT ou par l'ICPMS à haute résolution, il est donc nécessaire d'appliquer des corrections mathématiques. Le principe de ces corrections est de mesurer l'intensité de l'isotope interférent dans une autre masse, qui est idéalement libre de toute interférence. Si l'on prend l'exemple du Fe, une interférence isobarique est présente sur son isotope 58 avec du nickel (Ni) comme inscrit dans le **Tableau 9**. Le pouvoir de résolution nécessaire pour séparer cette interférence est trop élevé donc une correction mathématique est nécessaire (s'il y a du Ni dans l'échantillon). Pour cela, il faut choisir un autre isotope de Ni libre d'interférence :  $^{60}\text{Ni}$ . L'intensité mesurée à l'isotope 58 est égale à :  $I_{\text{mesurée}}^{58} = I_{\text{Fe}}^{58} + I_{\text{Ni}}^{58}$ . Or on connaît les abondances naturelles des isotopes du Ni [25, 108, 109] :

$$- A_{\text{Ni}}^{58} = 68,08 \%$$

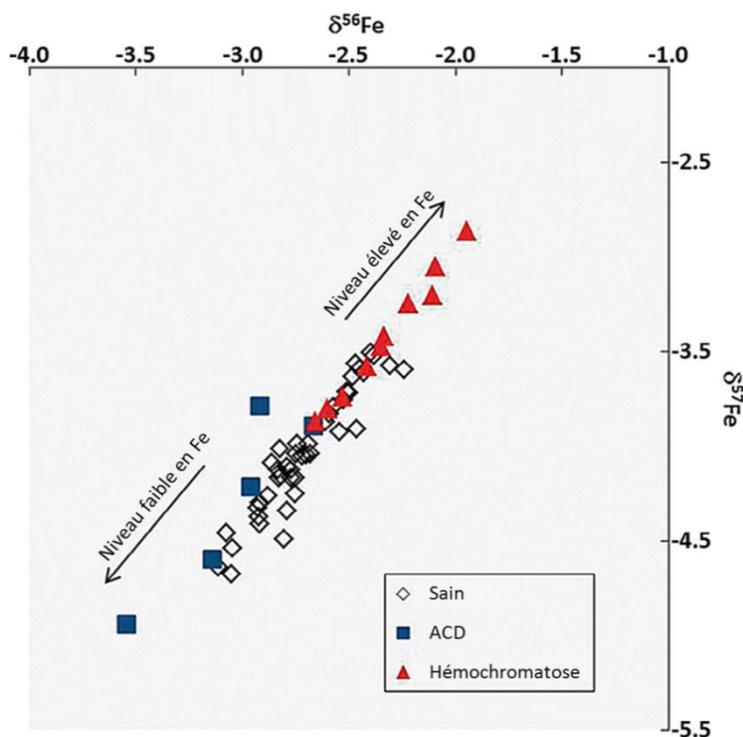
$$- A_{\text{Ni}}^{60} = 26,22 \%$$

Alors, l'intensité finale du  $^{58}\text{Fe}$  correspond à :  $I_{\text{Fe}}^{58} = I_{\text{mesurée}}^{58} - (A_{\text{Ni}}^{58} / A_{\text{Ni}}^{60}) \times I_{\text{Ni}}^{60}$ .

Ainsi, grâce à la mesure de  $^{60}\text{Ni}$ , une correction sur l'isotope de Fe interféré est possible. Le même principe peut s'effectuer sur le  $^{54}\text{Fe}$  avec le chrome (Cr) en analysant un autre isotope du Cr :  $^{52}\text{Cr}$  [108].

La technique ICPMS possède les avantages d'être multi élémentaire, d'avoir d'excellentes limites de détection (de l'ordre du ppt), de permettre la mesure de rapports isotopiques. En effet, un autre type d'instrumentation utilisé pour la mesure indépendante des isotopes de Fe est le multi collecteur (MC) ICPMS. Le principal avantage des équipements MC est la haute précision obtenue dans la mesure des rapports isotopiques (0,001-0,01 % selon le système isotope d'intérêt) en raison de la mesure simultanée de tous les ions qui compense les éventuelles fluctuations du signal. Récemment,

Hotz et al. ont démontré que la composition isotopique du Fe dans le sang reflète la teneur de Fe de l'individu et la réponse de l'organisme à cette teneur [120]. La composition isotopique peut être exprimée selon le rapport isotopique rapporté à un CRM, certifié en isotopie (exprimé en ‰ et noté  $\delta$ ). La **Figure 17** montre un exemple de mesure de la composition isotopique sur des individus sains, atteints d'anémie des maladies chroniques (ACD) et atteints d'hémochromatose. Ainsi, la composition isotopique d'un individu sain est de l'ordre de -2,5 pour  $^{56}\delta\text{Fe}$  tandis que pour les personnes atteintes d'hémochromatose le  $^{56}\delta\text{Fe}$  est compris entre -2,5 et -2,0 [121]. Ainsi, cette méthode de mesure des rapports isotopiques permet de différencier les personnes atteintes d'hémochromatose héréditaire et les individus sains. Ce changement dans le rapport isotopique du Fe peut être dû à la différence d'efficacité de l'absorption du Fe alimentaire (plutôt qu'à des différences dans le métabolisme du Fe) [122-124].



**Figure 17** : Effet du niveau de Fe sur la composition isotopique du Fe dans des échantillons de sang. Les diamants correspondent aux échantillons de contrôle, les triangles correspondent aux patients atteints de l'hémochromatose et les carrés correspondent aux patients ACD [121].

### 3.1.3.3. Quantification par ICPMS

L'ICPMS offre un choix très complet de méthodes de quantification. En plus des techniques conventionnelles (étalonnage externe, étalonnage interne, ajouts dosés), l'ICPMS permet de mettre en place une quatrième méthode, la dilution isotopique.

### 3.1.3.3.1. Étalonnages externe, interne et ajouts dosés

Les méthodes de quantification par étalonnage externe et par ajouts dosés sont très largement rencontrées dans la détermination d'éléments par ICPMS (**Tableau 12**). L'étalonnage externe consiste à mesurer dans un premier temps l'intensité de l'analyte d'intérêt à l'aide de solutions de concentrations connues, afin de tracer une droite d'étalonnage. Puis, à partir de la mesure de l'intensité d'une solution de concentration inconnue, on en déduit la concentration à l'aide de la droite d'étalonnage précédemment déterminée. Pour mettre en place l'étalonnage externe il est important de disposer d'un étalon à l'état pur ou avec un pourcentage de pureté connue. Lors d'un étalonnage externe, il arrive fréquemment que la réponse du détecteur ne soit pas parfaitement proportionnelle à la concentration de l'analyte cible, sur la gamme de concentration choisie. L'étalonnage interne peut être utilisé pour pallier cette mauvaise réponse. Le dosage par étalonnage interne repose sur l'ajout en quantité parfaitement connue et unique, dans toutes les solutions étalon et tous les échantillons, d'une molécule qui sert de référence durant les phases de l'analyse. Cette méthode permet de corriger cet écart à la linéarité. Le dosage se fait de façon relative par rapport à cette molécule de référence, appelée étalon interne. Une autre alternative est la méthode des ajouts dosés afin de corriger des effets de matrice. Elle consiste à ajouter à l'échantillon des quantités d'un étalon de concentration connue comportant l'élément d'intérêt. Après analyse de l'échantillon ainsi que des différents mélanges (ajout + échantillon), une régression linéaire peut être tracée. La concentration de l'échantillon correspond alors à l'intersection de cette droite avec l'axe des abscisses.

Pour le dosage du Fe dans le sérum humain, les étalons internes rencontrés sont le cobalt ( $^{59}\text{Co}$ ), le gallium ( $^{69}\text{Ga}$ ) et l'indium ( $^{115}\text{In}$ ). Les échantillons de sérum sont dilués avec  $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$  d'acide nitrique et la teneur finale de l'étalon interne dans l'échantillon est généralement de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  (voir **Tableau 12**) [97-100]. Les échantillons peuvent aussi subir une digestion acide afin d'éliminer plus efficacement la matrice [98, 102, 103]. Ces méthodes montrent une bonne concordance avec les valeurs des matériaux de référence utilisés ainsi que sur l'analyse d'échantillons réels [98].

L'étalonnage externe est une méthode facile à mettre en œuvre mais longue. Dans la majorité des cas la matrice d'étalonnage est différente de celle de l'échantillon ce qui peut entraîner des différences d'ionisation par exemple. Les ajouts dosés permettent de corriger les effets de matrice mais cette technique est plus complexe à mettre en place surtout quand le nombre d'échantillons est important. En effet, dans la plupart des laboratoires, la méthode des ajouts dosés est mise en œuvre en utilisant une préparation d'échantillon par volumétrie. Les échantillons sont mélangés avec des quantités variables d'étalon dans des fioles jaugées, et toutes les solutions sont amenées à un volume constant. Cependant la préparation par gravimétrie est à privilégier par rapport à celle par volumétrie, pour une meilleure précision et fiabilité. Il est nécessaire de faire des ajouts de quantités appropriées afin d'éviter de diluer l'échantillon. Enfin l'utilisation d'un étalon interne en ICPMS permet de corriger les effets multiplicateurs de la matrice d'un échantillon. L'ajout d'étalon interne est utilisé

pour l'étalonnage externe ainsi que pour les ajouts dosés [125]. Un des points très important pour l'étalonnage interne concerne le choix de l'étalon interne. Celui-ci doit avoir une structure chimique proche de celle des solutés analysés et il ne doit pas être présent dans la matrice initiale.

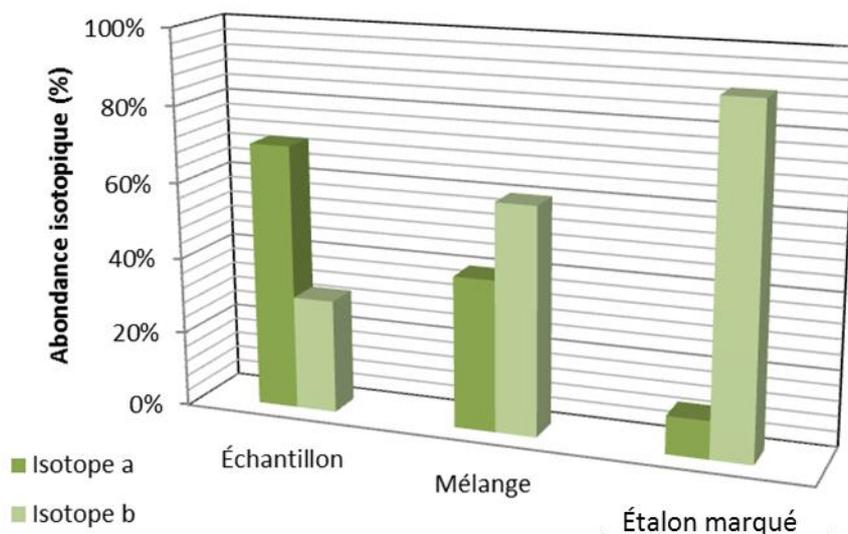
Ces techniques de quantification présentent un certain nombre de limitations qui rendent difficile la mise en place d'une méthode primaire, ainsi une quatrième technique (la dilution isotopique) peut pallier à certains inconvénients.

### 3.1.3.3.2. La dilution isotopique

L'analyse isotopique par ICPMS permet la détermination quantitative et précise de la majorité des éléments en utilisant la méthode de l'ID. L'ID consiste à déterminer la concentration d'un élément dans un échantillon par ajout d'une quantité connue de ce même élément mais dont la composition isotopique a été modifiée artificiellement. Le spectromètre de masse permet de mesurer la composition isotopique de l'échantillon mélangé après avoir atteint l'équilibre isotopique. L'élément à doser doit avoir au minimum deux isotopes stables qui peuvent être mesurés sans interférence par ICPMS. La recherche fondamentale et appliquée sur l'analyse par ID avec détection par ICPMS (ID-ICPMS) a considérablement augmenté au cours des 20 dernières années. La disponibilité des matériaux enrichis isotopiques et l'amélioration des équipements ICPMS a permis l'expansion de l'ID sur des champs d'applications différents [126]. De plus, d'un point de vue métrologique, l'ID peut directement relier le résultat de mesure au SI avec des incertitudes significativement plus petites que celles obtenues par d'autres méthodes et ainsi être considérée comme une méthode primaire par le CCQM.

### 3.1.3.3.3. Principe de la dilution isotopique

Le principe de l'ID est illustré avec la **Figure 18** pour un élément possédant deux isotopes différents a et b. Comme on peut le voir, l'isotope a est le plus abondant dans l'échantillon, tandis que l'étalon marqué (*spike*) est nettement enrichi en isotope b. Les abondances isotopiques du mélange des deux sont intermédiaires entre ceux de l'échantillon et de l'étalon marqué, et dépendent à la fois de la quantité d'étalon marqué ajoutée et de la quantité initiale de l'élément dans l'échantillon.



**Figure 18 : Illustration du principe de la dilution isotopique pour un élément bi-isotopique.**

À partir de la mesure du nouveau rapport isotopique dans le mélange, la concentration de l'élément dans l'échantillon d'origine peut être calculée en utilisant l'équation de l'ID dont le développement mathématique est décrit ci-dessous.

Si  $N_s$  représente le nombre de moles d'un élément inconnu poly-isotopes présent dans l'échantillon et  $N_{sp}$  le nombre de moles du même élément contenu dans l'étalon marqué avec une composition isotopique différente, alors le nombre de moles de l'élément résultant dans le mélange,  $N_m$ , peut s'exprimer par:

$$N_m = N_s + N_{sp} \quad \text{Équation 4}$$

Si on connaît les abondances isotopiques,  $A$ , de deux isotopes,  $a$  et  $b$ , contenu dans l'échantillon et l'étalon marqué, alors on peut exprimer de façon similaire les bilans de masse pour les deux isotopes en prenant en compte les abondances isotopiques :

$$N_m^a A_m^a = N_s^a A_s^a + N_{sp}^a A_{sp}^a \quad \text{Équation 5}$$

$$N_m^b A_m^b = N_s^b A_s^b + N_{sp}^b A_{sp}^b \quad \text{Équation 6}$$

En divisant l'équation 5 par l'équation 6, on obtient le rapport isotopique des deux isotopes ( $a/b$ ) dans le mélange. Ce rapport ( $R_m$ ) s'exprime par:

$$R_m = \frac{N_s^a A_s^a + N_{sp}^a A_{sp}^a}{N_s^b A_s^b + N_{sp}^b A_{sp}^b} \quad \text{Équation 7}$$

En réarrangeant l'équation 7, on obtient :

$$N_s = N_{sp} \cdot \frac{R_m A_{sp}^b - A_{sp}^a}{A_s^a - R_m A_s^b} \quad \text{Équation 8}$$

L'équation 8 est la forme basique de l'équation de l'ID. Ainsi si l'on connaît le nombre de moles ajouté avec l'étalon marqué,  $N_{sp}$ , ainsi que la composition isotopique de l'échantillon et de l'étalon marqué, on peut facilement calculer le nombre de moles,  $N_s$ , de l'échantillon par la mesure du rapport isotopique du mélange.

L'équation 8 peut s'adapter pour être exprimée avec les concentrations au lieu du nombre de moles.

Pour cela, dans un premier temps, on considère  $R_s = \frac{A_s^b}{A_s^a}$  comme le rapport isotopique de l'échantillon

(b/a) et  $R_{sp} = \frac{A_{sp}^a}{A_{sp}^b}$  celui de l'étalon marqué (a/b), alors l'équation 8 devient :

$$N_s = N_{sp} \cdot \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \cdot \left( \frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \right) \quad \text{Équation 9}$$

Les nombres de moles,  $N_s$  et  $N_{sp}$  (mol) peuvent être convertis en fractions massiques ( $\text{g.g}^{-1}$ ) à travers les équations suivantes :

$$N_s = \frac{W_s m_s}{M_s} \quad \text{et} \quad N_{sp} = \frac{W_{sp} m_{sp}}{M_{sp}} \quad \text{Équations 10}$$

Avec :

-  $W_s$  et  $W_{sp}$  représentent les fractions massiques ( $\text{g.g}^{-1}$ ) pour l'échantillon et l'étalon marqué, respectivement

-  $m_s$  et  $m_{sp}$  correspondent aux masses (g) de l'échantillon et de l'étalon marqué, respectivement

-  $M_s$  et  $M_{sp}$  sont les masses atomiques ( $\text{g.mol}^{-1}$ ) de l'échantillon et de l'étalon marqué, respectivement

L'équation finale prend ainsi en compte les masses,  $m_s$  et  $m_{sp}$ , de l'échantillon et de l'étalon marqué ainsi que les masses atomiques,  $M_s$  et  $M_{sp}$ , de l'élément contenu dans l'échantillon et l'étalon marqué.

$$W_s = W_{sp} \cdot \frac{m_{sp}}{m_s} \cdot \frac{M_s}{M_{sp}} \cdot \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \cdot \left( \frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \right) \quad \text{Équation 11}$$

Dans cette dernière équation, la fraction massique de l'élément dans l'échantillon,  $W_s$ , est déterminée par simple mesure de  $R_m$  par spectrométrie de masse puisque tous les autres paramètres peuvent être connus ou mesurés [127].

#### 3.1.3.3.4. Avantages et inconvénients de la dilution isotopique

En associant l'ID à l'ICPMS, des déterminations hautement exactes et précises peuvent être effectuées pour les éléments qui ont au moins deux isotopes libres d'interférences spectrales. L'ID permet de compenser de nombreuses sources d'erreur. Un avantage majeur de l'ID par rapport aux procédures d'étalonnages classiques (étalonnage externe, ajouts dosés, étalon interne) est qu'elle peut

compenser un grand nombre d'interférences physiques et chimiques, telles que les fluctuations du plasma, les instabilités de l'instrument et les suppressions d'analyte par la matrice de l'échantillon [128]. Cette caractéristique est d'une grande importance pour la détermination de nombreux éléments dans des échantillons biologiques, où des effets de matrice importants sont couramment observés.

De plus, l'incertitude de mesure de la concentration ne dépend pratiquement que de celle associée aux rapports isotopiques  $R_s$ ,  $R_{sp}$  et  $R_m$ . En effet, les poids atomiques ( $M_s$  et  $M_{sp}$ ) de l'échantillon et de l'étalon marqué sont connus et les masses ( $m_s$  et  $m_{sp}$ ) peuvent être déterminées gravimétriquement. Enfin, l'ID permet de compenser les pertes d'analyte durant le processus de préparation une fois l'équilibre isotopique atteint. Tout aliquot de l'échantillon dilué contient le même rapport  $R_m$  (invariable) donc, il n'est pas nécessaire de connaître les facteurs de dilution ou de préconcentration utilisés [129]. Enfin, l'ID-ICPMS est considérée comme méthode primaire par le CCQM grâce notamment à sa haute précision et exactitude dans les résultats de mesure [113].

Cependant, l'implication des ressources doit être pris en considération, tels que : le coût des étalons enrichis, le coût des spectromètres de masse et la formation des opérateurs. De plus, les déterminations des éléments mono-isotopique (par exemple, Na et As) en utilisant l'ID sont impossibles. Enfin, certains facteurs affectant la précision de la mesure des rapports isotopiques (par exemple, le temps mort du détecteur, le biais de masse, les interférences spectrales) doivent être contrôlés [113].

### 3.1.3.3.5. Applications de l'ID à l'ICPMS dans des matrices biologiques

La dilution isotopique est de plus en plus utilisée dans le domaine du biomédical pour analyser un grand nombre d'éléments comme le Ca, le Cu, le potassium (K) dans de nombreuses matrices (tissus, sang, sérum,...) [101, 130, 131]. Le **Tableau 12** regroupe quelques exemples de ces différentes applications. Quelques études sur l'analyse du Ca et du K dans du sérum humain utilisent l'ID associée à l'ICPMS avec des résultats montrant une bonne concordance avec les valeurs certifiées des matériaux utilisés (SRM 956a, SRM 956c, SRM 909b) [130-132]. De plus, Sariego et *al.* ont mis au point une méthode pour la détermination de trois éléments traces essentiels (Fe, Cu et Zn) dans le sérum humain par ID-ICPMS. Le rapport isotopique mesuré pour la détermination du Fe est  $^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ . Les échantillons de sérum sont dilués à 1+19 avec de l'eau ultra-pure après l'addition de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ . La méthode proposée a été validée par l'analyse du NIST SRM 1598 (sérum bovin) et les niveaux trouvés sont en accord avec les valeurs certifiées avec une incertitude inférieure à 2%. L'étalon marqué inorganique généralement utilisé pour l'analyse du Fe par ID est enrichi en isotope 57 [101]. Cependant, il est possible d'obtenir des étalons marqués inorganiques métalliques ou sous forme d'oxyde dans les 4 isotopes stables du Fe (54, 56, 57 et 58) [133].

**Tableau 12 : Exemples d'applications de l'analyse d'électrolytes dans les fluides biologiques par ICPMS et différentes méthodes de quantification.**

Élément	Matrice	Technique	Préparation échantillon	Quantification
Ca [134]	Urine humaine	HR-ICPMS R = 4000	Dilution avec 0,14 mol.L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	Rapport isotopique <sup>42</sup> Ca <sup>+</sup> / <sup>43</sup> Ca <sup>+</sup> <sup>44</sup> Ca <sup>+</sup> / <sup>43</sup> Ca <sup>+</sup>
K, Ca et Mg [131]	Sérum humain	HR-ICPMS R = 4000 R = 10000 (pour K)	Dilution avec solution contenant 0.1% NH <sub>4</sub> OH et 1% Triton + digestion par micro-ondes	Dilution isotopique (Étalon marqué <sup>42</sup> Ca, <sup>41</sup> K, <sup>26</sup> Mg)
Ca [132]	Sérum humain	ICP-Q-MS	1) Reflux sur plaque chauffante avec HNO <sub>3</sub> 2) Séparation par échange de cations	Dilution isotopique (Étalon marqué <sup>42</sup> Ca)
Ca [130]	Sérum humain	HR-ICPMS R = 4500	Dilution avec 1% HNO <sub>3</sub>	Dilution isotopique (Étalon marqué <sup>42</sup> Ca)
Ca et Fe [99]	Sérum humain	HR-ICPMS R = 3000 vs ICP-Q-MS ( <sup>56</sup> Fe)	Dilution	Solution d'étalon marqué + étalon interne ( <sup>69</sup> Ga)
Fe [101]	Sérum humain et bovin	HR-ICPMS R = 3000	Dilution	Dilution isotopique avec l'étalon marqué <sup>57</sup> Fe (avant dilution)
Fe [100]	Sérum humain	ICP-Q-MS (première génération) HR-ICPMS	Dilution avec 0,14 mol.L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	Étalon interne <sup>115</sup> In
Fe [97]	Sérum humain	R = 3000 (Premières mesures avec l'ELEMENT)	Dilution avec 0,14 mol.L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	Étalon interne <sup>59</sup> Co (10ng.mL <sup>-1</sup> )
Fe [98]	Sérum humain	HR-ICPMS R = 3000 ( <sup>56</sup> Fe)	Dilution vs digestion par micro-ondes	Étalon interne <sup>59</sup> Co (10µg.L <sup>-1</sup> ) - Étalonnage externe - Simple ajouts dosés Excellente concordance entre les deux méthodes
Fe [103]	Sérum et sang humain	ICP-Q-MS avec KED 10% H <sub>2</sub> /He	Digestion par micro-ondes Sérum : HNO <sub>3</sub> , HCl et H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Sang : HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Étalonnage externe avec étalon interne multiélément (avant digestion)
Fe [102]	Plasma et sérum humain	1) ICP-Q-MS avec 3.0 mL/min He 2) HR-ICPMS R= 6000	Digestion au <i>Hotblock</i>	1) Étalonnage externe avec étalon interne (après digestion) (Cd, Y) 2) Étalonnage externe avec étalon interne (après digestion) (Sc, Ga, Y, In, Bi)

La technique ICPMS possède les avantages d'être multi élémentaire, d'avoir d'excellentes limites de détection (de l'ordre du ppt) et d'offrir un choix complet de techniques de quantification. Cette technique permet aussi une forte productivité pour une utilisation en routine. Les ICPMS utilisés sont majoritairement des ICPMS à haute résolution pour permettre une séparation efficace des interférences polyatomiques nombreuses pour le Fe [97-103]. Outre les problèmes liés aux interférences, la technique ICPMS présente quelques limitations, comme le coût d'investissement pour l'instrument. L'utilisation d'échantillons trop concentrés ou trop chargés en sels peut entraîner des effets mémoires ou des bouchages de cônes, nébuliseurs, ...

Les méthodes de dosage sur le Fe dans les fluides biologiques sont variées et certaines techniques comme l'ICPMS sont prometteuses. Le Fe est présent dans l'organisme sous différentes formes notamment sous la forme d'hémostéines comme l'Hb. Ainsi de nombreuses méthodes d'analyses pour la détermination de l'Hb sont développées afin d'évaluer le bon fonctionnement de l'organisme et prévenir d'éventuel dysfonctionnement.

### **3.2. Méthodes analytiques pour la mesure de l'Hb**

L'analyse de l'Hb se fait généralement dans le sang comme paramètre permettant d'identifier des troubles dans le métabolisme du Fe. Mais l'Hb peut aussi être analysée dans les selles pour détecter des saignements intestinaux ainsi que dans l'urine pour identifier des pertes de Fe pathologiques [32].

La mesure de l'Hb totale permet le diagnostic de certaines maladies comme l'anémie. Des maladies héréditaires, caractérisées par des anomalies de l'Hb, peuvent engendrer des conséquences très graves.

Selon les statistiques de remboursement de la Sécurité Sociale, les tests de laboratoire en hématologie, qui incluent l'analyse d'Hb, occupent la première place en ce qui concerne le nombre de tests de biomarqueurs dans le sang. L'hématologie représente 32 millions de tests par an, avec un coût total de 237 millions d'euros [77].

À ce jour, il existe différentes méthodes de dosage de l'Hb que l'on peut classer en différents groupes: les méthodes par spectrophotométrie, les méthodes électrochimiques, les méthodes par électrophorèse, les méthodes par chromatographie liquide, .... Les techniques par spectrophotométrie sont utilisées en routine dans les laboratoires de biologie médicale. La technique d'analyse de l'Hb par spectrophotométrie est considérée comme la méthode de référence [58].

#### **3.2.1. Méthodes d'estimation de la teneur en Hb totale**

Plusieurs types de méthodes permettent d'estimer la concentration de l'Hb. On peut les distinguer en trois catégories différentes : les méthodes colorimétriques, gazométriques, et gravimétriques. Les méthodes colorimétriques reposent principalement sur une détermination visuelle.

Le principe consiste à observer une correspondance de couleur entre l'échantillon et un étalon. Différentes méthodes existent afin de convertir l'Hb pour la comparer à un étalon. Le **Tableau 13** présente quelques méthodes d'estimation de l'Hb par détermination visuelle. Plusieurs incertitudes apparaissent lors de l'utilisation de la détermination visuelle comme notamment la difficulté d'affirmer que la couleur observée entre l'échantillon et la solution étalon provient d'une seule forme d'Hb. De plus, une autre difficulté relève de la stabilité des solutions étalons. Enfin des erreurs de mesure ou de lecture peuvent être dues à une mauvaise préparation des solutions étalons, une mauvaise perception de la couleur [135, 136].

**Tableau 13 : Quelques méthodes d'estimation de l'Hb par détermination visuelle [135, 137, 138].**

Méthode	Principe	Avantages	Inconvénients
<b>Sahli (hématine acide)</b>	Une faible quantité d'HCl est ajouté à l'échantillon sanguin. Après quelques minutes, on ajoute petit à petit de l'HCl jusqu'à l'obtention d'une des deux couleurs des solutions étalons placées dans l'hémoglobinomètre Sahli de part et d'autre du tube de dilution. La concentration d'Hb (en g/100mL) est ensuite lue à partir de l'échelle graduée sur le tube de dilution.	Simple Rapide Peu coûteux	La couleur obtenue n'est pas stable Pas d'étalon international Peu juste Toutes les Hb ne sont pas converties (HbCO, MétHb, Sulf-Hb) D'autres substances dans le plasma peuvent jouer sur la couleur.
<b>Haldane</b>	Du monoxyde de carbone (CO) est injecté dans l'échantillon de sang puis il est dilué dans une solution d'ammonium. La couleur obtenue est comparée avec des étalons de CO.		Les étalons commercialisés sont peu fiables. La couleur des étalons s'estompe rapidement
<b>Tallqvist</b>	Une goutte de sang est déposée sur un papier buvard. Après quelques minutes, la lecture se fait par comparaison de la couleur à d'autres couleurs de solutions étalons déposées elles-aussi sur du papier buvard. La gamme étalon est graduée en pourcentage d'Hb avec 10 % d'intervalle entre chaque étalon.	Simple Rapide Peu coûteux Pas d'ajout de réactif	Résultats influencés par l'épaisseur et la taille de la goutte de sang Changement suivant la température, l'humidité et la luminosité de l'environnement

La méthode gazométrique repose sur la capacité de l'Hb à créer des liaisons avec le CO. Après avoir ajouté une quantité connue de CO suffisante pour convertir l'Hb en carboxyhémoglobine (HbCO), le CO est libéré et la teneur en HbCO est déterminée par mesure du CO excédentaire avec une solution de ferricyanure. Les principales limitations sont la complexité du processus ainsi qu'un temps d'analyse relativement long [139]. Enfin, la méthode dite spécifique gravimétrique est utilisée en amont d'un don de sang afin de vérifier que la teneur en Hb n'est pas trop faible. Le test est basé sur le comportement d'une goutte de sang dans une solution de sulfate de Cu ayant une densité de 1,053. La goutte de sang se comportera différemment par gravité selon sa concentration. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle ne permet pas d'estimer la concentration de l'échantillon mais simplement de le comparer à une valeur seuil [140].

### 3.2.2. Méthodes par spectrophotométrie

#### 3.2.2.1. Méthode de référence pour la quantification de l'Hb totale

Les premiers travaux sur l'Hb totale remontent aux années 1930 avec Drabkin et Austin [141]. Comme vu précédemment, l'Hb présente dans le sang est un mélange d'Hb, HbO<sub>2</sub>, désoxyhémoglobine et d'autres espèces d'Hb en faible quantité. Par conséquent, pour prendre en compte les différentes formes d'Hb, toutes les espèces sont transformées en cyanméthémoglobine (HiCN), un dérivé d'Hb stable. Une mesure spectrophotométrique est effectuée à une longueur d'onde de 540 nm sur l'HiCN et la détermination de la concentration en Hb se fait à partir de l'absorbance moléculaire. En 1966, l'ICSH approuve la proposition pour laquelle les laboratoires cliniques adoptent la méthode HiCN pour quantifier l'Hb dans le sang. La méthode HiCN est donc établie comme méthode de référence internationale consensuelle [58]. D'autres méthodes de référence peuvent néanmoins être proposées si elles ont préalablement été comparées aux résultats obtenus avec la méthode de référence.

Le sang est collecté dans des tubes contenant un anticoagulant comme de l'oxalate, du citrate, de l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) ou de l'héparine. Ensuite, 100 µL de sang sont dilués dans 25 mL de réactif de composition suivante :

Ferricyanure de potassium, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (0,607 mmol/L) : 0,200 g

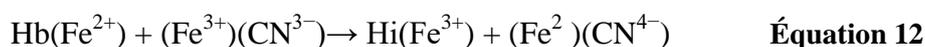
Cyanure de potassium, KCN (0,768 mmol/L) : 0,050 g

Dihydrogénophosphate de potassium, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,029 mmol/L) : 0,140 g

Détergent non ionique (Triton X-100) : 0,5 mL à 1 mL

Eau ultra pure : 1000 mL

La conversion de l'Hb en HiCN se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, le Fe<sup>2+</sup> de l'Hb est oxydé en présence de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> pour former la MétHb. Puis, KCN réagit avec la MétHb pour former l'HiCN. Le KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> permet de tamponner la solution à un pH autour de 7,2. Cette réaction se déroule à température ambiante (18 à 25°C) et la cinétique est d'environ 5 min pour un pH compris entre 7,0 et 7,5. Les équations de réaction sont présentées ci-dessous [142]:



Le réactif original, le « réactif de Drabkin », où le KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> était remplacé par du bicarbonate de sodium (pH du réactif à 8,6), nécessitait un temps de conversion de 15 min [141].

La concentration en HiCN est déterminée spectrophotométriquement à 540 nm en utilisant soit l'étalonnage externe soit la comparaison à une solution de concentration connue. La gamme d'étalonnage en HiCN utilisée est comprise entre 550 et 850 mg.L<sup>-1</sup>. Pour effectuer cette gamme

d'étalonnage, un étalon HiCN ICSH peut être utilisé. Cet étalon a été préparé à partir de sang bovin converti en HiCN, purifié, et certifié via une valeur consensuelle par des laboratoires internationaux de référence par spectrophotométrie d'absorption. La stabilité de cet étalon est de 15 ans et le lot actuel représente la 5<sup>ème</sup> édition d'étalon ICSH d'Hb [143]. Enfin, pour calculer la correspondance entre la concentration en Hb à partir de la mesure de l'absorbance, l'équation suivante est appliquée :

$$C = \frac{A_{HiCN}^{540} \cdot M \cdot F}{\epsilon_{HiCN}^{540} \cdot l \cdot 1000} \quad \text{Équation 14}$$

Avec :

- $C$  représente la concentration en Hb de l'échantillon en  $\text{g.L}^{-1}$ .
- $A_{HiCN}^{540}$  est l'absorbance mesurée de la solution HiCN à 540 nm.
- $M$  correspond à la masse moléculaire relative d'un monomère d'Hb ( $64548/4 = 16114,5$ ).
- $F$  est le facteur de dilution utilisé (par exemple : 251 pour 100  $\mu\text{L}$  de sang dans 25 mL de réactif).
- $\epsilon_{HiCN}^{540}$  correspond au coefficient d'absorption millimolaire qui est égal à  $11 \text{ cm}^{-1}$ .
- $l$  correspond à la longueur du trajet lumineux en cm (1 cm).
- 1000 facteur de conversion de mg à g [58].

D'un point de vue métrologique, la méthode HiCN présente l'inconvénient d'utiliser un étalon international consensuel [144] qui ne respecte pas les exigences d'un étalon primaire. Aucune information n'est disponible concernant les étalons utilisés et selon toute vraisemblance, les valeurs associées à ces étalons ne sont pas traçables aux unités SI. Par ailleurs, cette méthode possède l'inconvénient d'utiliser comme réactif de conversion le KCN, qui est interdit dans plusieurs pays en raison de sa toxicité. Enfin, il a été reporté une conversion incomplète des dérivés de l'Hb (par exemple : la sulfhémoglobine est convertie en cyansulfhémiglobine [142]), ce qui est susceptible d'entraîner un biais négatif.

### 3.2.2.2. Méthodes alternatives à la méthode de référence (HiCN)

Afin d'éviter l'utilisation de KCN et d'améliorer la conversion de l'Hb, d'autres réactifs sont envisagés pour la détermination de l'Hb par spectrophotométrie.

Tout d'abord, la méthode laurylsulfate de sodium (SLS) consiste à remplacer le KCN de la méthode HiCN par du SLS qui est un détergent anionique. Ainsi il y a formation de la SLS-Hb au lieu de l'HiCN. La détection par spectrophotométrie est également réalisée à 540 nm. Le temps de conversion est extrêmement rapide (inférieur à 1 min). Le composé final est stable pendant plusieurs heures à température ambiante et plusieurs semaines à  $4^\circ\text{C}$  [145, 146]. Un avantage comparé à la méthode HiCN est l'absence de toxicité du réactif. Un des inconvénients est le manque de matériau

stable pour effectuer l'étalonnage. De plus, la méthode SLS convertit seulement l'HbO<sub>2</sub>, la MétHb, l'HbCO et la désoxyhémoglobine.

Ensuite, la méthode « hématine alcaline détergent » (AHD) utilise un réactif composé de 25 g de Triton X-100 dans 1 L d'une solution à 0,1 mol.L<sup>-1</sup> NaOH. Le pH du réactif est d'environ 11,8. Il est stable pendant 1 an, insensible à la lumière et moins toxique que le réactif utilisé pour la méthode HiCN. Le réactif est ajouté à l'échantillon en faisant une dilution de 1:151 (10 µL de sang pour 15 mL de réactif). La conversion est totale après 2 min à température ambiante. La détection est effectuée par spectrophotométrie à 575 nm. La méthode AHD est d'un intérêt particulier en raison de la stabilité élevée du produit de réaction, de la faible toxicité du réactif et de son faible coût. De plus, la sulfhémoglobine est également convertie en hémine avec la méthode AHD, une variante qui n'est pas accessible avec la conversion par la méthode HiCN [147, 148].

Enfin, la méthode développée par Vanzetti et *al.* consiste à remplacer le KCN de la méthode HiCN par de l'azoture de sodium (NaN<sub>3</sub>). Ainsi il y a la formation de l'azoture de méthémoglobine (HiN<sub>3</sub>) au lieu de l'HiCN [149]. Cette méthode a été modifiée pour l'utilisation d'instruments de mesures automatisés. Les globules rouges sont alors désintégrés par l'ajout de désoxycholate de sodium afin de libérer l'Hb, puis, du nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) permet d'oxyder le Fe de l'Hb pour former la MétHb. Enfin de l'azoture est ajouté pour convertir la MétHb en HiN<sub>3</sub> [150]. La détection par spectrophotométrie se réalise à 565 nm et 880 nm [137]. Les principaux inconvénients de cette méthode sont d'une part la présence de turbidité de la solution finale, d'où l'utilisation d'une seconde longueur d'onde pour l'analyse (880 nm) et d'autre part la toxicité de NaN<sub>3</sub>.

### 3.2.2.3. Analyseurs utilisés dans les hôpitaux ou laboratoires de routine pour évaluer l'Hb totale

Il existe un grand nombre d'analyseurs pour l'Hb totale : portatifs, compacts et de paillasse. L'hémoglobinomètre permet d'analyser de manière instantanée la concentration en Hb. Suivant les instruments, d'autres analyses peuvent être effectuées en complément comme le suivi du diabète (analyse de l'HbA<sub>1c</sub>), le suivi de certaines maladies (β-thalassémies,...). L'échantillon est du sang veineux, artériel ou capillaire. Généralement, le sang est prélevé au niveau du doigt. Il est ensuite placé dans une cuve adaptée contenant un réactif permettant la conversion de l'Hb. Les méthodes utilisées pour la conversion sont soit la méthode HiCN, soit la méthode HiN<sub>3</sub>. En quelques secondes, la mesure photométrique du taux d'Hb est effectuée et la valeur apparaît sur l'écran d'affichage. Il existe aussi des instruments de mesure, comme les analyseurs d'hématologie et les analyseurs de gaz dans le sang, qui permettent aussi l'analyse de l'Hb totale en plus d'autres paramètres. L'Hb est déterminée par mesure spectrophotométrique après un traitement de conversion (HiCN, HiN<sub>3</sub>, SLS). Pour ce type d'analyseur, une prise de sang est généralement effectuée. Les analyseurs sont fiables et justes mais assez coûteux [137]. Les hémoglobinomètres ont l'avantage d'être utiles dans les situations

d'urgence en raison de leur simplicité d'utilisation, leur précision et la lecture de résultat rapide. Cependant, des erreurs de lectures pourraient se produire lors de la présence de bulles d'air dans la cuve [151].

Plusieurs appareils commercialisés par Masimo Corporation permettent une vérification ponctuelle et des applications de mesure en continu de la concentration en Hb en utilisant un capteur non invasif. Le capteur SpHb émet plus de 7 longueurs d'onde de la lumière pour acquérir des données de concentration d'Hb en fonction de l'absorption de lumière à travers le doigt. Des algorithmes de traitement du signal et des filtres adaptés traduisent les données d'absorption pour quantifier l'Hb basés sur une table empirique «look-up». Les principaux avantages de cette méthode sont son caractère non invasif et le suivi en temps réel des niveaux d'Hb. Cela permet d'améliorer la prise de décisions cliniques et se traduit par des avantages supplémentaires pour les soins aux patients [152]. La technologie SpHb a été validée pour une gamme de concentration de 8 à 17 g/dL Hb avec une précision de  $\pm 1,0$  g/dL. La gamme de travail pour les hémoglobinomètres (portatif, de paillasse ou compact) est plus large (de 0 à 30 g/dL Hb) mais la précision de mesure est identique ( $\pm 1,3$  g/dL).

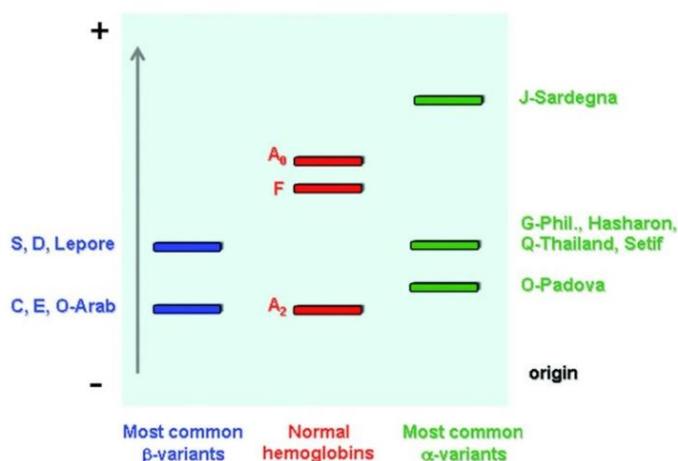
### 3.2.3. Méthodes par électrophorèse

Les méthodes par électrophorèse sont les plus largement utilisées pour identifier et étudier les Hb normales et anormales. L'électrophorèse occupe une des places les plus importantes dans l'histoire de la détection des Hb anormales. L'Hb S est la première Hb anormale découverte en 1949 par Pauling et al. par électrophorèse [153]. C'est une technique de séparation basée sur la mobilité des ions dans un champ électrique. Lorsqu'une différence de potentiel électrique est appliquée, les particules migrent soit vers la cathode soit vers l'anode en fonction de leur charge nette [154]. Différentes méthodes par électrophorèse sont utilisées pour l'analyse de l'Hb.

La méthode par électrophorèse la plus utilisée pour l'analyse de l'Hb est l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin. La migration a lieu sur la couche tampon placée sur la surface de membrane d'acétate de cellulose. A pH 8,6, la molécule d'Hb est chargée négativement, ainsi elle migre vers l'anode [155]. Les positions des différentes fractions d'Hb par électrophorèse sur acétate de cellulose sont représentées sur la **Figure 19** [154]. Cette technique est simple à mettre en œuvre mais elle possède un faible pouvoir de résolution rendant impossible la distinction de nombreux variants. Ainsi l'électrophorèse sur gel d'agar à pH acide (6,2) peut être utilisée en complément pour identifier d'autres variants d'Hb non séparés avec un pH alcalin comme l'Hb S [32, 156, 157]. Cependant cette technique est extrêmement sensible aux conditions expérimentales et donc la reproductibilité est difficile.

L'électrophorèse capillaire (CE) est un outil de diagnostic émergent dans de nombreux laboratoires de chimie clinique pour séparer les fractions d'Hb et calculer le pourcentage de chaque fraction. La séparation repose sur les différences de vitesse de migration des ions. Lorsqu'une tension

est appliquée à travers le capillaire, les cations de la couche diffuse sont libres de migrer vers la cathode, transportant avec eux les différents éléments à analyser. Ces fractions sont détectées directement à une longueur d'onde d'absorbance de 415 nm [154]. Cette technique présente des performances satisfaisantes pour doser les fractions mineures Hb A<sub>2</sub> et Hb F mais plusieurs variants d'Hb ont le même comportement et ne peuvent être séparés.



**Figure 19 : Position des variants d'Hb les plus communs obtenus par électrophorèse sur acétate de cellulose [154].**

Enfin, l'isoélectrofocalisation (IEF) sépare les protéines en fonction des points isoélectriques. Le pHi est le pH spécifique où la charge nette de la molécule est égale à zéro (il est de 6,81 pour l'Hb). Elle donne une bonne séparation avec une résolution élevée par rapport à toutes les autres méthodes [154]. L'IEF réussit à séparer Hb A<sub>0</sub> et la fraction Hb A<sub>1c</sub> bien que la différence de pHi entre les deux soit de seulement 0,01 unité de pH [155].

Les méthodes d'électrophorèse sont encore largement utilisées, quelques difficultés sont cependant rencontrées, notamment l'automatisation compliquée de la méthode ainsi qu'une imprécision dans la quantification des espèces mineures d'Hb. Ces contraintes sont en partie résolues par l'utilisation de gels de polyacrylamide ou d'agarose ou par l'IEF qui offrent une plus grande résolution [156, 157].

### 3.2.4. Méthodes chromatographiques

Grâce à ses différentes caractéristiques, l'Hb peut être caractérisée, purifiée et analysée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). L'Hb est purifiée par chromatographie d'échange d'ions, sa taille est analysée par la chromatographie d'exclusion stérique et la séparation des chaînes de globines peut être effectuée par chromatographie en phase inverse.

### 3.2.4.1. La chromatographie échangeuse d'ions

La chromatographie échangeuse d'ions est basée sur les interactions entre un analyte chargé (anion ou cation) avec la charge (positive ou négative) des groupes fonctionnels de la phase stationnaire. Lorsque des analytes chargés positivement réagissent avec les sites négatifs de la colonne, la méthode de chromatographie est un échange de cation. Lorsque que les analytes chargés négativement interagissent avec les sites positifs, alors c'est un échange d'anions. Tous ces mécanismes sont fortement contrôlés par le pH des phases mobiles puisque cela affecte la dissociation des composés faiblement acides ou basiques. Le remplissage des colonnes est généralement constitué de billes en styrène réticulé et en di-vinylbenzène. Les groupes fonctionnels ioniques liés à la structure rigide sont principalement des groupements d'acide sulfonique et carboxylique (respectivement des échangeurs de cations forts et faibles) ou des groupements d'amine quaternaire ou primaire pour les échangeurs d'anions [158]. Les phases mobiles employées sont des solutions tampons salines et des gradients sont généralement utilisés afin d'augmenter la force ionique durant l'élution. Les principaux inconvénients de l'utilisation de gradient sont le temps d'analyse plus long (pour permettre la rééquilibration de la colonne avec la phase mobile initiale) et le risque de changement du bruit de fond et de la sensibilité durant le gradient [154].

Grâce à la capacité de l'Hb à exister sous forme anionique ou cationique suivant les phases mobiles utilisées, elle peut être analysée aussi bien par chromatographie d'échange d'anions que de cations ou une combinaison des deux types [159]. Pour dépister et quantifier les Hb normales et anormales, la chromatographie échangeuse de cations est la méthode de choix. Le **Tableau 14** montre des exemples de séparation chromatographique par colonne d'échange de cations pour l'analyse de l'Hb. Les différentes fractions d'Hb sont séparées par un gradient de phases mobiles augmentant la force ionique et à pH constant. Pour des analyses cliniques, des systèmes HPLC automatisés sont utilisés comme les systèmes VARIANT II et D-100™ (Bio-Rad, États-Unis) qui permettent d'identifier de manière rapide la présence d'Hb anormales caractéristiques. En effet, le programme  $\beta$ -thalassémie permet l'identification de l'Hb A<sub>2</sub> et de l'Hb F pour des longueurs d'ondes de 415 nm et 690 nm. La colonne PolyCat A™ est l'une des plus populaires pour la séparation des Hb. Elle est constituée de particules sphériques en silice enrobés d'acide aspartique (100 nm). L'élution peut être obtenue à 25 °C avec un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>, un gradient linéaire de 20 minutes à un pH de 6,58 est appliqué, avec force ionique 0,03-0,06 M de NaCl, avec une solution tampon de 50 mM de Bis-Tris et 5 mM de KCN [160]. Ainsi à partir des différents variants de l'Hb, on peut remonter à la détermination de l'Hb totale.

**Tableau 14 : Conditions analytiques pour l'analyse de sang hémolysé par colonne d'échange de cations.**

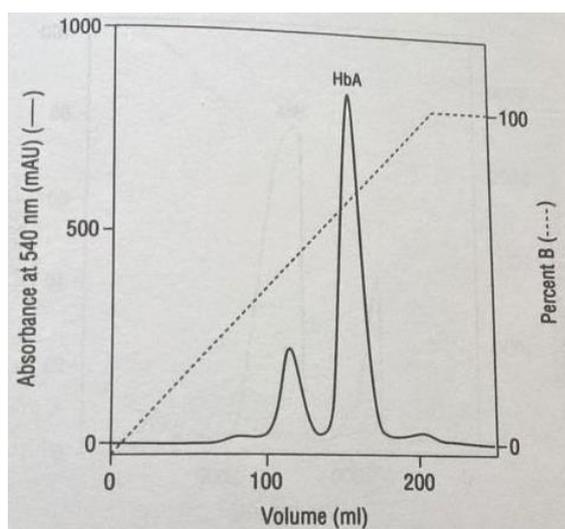
Analyte	Colonne	Phases mobiles	Gradient	Paramètres
<b>Hb A<sub>1c</sub></b>	Mono S 5/50 GL (5×50 mm) [161]	Phase A : 20 mM malonate de sodium, 0,2 g/L NaN <sub>3</sub> , pH 5,7 Phase B : Phase A + 300 mM LiCl	0 – 3 min: 20 à 50% B 3 – 4,1 min: 50 à 75% B 4,1 – 4,4 min: 75 à 100% B 4,4 – 7 min: 100% B 7,01 – 8 min: 20% B	Volume d'injection : 10 µL Débit : 2 mL/min Détection : 415 nm
	Mono S 5/50 GL (5×50 mm) [162]	Phase A : 20 mM malonate de sodium, 0,2 g/L NaN <sub>3</sub> , pH 5,7 Phase B : Phase A + 300 mM LiCl	0 – 3,9 min: 20 à 50% B 3,9 – 4,26 min: 50 à 75% B 4,26 – 4,58 min: 75 à 100% B 4,58 – 11 min: 100% B 11 – 11,8 min: 100 à 20% B 11,8 – 13 min: 20% B	Volume d'injection : 10 µL Débit : 1 mL/min Détection : 415 nm
	Mono S HR 5/5 (5×50 mm) [163]	Phase A : 10 mM malonate de sodium, 0,2 g/L NaN <sub>3</sub> , pH 5,7 Phase B : Phase A + 300 mM LiCl	0 – 1 min: 0% B 1 – 4 min: 0 à 41% B 4 – 5,5 min: 41% B 5,5 – 7,5 min: 41 à 90% B 7,5 min: 0% B	Volume d'injection : 10 µL Débit : 1,5mL/min Détection : 415 nm
	Mono S HR 4.6/100 PE (4,6×100 mm) [164]	Phase A : Malonate d'ammonium, 0,2 g/L NaN <sub>3</sub> , pH 5,7 Phase B : Phase A + 250 mM acétate d'ammonium	0 – 6 min: 0 à 60% B 6 – 10 min: 60 à 75% B 10 – 15 min: 75 à 100% B	Volume d'injection : 15 µL Débit : 1 mL/min Détection : 415 nm
<b>Hb A</b>	Mono S HR 5/5 (5×50 mm) [159]	Phase A : 10 mM phosphate de potassium, pH 6,5 Phase B : 15 mM phosphate de potassium, pH 8,5	0 à 100% B durant 45 volumes de colonne	Volume d'injection : 25 µL Débit : 1 mL/min Détection : 540 nm
<b>Hb A<sub>2</sub> Hb F</b>	PolyCat A (5×0,4 cm) [160]	Phase : 50 mM Bis-Tris, 5 mM KCN, pH 6,58	Gradient linéaire de 20 min en augmentant la force ionique de 300 à 600 mM NaCl	Débit : 1 mL/min Détection : 415 nm
<b>Variants Hb</b>	Carboxym éthylepoly amide (50×4,1 mm) [165]	Phase A : 15 mM Bis- Tris, 100 mg/L KCN, pH 6,0 Phase B : 22 mM Bis- Tris, 300 mM NaCl, 100 mg/L KCN, pH 6,0	0 – 22 min: 12 à 45% B 22 – 25 min: 45% B	Volume d'injection : 10 µL Débit : 1 mL/min Détection : 405 nm
	SynChrop ak CM 300 (250×4,1 mm) [166]	0,03 M Bis-tris, 0 à 0,15 mM Acétate de sodium, 1,5 mM KCN, pH 6,4	Gradient linéaire en augmentant la force ionique de 0 à 0,15 M	Détection : 415 nm

L'utilisation de la chromatographie d'échange d'anions est généralement rencontrée pour la purification de l'Hb par rapport à la présence d'autres protéines ou peptides. Le **Tableau 15** présente quelques conditions analytiques pour l'analyse de l'Hb par colonne échangeuse d'anions.

**Tableau 15 : Conditions analytiques pour l'analyse de sang hémolysé par colonne d'échange d'anions**

Analyte	Colonne	Phases mobiles	Gradient	Paramètres
<b>Variants Hb</b>	SynChropak AX 300 (100×4,1 mm) [166]	Phase A : 15 mM Tris, 1,5 mM KCN, pH 8,6 Phase B : Phase A + 50 mM acetate de sodium	Gradient linéaire en augmentant la force ionique de 0 à 50 mM d'acétate de sodium	Volume d'injection : 8-30 µL Débit : 1 mL/min Détection : 415 nm
	XK 26/40 (400×26 mm) [167]	Phase A : 20 mM Tris-HCl, pH 8,2 Phase B : Phase A + 0,2 M NaCl	Gradient linéaire de 100% A à 75% B en 5 volumes de colonne (100 min)	Volume d'injection : 50 µL Détection : 280 nm
<b>Purification Hb</b>	Hydrophase HP-PEI (100×7,8 mm) [168]	Phase A : 10 mM Tris, pH 8,03 Phase B : Phase A + 200 mM NaCl	Gradient linéaire de 60 min	Quantité injectée : 25 mg Hb Débit : 1 mL/min Détection : 415, 540, 570, 230, 285 nm
	XK 16/10 (2,6×58 mm) [159]	Phase A : 50 mM Tris-Acétique, pH 8,5 Phase B : 50 mM Tris-Acétique, pH 7	20 à 100% B durant 8 volumes de colonne	Débit : 1,5 mL/min Détection : 540, 600, 630 nm

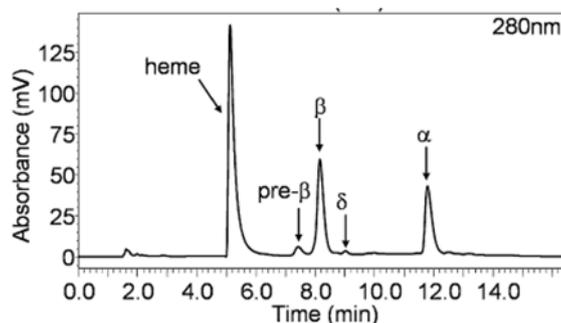
En effet, l'Hb est obtenue après la lyse des globules rouges contenus dans le sang. Une fois le lysat centrifugé et dialysé afin d'éliminer les débris cellulaires, il est purifié en utilisant la chromatographie échangeuse d'anions (les colonnes usuelles sont : Q-Sepharose High Performance et DEAE-Sepharose Fast Flow). Les phases mobiles utilisées sont généralement constituées de Tris à 50 mmol.L<sup>-1</sup> avec un pH compris entre 7 et 8,5. La **Figure 20** montre le chromatogramme d'un lysat de globules rouges humains obtenu par chromatographie par échange d'anions afin d'obtenir l'Hb A purifiée [159].



**Figure 20 :** Chromatogramme d'un lysat de globules rouges humains par chromatographie par échange d'anions (colonne DEAE-Sephacel) à 4°C. Phase mobile A: 50 mM Tris-Ac, pH 8,5; phase mobile B: 50 mM Tris-Ac, pH 7,0. Le gradient est linéaire de 0 à 100 % de phase mobile B.

#### 3.2.4.2. La chromatographie en phase inverse (RP)

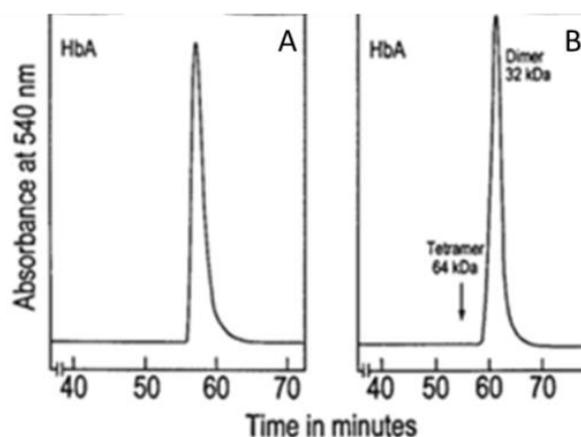
La RP consiste en une phase stationnaire non-polaire (normalement C<sub>18</sub> ou C<sub>8</sub>) liée à un support généralement en gel de silice (non-polaire). Les phases mobiles sont polaires et, par conséquent, les analytes sont partitionnés entre les phases mobiles et stationnaires. La séparation se fait normalement avec des phases mobiles aqueuses contenant des solvants organiques (ex : éthanol, méthanol, acétonitrile, ...) à différents pourcentages pour augmenter la sélectivité entre les espèces. La RP-HPLC est principalement utilisée afin de séparer les chaînes de globines de l'Hb [160]. De plus, elle peut être utilisée dans la détection de maladies touchant la formation des chaînes de globines, comme les thalassémies. Une colonne type C18 permet la séparation du groupe hème et de différentes globines en utilisant des phases mobiles composées d'acétonitrile, de méthanol (MeOH) et d'acide trifluoroacétique (TFA) [169]. La **Figure 21** montre la séparation de l'Hb chez un individu adulte sain. Une séparation plus longue peut aussi être effectuée à l'aide d'une colonne C4 (Vydac C4). Le solvant A est de l'eau acidifiée à 0,1% avec du TFA tandis que le solvant B est de l'acétonitrile acidifié à 0,1 % avec du TFA. Un gradient linéaire de 35 à 50 % de solvant B sur 100 min est utilisé pour l'élution [159]. L'ordre d'élution est identique à celui de la **Figure 21**. La détection s'effectue à une longueur d'onde de 210 nm.



**Figure 21** : Chromatogramme d'une solution d'Hb préparée à partir de cellules d'un adulte normal sur colonne C18 (Jupiter) à  $\lambda = 280$  nm avec un débit de 2,0 mL/min. La phase mobile A est un mélange d'acétonitrile-méthanol, à 90:10 (v / v). La phase mobile B est constituée de 0,5% de TFA dans de l'eau déminéralisée à un pH de 2,6 [169].

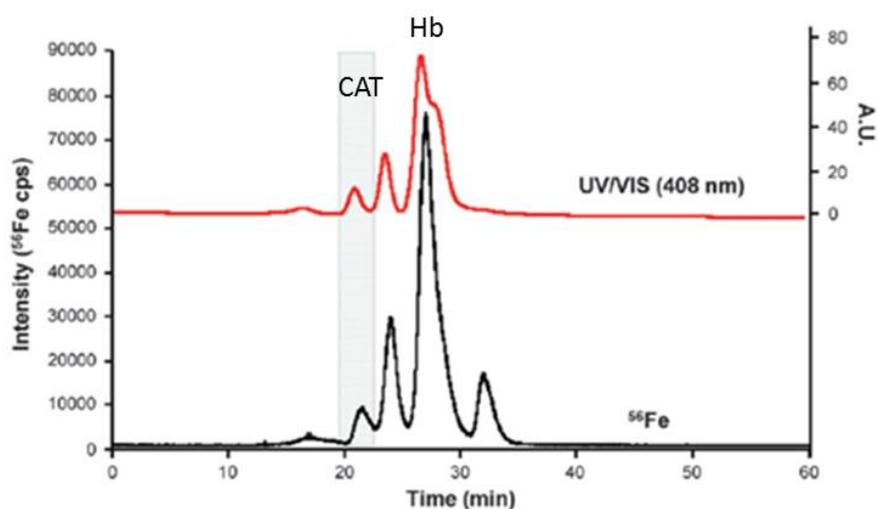
### 3.2.4.3. La chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La SEC a pour but la séparation de molécules en solution selon leur taille effective en utilisant une phase stationnaire constituée de pores de dimension particulière. La molécule trop large pour entrer dans les pores est exclue et éluée en premier, tandis que les plus petites molécules, interagissant plus avec la phase stationnaire, sont éluées selon leur taille effective. Les phases mobiles utilisées pour la SEC sont des solutions tampons qui permettent un minimum de compétition avec le gel de la phase stationnaire. Un des avantages de cette chromatographie est la corrélation qui peut s'établir entre le temps de rétention et la masse moléculaire. Une des principales utilisations de cette chromatographie concerne la purification et la préparation d'un échantillon afin de s'assurer de ne récupérer que de l'Hb. Dans des conditions non dénaturantes, l'analyse SEC de l'Hb est un outil très utile pour établir la structure quaternaire et pour analyser des formes polymères de Hb. Par exemple, l'utilisation de deux colonnes Superose 12 HR 10/30 en série avec des conditions isocratiques (phase mobile : 50 mM Bis-Tris/Acétique, pH 7.4) permet de vérifier que l'Hb se trouve sous la forme d'un tétramère (**Figure 22A**). La dénaturation de la protéine par ajout de chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ) permet de la dissocier en dimère (**Figure 22B**) [159].



**Figure 22 : Chromatogramme obtenu par SEC de l'Hb A sur colonne Sepharose 12 à température ambiante, débit de 0,5 mL/min et détection à 540 nm. (A) La phase mobile utilisée est 50 mM de bis-tris/acétique, pH 7,4. (B) La phase mobile utilisée est 50 mM de bis-tris/acétique, 0,9 M MgCl<sub>2</sub> pH 7,4 [159].**

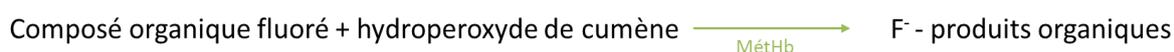
De plus, la SEC est aussi utilisée afin de séparer différentes protéines dans des matrices biologiques pour isoler la fraction contenant la protéine d'intérêt. Par exemple, la **Figure 23** montre la séparation obtenue par SEC pour un échantillon de sang humain traité. Les globules rouges sont séparés du plasma après centrifugation et subissent une hémolyse puis une solution contenant de l'éthanol-chloroforme est ajoutée afin de faire précipiter l'Hb. Ainsi, plusieurs espèces contenant du Fe sont toujours présentes après la précipitation de l'Hb (courbe noire sur la **Figure 23**). Le pic majoritaire de Fe correspond au temps de rétention de l'étalon d'Hb ( $\approx 27$  min), ce qui révèle qu'une faible proportion de cette protéine est encore présente en solution même après précipitation. De plus, les deux VISIBLE et ICPMS révèle la présence de deux pics correspondant à l'éluion de la catalase, CAT (20-25 min) [170].



**Figure 23 : Chromatogrammes d'un échantillon d'érythrocytes humains après traitement obtenu par SEC et détection VISIBLE à 408 nm (courbe rouge) et ICPMS sur le <sup>56</sup>Fe (courbe noire) [170].**

### 3.2.5. Méthodes électrochimiques pour la détermination de l'Hb

Plusieurs essais ont été réalisés pour la détection électrochimique de l'Hb. Ces méthodes reposent sur les propriétés de transfert d'électrons du groupe hème de l'Hb. Un grand nombre de techniques électrochimiques utilisent des électrodes modifiées. De manière générale, la réaction de transfert direct d'électrons sur des électrodes métalliques présente une cinétique lente, hétérogène et irréversible. Le transfert d'électrons hétérogènes directs entre l'Hb et des électrodes d'argent et d'or modifiées a été étudié en utilisant la voltamétrie cyclique (CV). Des pics cathodiques et anodiques ont été obtenus pour l'Hb, MétHb, carbonylHb, HiCN et HbO<sub>2</sub>, ainsi que pour l'ApoHb, exclusivement au niveau des électrodes d'argent modifiées à des potentiels d'environ 70 à 270 mV (par rapport à une électrode de référence Ag / AgCl). Ces résultats démontrent que la chimie d'oxydo-réduction observée ne résulte pas uniquement de transfert d'électrons direct au niveau du centre redox de la protoporphyrine IX. Le potentiel redox global du couple Hb / MétHb a été estimée à -70 mV par rapport à l'électrode calomel saturée (SCE) [171]. De plus, l'Hb, comme d'autres protéines contenant du Fe, présente une activité peroxydase, qui peut être utilisée comme base pour une analyse électrochimique. Une étude de Kobos et *al.* a permis de développer un nouveau procédé électrochimique pour la détermination de l'activité peroxydase en utilisant une électrode sélective d'ions fluorure. Cette électrode permet de surveiller le taux de production d'ions fluorure provenant de l'oxydation catalysée par la peroxydase d'un composé organofluoré par le peroxyde d'H<sub>2</sub>. L'avantage de cette approche est la haute sélectivité et la sensibilité fournie par l'électrode de fluorure. Cette approche a été étendue pour la détermination de l'Hb totale, en utilisant l'activité peroxydase de la MétHb pour catalyser l'oxydation d'un composé organique fluoré, par l'hydroperoxyde de cumène pour produire des ions fluorure, comme suit:

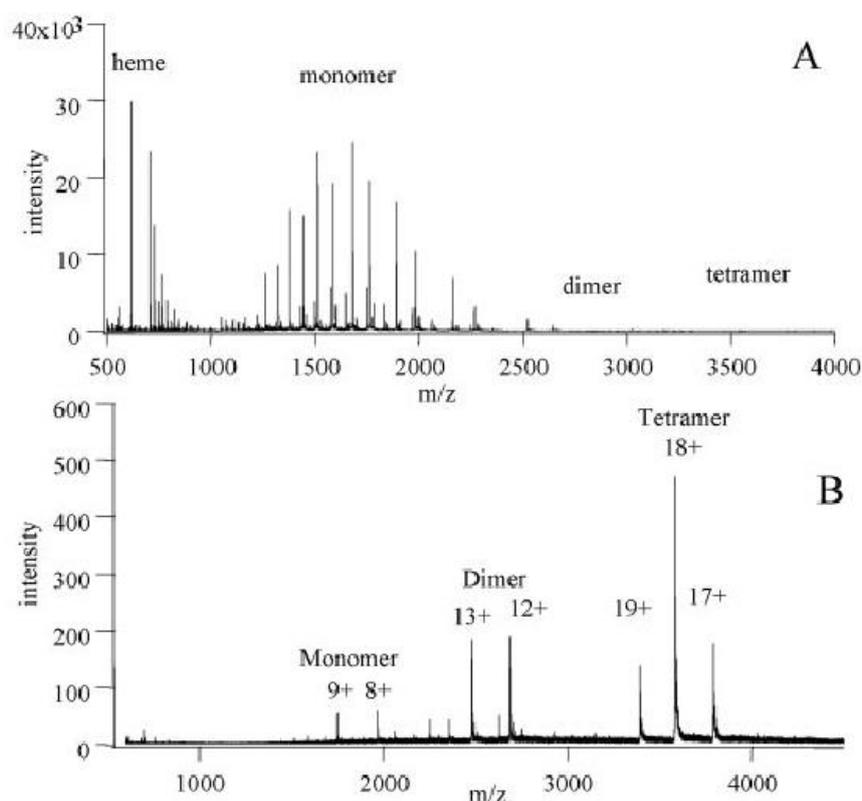


La vitesse à laquelle l'ion fluorure est produit, tel que mesurée par l'électrode sélective d'ions fluorure est proportionnelle à la concentration en Hb. La sélectivité est assurée par l'utilisation du cumène, qui réagit spécifiquement avec le groupe prosthétique de l'Hb. La méthode a été utilisée sur une gamme de concentration de 5,6 à 16 g/dL d'Hb, avec un coefficient de variation compris entre 7 et 11 % [172].

### 3.2.6. Méthodes de caractérisation et d'identification de l'Hb

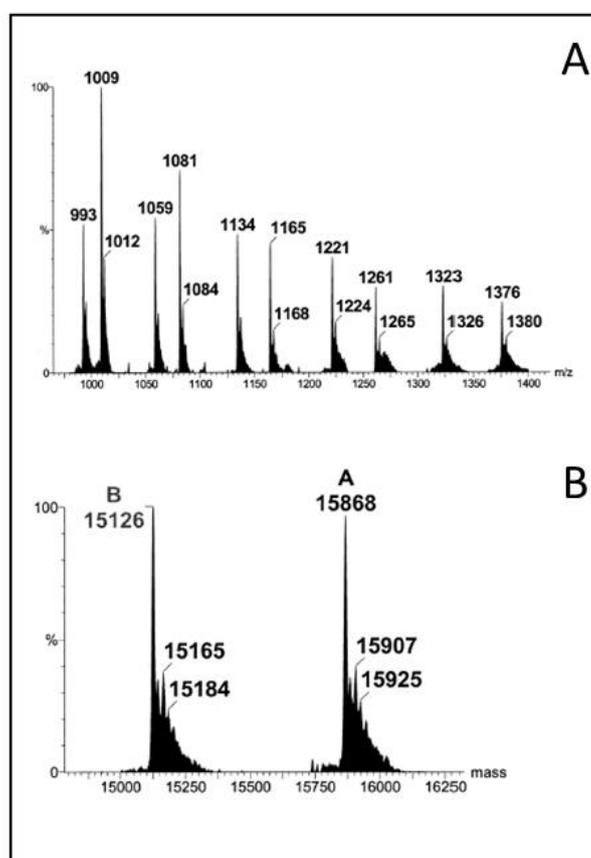
La séparation chromatographique peut aussi être associée à un autre détecteur qui est la spectrométrie de masse. La MS est une technique qui est largement utilisée dans la chimie clinique, la médecine, et la recherche. Le développement de techniques d'ionisation « douces » comme l'électrospray (ESI) et la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) a changé

radicalement la performance de la MS, notamment dans le domaine de la biologie. Ces techniques d'ionisation « douces » permettent d'utiliser la MS pour déterminer, notamment, les masses moléculaires des chaînes de globine intactes. Elles présentent l'avantage de préserver certaines liaisons fragiles comme les liaisons non covalentes [173]. Le système pour la technique d'ionisation MALDI permet de désorber des espèces moléculaires de masses moléculaires très élevées par l'utilisation d'un laser et d'une matrice aromatique cristallisable. Cette source d'ionisation permet d'atteindre des masses plus élevées que l'ESI [174]. En 1990, la première application d'ESI-MS impliquant des chaînes d'Hb intactes a été rapportée par Falick et *al.* [175]. L'utilisation de techniques de MS a conduit à la découverte de plus de 60 nouvelles mutations, et même le tétramère d'Hb intact peut être analysé en utilisant une technique nano ESI-MS [176]. Les séquences peptidiques sont déduites de la présence sur les spectres d'ions fragments dont les valeurs de  $m/z$  correspondent à des enchaînements d'acides aminés déterminés [33]. La **Figure 24** montre un spectre de masse d'Hb intacte obtenu par nano ESI-MS dans des conditions classiques. On peut y distinguer la présence des fragments caractéristiques du groupe hème mais aussi les principaux monomères des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  dans la **Figure 24A**. Lorsque l'on se trouve à pH neutre (**Figure 24B**), on peut apercevoir les monomères, dimères et tétramères des chaînes de globine.



**Figure 24 :** Spectres de masse de 10  $\mu\text{mol/L}$  Hb dans 100  $\text{mL/L}$  de MeOH aqueux contenant 0,1  $\text{ml/L}$  d'acide formique (pH 4; A) et 5  $\text{mmol/L}$  de tampon acétate d'ammonium (pH 7; B) [176].

Grâce à l'analyse en ESI-MS, on peut ainsi retrouver les masses moléculaires des chaînes de globine de l'Hb intacte. La **Figure 25A** montre un spectre typique d'Hb normale analysée par ESI-MS. Les spectres des ions des clusters ont ensuite été déconvolués en masses moléculaires par traitement informatique (**Figure 25B**). Les chaînes de globine normale  $\alpha$  et  $\beta$  ont des masses moléculaires de 15126,4 et 15867,2 respectivement [177]. La précision des mesures est normalement autour de  $\pm 1$  Da pour les composants principaux et autour de 14 Da pour les pics adjacents. La mesure de la masse des composants mineurs présents au niveau de 1 à 2% est normalement réalisée avec une précision de 2 à 3 Da [175]. L'avantage de cette méthode est qu'elle est simple et rapide, avec un temps d'analyse court par échantillon, et qu'elle peut être facilement automatisée.



**Figure 25 : Spectres de masse de l'Hb normale. Le spectre supérieur comprend les données brutes montrant les ions de cluster des deux chaînes de globine  $\alpha$  et  $\beta$ . Le spectre du bas est le spectre déconvolué sur la véritable échelle de masse après transformation à l'aide d'un logiciel.**

La structure de l'Hb peut aussi être identifiée en appliquant la MS en tandem (MS/MS). La MS/MS permet une analyse très rapide des séquences primaires peptidiques, et est particulièrement rapide lorsque seules des variations mineures existent [175]. Cependant, la MS/MS n'est applicable qu'à des composés de masse modérée (au maximum 3000 Da). Il faut donc recourir à une protéolyse initiale pour obtenir un mélange de peptides plus courts qui pourront être analysés individuellement

par MS/MS. En 1981, Wada et *al.* sont les pionniers de l'analyse des peptides tryptiques d'Hb par MS [178]. La digestion tryptique consiste à ajouter dans un premier temps du dithiothréitol (DTT) pour réduire les ponts disulfures afin de faciliter la séparation en peptides. Puis, une alkylation est effectuée par l'ajout d'iodoacétamide (IAM) afin d'éviter la reformation de ponts disulfures et l'ajout de la trypsine permet de couper les peptides après la lysine et l'arginine. Ainsi la chaîne  $\alpha$ , qui possède 141 acides aminés, est divisée en 14 peptides et la chaîne  $\beta$ , qui a 146 acides aminés, est divisée en 15 peptides. Grâce à ce séquençage et après analyse par MS/MS, on peut identifier la présence de la molécule d'Hb.

Ce type de méthode est aussi très utilisé pour identifier les différents types d'Hb normale mais aussi anormale puisque dans la majorité des cas, il n'y a que quelques acides aminés de différence dans leur chaîne de globine [179, 180].

Enfin, l'utilisation de la LC/MS permet aussi d'identifier l'interaction des espèces de métaux lourds comme le mercure (Hg) avec des constituants de masse moléculaire élevée dans les érythrocytes humains comme l'Hb. Cette technique permet d'obtenir des données fiables sur les réactions possibles des espèces d'Hg avec des protéines. Grâce à la digestion enzymatique, le résidu cystéine libre dans les protéines a été identifié comme étant le site de liaison pour le méthylmercure (MetHg) et l'éthylmercure (EtHg). Ces analyses ont permis de mettre en évidence le rôle important de certaines protéines dans le transport d'Hg dans le sang [181, 182].

### 3.2.7. Méthodes de quantification de l'Hb totale par ICPMS

La détermination de la concentration totale d'un oligo-élément dans des échantillons biologiques ne permet pas d'évaluer la toxicité ou d'avoir des informations sur la biodisponibilité. Ces propriétés dépendent non seulement de la concentration d'exposition, mais aussi des formes physiques et chimiques sous lesquelles se trouve l'élément dans l'échantillon d'où l'utilisation de méthode de spéciation. L'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) a défini en 2000 les termes relatifs à la spéciation des éléments :

- L'espèce chimique est la forme spécifique d'un élément défini en fonction de sa composition isotopique, son état électronique ou d'oxydation, sa présence sous forme de complexe et/ou sa structure moléculaire.
- L'analyse de spéciation représente l'activité de chimie analytique visant à l'identification ou la mesure des quantités d'une ou plusieurs espèces chimiques dans un échantillon.

Les espèces chimiques d'un élément sont celles qui déterminent, en fin de compte, ses effets sur l'environnement et / ou les organismes vivants [183].

La quantification de molécules comme l'Hb par ICPMS est possible lorsque que celui-ci est utilisé comme détecteur final. En effet, après une séparation appropriée de l'échantillon, l'hétéroatome (Fe) sélectionné présent dans la molécule d'intérêt peut être détecté par ICPMS. Comme les

informations provenant de l'ICPMS sont élémentaires, seulement les hétéroatomes peuvent être mesurés, alors que ce sont les molécules qui nous intéressent. Par conséquent, le détecteur élémentaire peut être couplé en amont à une technique permettant la séparation de la molécule (par exemple : l'HPLC, l'électrophorèse capillaire, ...) contenant l'hétéroatome. Ces méthodes instrumentales, principalement le couplage HPLC-ICPMS, ont largement été développées ces dernières décennies dans le domaine de la spéciation des éléments traces dans les matériaux biologiques. L'ICPMS est largement utilisé pour la détection d'hétéroatomes en sortie d'une colonne chromatographique pour plusieurs raisons :

- C'est un détecteur élémentaire spécifique.
- Il possède une grande sensibilité sur une large gamme d'éléments.
- Il a une bonne stabilité de sa ligne de base.
- Sa capacité multi élémentaire apporte une information plus complète sur des échantillons complexes (par exemple : différents métaux liés à la même protéine).
- Le débit d'introduction de l'échantillon est compatible avec la chromatographie liquide ( $\approx 1$  mL/min)

Comme dans d'autres domaines de chimie analytique, plusieurs approches de base peuvent être utilisées pour la quantification par ICPMS. La détermination quantitative des hétéroéléments présents dans une biomolécule peut être effectuée en utilisant la méthode de normalisation des aires de pics par étalonnage externe (soit avec des étalons inorganiques soit avec les espèces d'intérêt). Si les étalons appropriés sont disponibles, il est possible d'obtenir des courbes d'étalonnage classiques ou d'utiliser les ajouts dosés pour compenser les interférences dues à la matrice [184]. De plus, l'application de l'analyse par dilution isotopique (IDA) en spéciation élémentaire permet depuis ces dernières années le développement d'approches quantitatives de hautes justesses et précisions pour une large gamme d'espèces élémentaires. Ces applications sont réalisées suivant deux modes d'enrichissement isotopique : le mode spécifique et le mode non-spécifique. Cependant, seul le premier mode peut potentiellement être considéré comme méthode primaire [185].

Dans le mode non-spécifique, l'ajout de l'étalon marqué est effectué après la séparation chromatographique des espèces de l'échantillon (méthode *post-colonne*). Dans ce cas, l'étalon marqué est ajouté sous une forme chimique différente de celle présente dans l'échantillon (habituellement sous forme inorganique). Ce mode est particulièrement utile lorsque l'on ne connaît pas exactement la structure et la composition des espèces à analyser et lorsque l'espèce isotopiquement enrichie n'est pas disponible dans le commerce ou ne peut pas être synthétisée. Cependant, par cette méthode, il est impossible d'obtenir les avantages complets de l'ID conventionnelle. Ainsi, toute perte d'analyte ayant lieu avant la séparation chromatographique ne sera pas corrigée. Sario Muniz et *al.* décrivent le potentiel de la chromatographie échangeuse d'anions couplée à l'ICPMS par l'intermédiaire d'une ID en mode *post-colonne* pour la spéciation du Fe, Cu et Zn, dans le sérum humain. Après la séparation des protéines, une solution mixte contenant les isotopes enrichis,  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{65}\text{Cu}$  et  $^{67}\text{Zn}$ , a été injectée en

continu et mélangée avec les espèces biologiques éluées à la sortie de la colonne. Les signaux analytiques pour le Fe ( $^{56}\text{Fe}$  /  $^{57}\text{Fe}$ ), le Cu ( $^{63}\text{Cu}$  /  $^{65}\text{Cu}$ ) et le Zn ( $^{64}\text{Zn}$  /  $^{67}\text{Zn}$ ) ont été surveillés par ICPMS. La méthode proposée a finalement été appliquée à la spéciation des échantillons de sérum provenant de volontaires sains et des patients sous hémodialyse. Certaines différences de spéciation ont été observées entre les deux populations, en particulier pour la spéciation du Fe, ce qui indique que les études quantitatives de spéciation pourraient être utiles à des fins de diagnostic de la maladie [118]. D'autres méthodes utilisant le mode *post colonne* associée à l'HPLC-ICPMS (par chromatographie d'exclusion stérique) permettent de quantifier la Tf et l'albumine (Alb) dans le sérum humain en utilisant les solutions enrichies isotopiquement par  $^{34}\text{S}$  et  $^{54}\text{Fe}$ . Les résultats obtenus en utilisant cette méthode sont en concordance avec le matériau de référence ERM-DA470/IFCC où une incertitude comprise entre 5 et 10 % est observée [119]. La méthode par *post colonne* a aussi été développée pour l'analyse de l'Hb glyquée et l'Hb totale par chromatographie d'échange de cations couplée à l'ICPMS en utilisant une solution de Fe enrichi en isotope 57 ( $^{57}\text{Fe}$ , 92,4 %). Cette méthode proposée a été validée en déterminant l'Hb glyquée et l'Hb totale (niveaux physiologiques environ 10 à 13 g.dL<sup>-1</sup> Hb) dans des étalons de référence couramment utilisés pour étalonner les analyseurs cliniques et aussi dans un matériau de référence (RM 405). Les résultats relatifs à l'Hb glyquée sont comparés à ceux obtenus pour les mêmes échantillons par un laboratoire clinique de routine. Une bonne concordance entre les résultats a été trouvée dans tous les cas [164].

Le mode spécifique nécessite l'utilisation d'un étalon marqué de l'espèce d'intérêt isotopiquement enrichi. Par conséquent, la composition et la structure de l'espèce d'intérêt doivent être bien connus pour pouvoir la synthétiser (ou l'acquérir si elle est disponible dans le commerce). L'espèce enrichie est ajoutée à l'échantillon en début de processus d'analyse, ainsi le mode spécifique présente tous les avantages offerts par l'ID conventionnelle. Depuis une dizaine d'années, la synthèse de métalloprotéines enrichies isotopiquement s'est développée. Notamment, la synthèse de molécules enrichies en Cu 65 comme la  $^{65}\text{Cu}$ -Rusticyanine, la  $^{65}\text{Cu}$ -Plastocyanine et la  $^{65}\text{Cu}/^{68}\text{Zn}$ -SOD [186-189] mais aussi des métalloprotéines contenant du Fe enrichi en isotope 57 comme la Tf ou la Ft [114, 190, 191]. Dans le cadre du Programme Européen de Recherche en Métrologie (EMRP), le projet HTL05 – Métrologie pour les Métalloprotéines a eu pour objectif le développement des procédures de mesure de référence pour la détermination de métalloprotéines avec des résultats traçables au SI [192]. Ainsi, très récemment, en 2016, Brauckmann et *al.* ont synthétisé un étalon marqué d'Hb A<sub>0</sub> marqué en  $^{57}\text{Fe}$  en remplaçant l'ensemble du groupe hème contenant du Fe naturel par le même groupe enrichi en  $^{57}\text{Fe}$ . Un système d'HPLC associé à un ICPMS a été utilisé afin de quantifier l'Hb à partir de sa teneur en Fe par ID en mode spécifique. Les valeurs obtenues d'Hb totale par les deux méthodes sur deux matériaux de référence (JCCRM 912 certifié en Hb totale et IRMM/IFCC 467 certifié en Hb A<sub>0</sub>) se sont révélées être identiques aux valeurs de références (avec une incertitude inférieure à 3%) [115].

## 4. Métrologie appliquée à l'analyse du Fe et de l'Hb

Les métalloprotéines, impliquées dans un large éventail de processus biologiques importants et trouvées également au centre de maladies graves, sont donc utilisées en tant que marqueurs pour le diagnostic médical. Par exemple, l'Hb totale est considérée comme un marqueur important pour le traitement de l'anémie et ses mesures sont utilisées pour guider les décisions cliniques.

En ce sens, la traçabilité métrologique en biochimie clinique est aujourd'hui exigée pour améliorer la fiabilité et la comparabilité des résultats obtenus dans les laboratoires de routine. C'est dans ce contexte que la réforme de la biologie médicale de 2013 rend obligatoire l'accréditation par le Cofrac de tous les laboratoires de biologie médicale, publics comme privés, selon la norme ISO EN 15189 d'ici 2020. Ce référentiel implique l'utilisation de procédures validées et dont les résultats doivent être raccordés à un étalon national ou international par le biais d'une chaîne ininterrompue de traçabilité métrologique. Actuellement, les résultats des analyses de biologie médicale ne sont pas toujours traçables à des références reconnues internationalement (comme par exemple des matériaux de référence certifiés ou des méthodes de référence) et les incertitudes de mesure ne sont pas systématiquement évaluées. Il est donc nécessaire de disposer de méthodes de référence pour le dosage des principaux biomarqueurs utilisés en biologie médicale.

Jusqu'à présent, les métalloprotéines et un grand nombre de biomarqueurs sont généralement déterminés par immunoanalyse ou par spectrophotométrie, méthodes qui ne sont pas considérées comme méthodes de référence primaire. Ainsi le développement de méthodes primaires sera basé sur la mise en place de la dilution isotopique pour l'analyse de métalloprotéines et d'éléments traces dans des matrices biologiques. Son utilisation dans ce domaine fait apparaître de nouveaux besoins.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, les objectifs principaux seront alors :

- Le développement et la validation de procédures par ID-ICPMS pour déterminer le Fe total dans les liquides biologiques, tels que le sérum et le sang. En effet, le Fe sérique est un paramètre couramment évalué dans l'analyse de routine pour le diagnostic et le contrôle de l'anémie, de l'hémochromatose et des hémoglobinopathies. L'analyse du Fe sérique compromet tout le Fe lié au transport de protéines dans le sérum et ce paramètre exclut le Fe lié à l'Hb.
- Le développement d'une procédure de mesure pour l'Hb en utilisant l'ID-ICPMS. La méthode HiCN par spectrophotométrie pour la détermination de la concentration de l'Hb totale est considérée comme méthode de référence pour les laboratoires de biologie médicale. Cependant, cette méthode ne peut pas être considérée comme une procédure primaire de mesure de référence d'un point de vue métrologique en raison de plusieurs limites (conversion incomplète de toutes les formes d'Hb, traçabilité de l'étalon,...). Afin de remédier à ce problème, des stratégies de spéciation élémentaire seront réalisées

grâce à l'utilisation de techniques hybrides (par exemple HPLC-ICPMS), qui permettent la détection sensible et spécifique du Fe naturellement présent dans le groupe hème associé à la protéine (Hb). La détermination de l'Hb sera menée en développant différentes stratégies d'ID par détection ICPMS.



CHAPITRE 2 : MISE EN PLACE D'UNE  
MÉTHODE PRIMAIRE POUR LA  
DÉTERMINATION DU FER DANS LE  
SÉRUM



Comme présenté dans le Chapitre 1, le Fe est un élément essentiel pour les organismes vivants qui l'utilisent pour la synthèse de protéines responsables du transport de l'oxygène (Hb, Mb) ainsi que pour la formation des enzymes contenant du Fe. Chez l'être humain, son transport dans le sérum se fait principalement après fixation sur la Tf. Le Fe transporté sert à la synthèse de protéines mais aussi à l'approvisionnement des réserves en cet élément. Les valeurs physiologiques du Fe dans l'organisme sont comprises entre  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  et  $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$  Fe ( $560$  à  $1680 \mu\text{g.L}^{-1}$  Fe).

Les méthodes existantes pour le dosage du Fe dans le sérum utilisent généralement la spectrophotométrie ou la spectrométrie d'absorption atomique. La technique par spectrophotométrie est considérée comme la méthode de référence par l'ICSH et présente quelques sources d'erreurs et limitations comme par exemple la dissociation incomplète du Fe lié aux protéines ou la co-précipitation du Fe avec des protéines.

Compte-tenu de la gravité des pathologies associées aux teneurs anormales en Fe et du nombre important d'analyses effectuées, la fiabilité des résultats de mesure pour le dosage du Fe représente donc un enjeu majeur afin de disposer d'un diagnostic fiable et d'adapter au mieux les traitements. C'est dans cet objectif qu'une méthode utilisant l'ID associée à l'ICPMS est développée dans ce chapitre. Tout d'abord, la mise en place de la méthode métrologique par ID de l'analyse du Fe dans du sérum sera expliquée. Puis, les résultats de la validation de la méthode seront abordés. Enfin, la méthode développée pour l'analyse du Fe sera appliquée à des échantillons inconnus de sérum et des échantillons de sang.

# 1. Matériels et méthodes analytiques mis en œuvre

## 1.1. Réactifs et solutions étalons

La préparation des solutions mères de Fe est réalisée à partir d'un matériau de référence certifié de haute pureté pour le Fe, BNM-001 (LNE,  $(99,995 \pm 0,004) \%$  ( $k=2$ )). Une masse d'environ 50 mg est digérée sous champ de micro-ondes dans un mélange de 4 à 6 % d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ). Cette préparation est effectuée deux fois afin d'obtenir deux solutions mères de  $1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Fe chacune. L' $\text{HNO}_3$  est de haute pureté (67-69%, 10 ppt Fe, Fisher chemical, Canada). La solution en étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$  est préparée soit à partir d'un métal enrichi provenant de chez Eurisotop (Saint Aubin, France) où le métal est digéré avec 2 à 4 % d' $\text{HNO}_3$  afin d'obtenir une solution d'environ  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Fe ; soit sous la forme d'une solution marquée certifiée en  $^{57}\text{Fe}$  à  $(10,05 \pm 0,17) \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Fe (*Certipur Reference Material Spike Solution*, IRMM/Merck). La solution multiélémentaire utilisée pour la vérification de la sensibilité de l'HR-ICPMS provient de chez Thermo Fisher Scientific (Allemagne) ainsi que la solution *Tune B* pour l'iCAP Qc ICP-Q-MS et celle pour l'Agilent 7700x sont fournies par Agilent Technologies (*Tuning solution for ICPMS 7500 CS*). L'eau ultra pure de  $18,2 \text{M}\Omega\cdot\text{cm}$  est obtenue en utilisant le système Milli-Q™ (Millipore SAS, France). Tous les réactifs sont des réactifs analytiques de haute pureté et les solutions sont préparées par gravimétrie dans une salle blanche classée ISO 7 à partir de la norme 14644-1.

## 1.2. Échantillons et traitement des échantillons

### 1.2.1. Échantillons étudiés

Les échantillons analysés sont des sérums d'origines animale et humaine. Le premier échantillon (SRM 1598a) est un matériau de référence certifié provenant du laboratoire national de métrologie des Etats-Unis (le NIST) constitué d'un sérum congelé d'origine animale (mélange de sérum bovin et porcin) certifié pour différents éléments dont le Fe. Les trois autres échantillons sont des sérums d'origine humaine. L'échantillon « ERM®-DA 120a *Frozen human serum – trace metals* » du LGC (LGC Standards, Royaume-Uni) est un sérum congelé certifié en Cu, sélénium (Se) et Zn. L'échantillon « CRM BCR®-637 *Human serum* » est un sérum congelé certifié en Al, Se et Zn par l'IRMM (*Institute for Reference Materials and Measurements*, UE). Le dernier échantillon de sérum « B17 » a été fourni par l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de la santé) à l'occasion d'un contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale effectué en décembre 2012 [193]. Il se présente sous forme lyophilisée.

Un échantillon de matrice différente, sang total, « Seronorm™ - *Trace Elements Whole Blood L-1* » provenant de chez Sero (Norvège) est étudié. Il se présente sous forme lyophilisée. Le **Tableau 16** récapitule les informations relatives aux échantillons utilisés. Afin de comparer les différentes

concentrations en Fe, l'unité utilisée sera « la micromole par litre » ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) qui est généralement rencontrée en biochimie clinique. Si besoin, la conversion de l'unité en « microgramme par litre,  $\mu\text{g.L}^{-1}$  » est faite en divisant par la masse molaire exacte du Fe ( $M_{\text{Fe}} = 55,845 \text{ g.mol}^{-1}$ ).

**Tableau 16 : Récapitulatif des informations relatives aux échantillons étudiés.**

Échantillon	Type de matrice	Concentration ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ Fe)	Masse volumique ( $\text{g.mL}^{-1}$ )
<b>NIST SRM 1598a</b>	Sérum congelé, d'origine animale	$30,1 \pm 1,1$ ( $k=2$ )	$1,0274 \pm 0,0006$
<b>ERM<sup>®</sup>-DA 120a</b>	Sérum congelé, d'origine humaine	$9,5 \pm 0,4$ ( $k=2,2$ )	$1,0226 \pm 0,0203$
<b>BCR<sup>®</sup>-637</b>	Sérum congelé, d'origine humaine	-	$1,0237 \pm 0,0006$
<b>B17</b>	Sérum lyophilisé, d'origine animale	$24,4 \pm 0,8$	$1,0270 \pm 0,0001$
<b>Seronorm<sup>TM</sup></b>	Sang lyophilisé, d'origine animale	$5927,1 \pm 590,9$ ( $k=2$ )	$1,0307 \pm 0,0001$

$k$  représente le facteur d'élargissement

### 1.2.2. Matériel

La digestion acide assistée par système micro-ondes est réalisée avec le système Discover SP-D (CEM Corporation, Matthews, États-Unis).

Les balances utilisées présentent les caractéristiques suivantes:

- Balance avec une capacité maximum de 200 g et une résolution de 0,1 mg (Mettler Toledo).
- Balance avec une capacité maximum de 30 g et une résolution de 0,001 mg (Sartorius).

Les balances sont étalonnées périodiquement (tous les 6 mois) et vérifiées quotidiennement en utilisant des masses étalons.

Les tubes de minéralisation utilisés sont d'une contenance de 10 mL en Pyrex (CEM Corporation, Matthews, États-Unis) et les tubes de préparation sont de 50 mL en polypropylène (115/28, gradué, stérilisé, AnaLab, France).

### 1.2.3. Traitement des échantillons

Les échantillons sont préparés à partir de sérums congelés (SRM 1598a, ERM-DA 120a, CRM BCR-637), de sérum lyophilisé (B17) ou de sang lyophilisé (Seronorm<sup>TM</sup>). Pour les échantillons congelés, aucune étape de mise en solution préliminaire n'est nécessaire. Pour l'échantillon lyophilisé de sérum, B17, une étape de reconstitution est réalisée. Une quantité de 5 mL d'eau est ajoutée directement à la poudre par gravimétrie ( $d = 0,1 \text{ mg}$ ). Après 30 min de repos, le mélange est agité doucement afin d'homogénéiser la solution. Ainsi la valeur réelle de l'échantillon B17 doit être corrigée de la mise en solution en prenant en compte sa masse finale ( $4,9753 \pm 0,0001 \text{ g}$ ) et la concentration donnée dans le **Tableau 16**. La concentration cible pour l'échantillon B17 est ainsi de  $24,5 \pm 0,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$  Fe.

Une étape de reconstitution de l'échantillon de sang lyophilisé, Seronorm<sup>TM</sup>, a aussi été effectuée. Une quantité de 3 mL d'eau est ajoutée directement à la poudre en agitant doucement et évaluée par gravimétrie ( $d = 0,1 \text{ mg}$ ). Ainsi la valeur réelle de notre échantillon doit être corrigée de la

mise en solution en prenant en compte sa masse finale ( $3,2588 \pm 0,0001$  g) et la concentration donnée dans le **Tableau 16**. La concentration cible pour l'échantillon de Seronorm™ est donc de  $5456,4 \pm 590,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$  Fe.

### 1.3. Détection

#### 1.3.1. Instrumentation

La détection s'effectue avec un ICPMS sur les isotopes  $^{56}\text{Fe}$  et  $^{57}\text{Fe}$ . Trois instruments de mesure différents ont été utilisés dans cette étude : Agilent 7700x ICP-Q-MS (Agilent Technologies, USA), iCAP Qc ICP-Q-MS (Thermo Fisher Scientific, Allemagne) et ELEMENT XR™ HR-ICPMS (Thermo Fisher Scientific, Allemagne). L'intérêt de travailler avec les trois instruments de mesure est de pouvoir comparer leurs performances suivant des approches différentes pour corriger les interférences (Chapitre 1, paragraphe 3.1.3.2).

L'Agilent 7700x ICP-Q-MS est composé d'un nébuliseur de type concentrique (*Nebulizer Conikal*, Glass Expansion, Agilent technologies) et d'une chambre de nébulisation à impact (*Spray chamber peltier quartz*, Agilent technologies) refroidie à  $3^\circ\text{C}$  par effet Peltier. Le système est équipé de cônes échantillonneur et écrémeur en nickel (Ni) de chez Agilent Technologies. Le **Tableau 17** présente les conditions opératoires utilisées pour l'ICPMS. Les réglages des débits de gaz, la position de la torche ainsi que celle de la lentille ionique sont optimisés pour chaque analyse afin d'obtenir une sensibilité maximale sur une solution multiélémentaire (Li, Ce, Mg, Co, Y, Tl) à  $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$  dans 2 % d' $\text{HNO}_3$ . La cellule est utilisée en mode réactionnel avec un débit d' $\text{H}_2$  de  $5 \text{ mL.min}^{-1}$  permettant d'obtenir un signal sur bruit suffisant et d'éliminer les interférences  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$  du  $^{56}\text{Fe}$  et  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{OH}^+$  du  $^{57}\text{Fe}$ .

**Tableau 17 : Conditions opératoires de l'Agilent 7700x ICP-Q-MS pour la détection du  $^{56}\text{Fe}$  et  $^{57}\text{Fe}$ .**

Agilent 7700x ICP-Q-MS		
<b>Paramètres du plasma</b>	Puissance	1 550 W
	Débit gaz auxiliaire	$1,0 \text{ L.min}^{-1}$
	Débit gaz vecteur	$1,0 \text{ L.min}^{-1}$
	Débit plasmagène	$15 \text{ L.min}^{-1}$
<b>Paramètres d'acquisition</b>	Isotopes mesurés	$^{56}\text{Fe}$ , $^{57}\text{Fe}$
	Temps d'acquisition/point	4 s
	Nombre de points/pic	3
	Répétition	5
<b>Paramètres de la cellule de collision/réaction</b>	Débit $\text{H}_2$	$5 \text{ mL.min}^{-1}$
	Biais CCT	- 18 V
	Biais quadripôle	- 15 V

L'iCAP Qc ICP-Q-MS est composé d'un nébuliseur de type concentrique (*Conikal Nebulizer*, Thermo Fisher Scientific) et d'une chambre de nébulisation cyclonique (*Quartz Cyclonic*

*Spray Chamber*, Thermo Fisher Scientific) refroidie à 3°C par effet Peltier. Le système est équipé de cônes échantillonneur et écrémeur (0,5 mm avec insert) en Ni de chez Thermo Fisher Scientific. Le **Tableau 18** présente les conditions opératoires utilisées pour l'ICPMS. Les réglages des débits de gaz, la position de la torche ainsi que celle de la lentille ionique sont optimisés pour chaque analyse afin d'obtenir une sensibilité maximale sur une solution multiélémentaire (Ba, Bi, Li, Ce, Co, In, U) à 1 µg.kg<sup>-1</sup> dans 2 % d'HNO<sub>3</sub> et 0,5 % d'HCl. La cellule est utilisée en mode collision avec un débit d'He de 4 mL.min<sup>-1</sup> permettant d'obtenir un signal sur bruit suffisant et d'éliminer les interférences <sup>40</sup>Ar<sup>16</sup>O<sup>+</sup> du <sup>56</sup>Fe et. <sup>40</sup>Ar<sup>16</sup>OH<sup>+</sup> du <sup>57</sup>Fe.

**Tableau 18 : Conditions opératoires de l'iCAP Qc ICP-Q-MS pour la détection du <sup>56</sup>Fe et <sup>57</sup>Fe.**

iCAP Qc ICP-Q-MS		
<b>Paramètres du plasma</b>	Puissance	1 550 W
	Débit gaz auxiliaire	0,8 L.min <sup>-1</sup>
	Débit gaz vecteur	1,05 L.min <sup>-1</sup>
	Débit plasmagène	14 L.min <sup>-1</sup>
<b>Paramètres d'acquisition pour la détermination par ID</b>	Isotopes mesurés	<sup>56</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe
	Temps d'acquisition	0,2 s
	Nombre de balayage	60
	Répétition	5
<b>Paramètres d'acquisition pour la mesure des abondances isotopiques</b>	Isotopes mesurés	<sup>56</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe, <sup>54</sup> Fe, <sup>58</sup> Fe
	Temps d'acquisition	0,2 s
	Nombre de balayage	60
	Répétition	5
<b>Paramètres de la cellule de collision/réaction</b>	Débit He	4 mL.min <sup>-1</sup>
	Biais CCT	- 21 V
	Biais quadripôle	- 18 V

**L'ELEMENT XR™ HR-ICPMS** est composé d'un nébuliseur de type concentrique (*Nebulizer Meinhardt*, Thermo Fisher Scientific) et d'une chambre de nébulisation à impact (*Spray chamber peltier quartz*, Thermo Fisher Scientific) refroidie à 3°C par effet Peltier. Le système est équipé de cônes échantillonneur et écrémeur de hautes performances en Ni de chez Thermo Fisher Scientific. L'analyseur est à double focalisation : champ magnétique puis champ électrique. Deux types de détecteurs sont présent : un collecteur de Faraday et un multiplicateur d'électrons SEM (Multiplicateurs d'électrons secondaires). Le **Tableau 19** présente les conditions opératoires utilisées pour l'ICPMS. Les réglages des débits de gaz, la position de la torche ainsi que celle de la lentille ionique sont optimisés pour chaque analyse afin d'obtenir une sensibilité maximale sur une solution multiélémentaire (Li, B, Na, K, Sc, Fe, Co, Ga, Y, Rh, In, Ba, Lu, Tl, U, Si) à 0,2 µg.kg<sup>-1</sup> dans 2 % d'HNO<sub>3</sub>.

**Tableau 19 : Conditions opératoires de l'ELEMENT XR™ HR-ICPMS pour la détection du <sup>56</sup>Fe et <sup>57</sup>Fe.**

ELEMENT XR™ HR-ICPMS		
<b>Paramètres du plasma</b>	Puissance	1 550 W
	Débit gaz auxiliaire	0,8 L.min <sup>-1</sup>
	Débit gaz vecteur	1,00 – 1,10 L.min <sup>-1</sup>
	Débit plasmagène	16 L.min <sup>-1</sup>
<b>Paramètres d'acquisition pour la détermination par ID</b>	Mode d'acquisition	Intensités
	Type d'intégration	Moyenne
	Isotopes mesurés	<sup>56</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe
	Temps d'intégration/point	0,05 s
	Nombre de points/pic	20
	Nombre de balayage	15
	Répétition	5
	Fenêtre de masse	100
<b>Paramètres d'acquisition pour la mesure des abondances isotopiques</b>	Mode d'acquisition	Intensités
	Type d'intégration	Moyenne
	Isotopes mesurés	<sup>56</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe, <sup>54</sup> Fe, <sup>58</sup> Fe
	Temps d'intégration/point	0,05 s <sup>54</sup> Fe, <sup>58</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe 0,02 s <sup>56</sup> Fe
	Nombre de points/pic	20
	Nombre de balayage	15
	Répétition	5
	Fenêtre de masse	100
<b>Paramètres de la moyenne résolution</b>	Résolution	Moyenne résolution (m/Δm = 4500)
	Masse de l'aimant	55,934
	Temps de stabilisation de l'aimant	0,001 s

Les réglages sont effectués pour les trois types de résolution : basse, moyenne et haute. Pour l'analyse du Fe, la moyenne résolution (m/Δm = 4500) est utilisée afin d'éviter les interférences polyatomiques (<sup>40</sup>Ar<sup>16</sup>O<sup>+</sup>, <sup>40</sup>Ar<sup>16</sup>OH<sup>+</sup>). La séparation des interférents est vérifiée avant l'analyse comme présenté dans la **Figure 26** avec l'exemple du <sup>56</sup>Fe. De plus, malgré l'étalonnage en masse effectuée sur l'ensemble des éléments, des légers décalages peuvent être observés en moyenne et haute résolutions. Ainsi pour les isotopes du Fe un recalage en masse est effectué (nommé *MassOffset*) tous les jours.

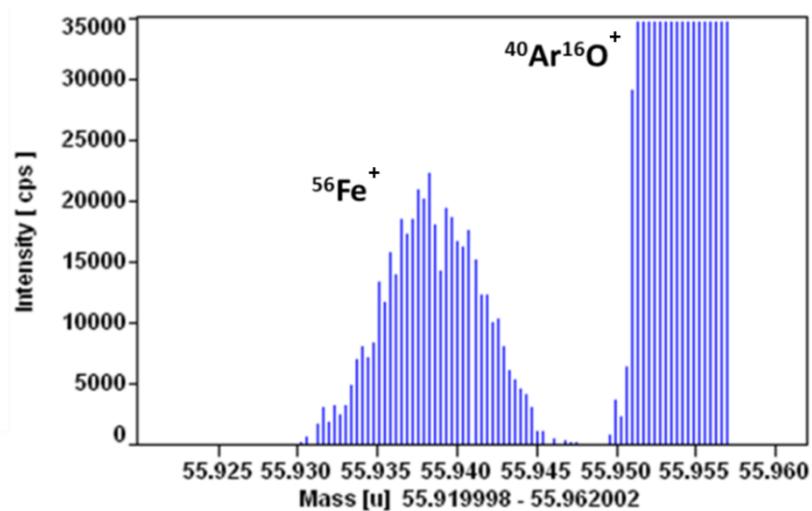


Figure 26 : Spectre de masse pour le  $^{56}\text{Fe}$  et l'interfèrent  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$  en moyenne résolution d'une solution de Fe à  $0,2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

### 1.3.2. Optimisation de la détection

Afin d'améliorer l'exactitude et la justesse de comptage des ICPMS pour mettre en œuvre l'ID, des essais ont été réalisés. Le biais en masse et le temps mort sont les principaux facteurs perturbant la justesse de comptage. De plus, l'utilisation de l'ID nécessite la mesure d'isotopes libres d'interférences, donc il est indispensable de vérifier l'absence d'interférences pour les isotopes d'intérêt.

#### 1.3.2.1. Temps mort du détecteur

Les détecteurs multiplicateurs d'électrons fonctionnant en mode «comptage d'ions» (mode le plus couramment utilisé en ICPMS) doivent être étalonnés avant utilisation. En effet, le temps mort, qui correspond à la période nécessaire au détecteur pour prendre en compte l'impulsion induite par un ion, doit être réglé. Durant cet instant, si un second ion frappe le détecteur tandis que l'impulsion induite par l'ion précédent traverse encore le système de détection, alors le signal provenant du second ion ne sera pas détecté. Le détecteur est aveugle pour cet ion, jusqu'à ce que l'impulsion précédente soit comptée.

Le temps mort peut être déterminé en surveillant, par exemple, le rapport isotopique  $^{238}\text{U}/^{235}\text{U}$  à différentes concentrations. Une fois les données recueillies, le rapport isotopique normalisé ( $R_{\text{mesuré}}/R_{\text{théorique}}$ ) est tracé en fonction du temps mort. L'intersection des différentes courbes donne la valeur du temps mort du détecteur [194].

Ainsi, une conséquence du temps mort dans la mesure de rapport isotopique est l'écart entre le rapport mesuré et le « vrai rapport », dû aux effets de temps mort dans la mesure de l'isotope le plus abondant, ainsi une correction peut être nécessaire, comme le montre la **Figure 27**.

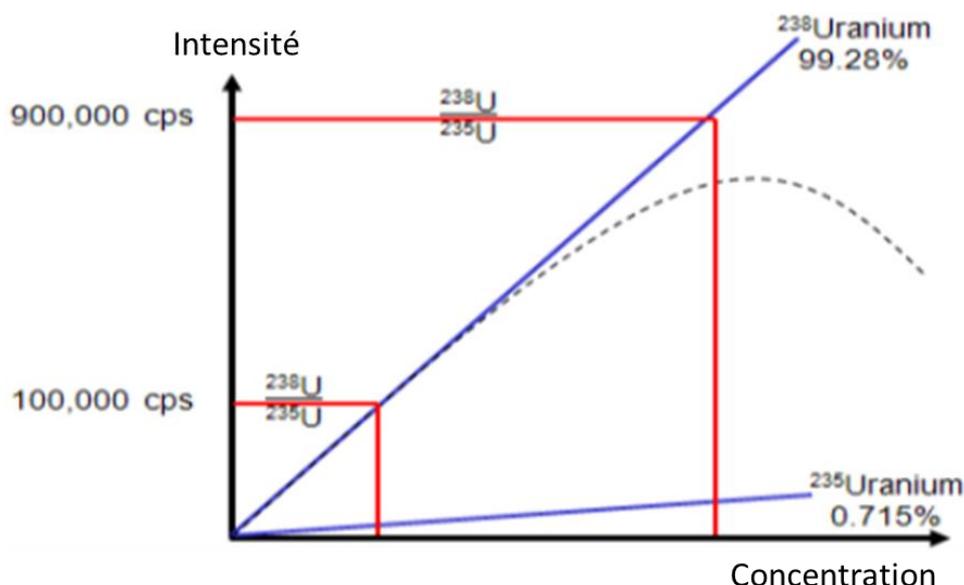


Figure 27 : Représentation du signal théorique de l'uranium à l'isotope 238 et du signal mesuré.

Lorsque l'on trace la réponse du détecteur par rapport à une concentration croissante d'analyte (par exemple, l'uranium), nous observons qu'à des concentrations élevées, le signal commence à se courber de telle sorte que le signal détecté soit inférieur à celui prévu pour la concentration mesurée. Cette perte, qui ne concerne que les données de comptage d'impulsions et non analogiques, est due au temps mort du détecteur. Pour corriger les pertes de taux de comptage, une équation simple (appliquée automatiquement dans les logiciels ICPMS) est utilisée.

$$I_{\text{corrigée}} = \frac{I_{\text{mesurée}}}{(1 - I_{\text{mesurée}} \tau)} \quad \text{Équation 15}$$

Avec

- $I_{\text{corrigée}}$  : l'intensité corrigée,
- $I_{\text{mesurée}}$  : l'intensité mesurée,
- $\tau$  : le temps mort (en s)

Les temps morts des ICPMS utilisés dans cette étude sont regroupés dans le **Tableau 20**.

**Tableau 20 : Temps morts utilisés pour les ICPMS de cette étude.**

	Agilent 7700x ICP-Q-MS	iCAP Qc ICP-Q-MS	ELEMENT XR™ HR-ICPMS
<b>Temps mort</b>	50 ns	40 ns	9 ns

### 1.3.2.2. Biais en masse

Tous les spectromètres de masse présentent une polarisation de masse qui se traduit par un rapport isotopique mesuré qui est systématiquement différent du vrai rapport isotopique d'un élément dans un échantillon. Le biais en masse est normalement plus élevé pour les petites masses et plus

faible pour les grandes masses. Pour les ICPMS, ce biais change avec les conditions de fonctionnement instrumentales et de dérive avec le temps. La dérive peut être significative par rapport à la précision des mesures du rapport. Ainsi, pour obtenir les plus hautes précision et exactitude, il est nécessaire de mesurer et de corriger le biais en masse et sa dérive pendant le fonctionnement de l'instrument [195].

Pour l'analyse du Fe, les rapports mesurés, par exemple  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ , ont été corrigés par le biais en masse en utilisant l'équation 16:

$$k = \frac{R_c}{R_m(RM)} \quad \text{Équation 16}$$

Avec

- k : le facteur de correction de masse pour le rapport  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ ,
- $R_c$  : la valeur certifiée par l'IUPAC du rapport isotopique  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ ,
- $R_m(RM)$  : la valeur mesurée pour le rapport  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$  dans le matériau de référence.

Dans notre cas, l'étalon de Fe de haute pureté ayant les abondances naturelles de Fe est utilisé comme matériau de référence ( $R_c$  est donc une valeur tabulée). La concentration de cet étalon doit être similaire à celle du Fe dans l'échantillon. Ensuite, les rapports  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$  mesurés sont normalisés en utilisant le facteur de correction de masse dans l'équation 17:

$$R_n = k \cdot R_m \quad \text{Équation 17}$$

où  $R_n$  est le rapport  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$  normalisé et  $R_m$  est le rapport  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$  mesuré.

Le **Tableau 21** regroupe les différents paramètres utilisés afin de calculer le biais en masse ( $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ ).

**Tableau 21 : Paramètres moyens afin d'évaluer le biais en masse obtenus pour les ICPMS de cette étude pour les rapports mesurés  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ .**

	Agilent 7700x ICP-Q-MS	iCAP Qc ICP-Q-MS	ELEMENT XR™ HR-ICPMS
$R_m$	1,022 ± 0,035	0,979 ± 0,042	1,078 ± 0,044
$k$	1,074 ± 0,003	1,100 ± 0,003	0,985 ± 0,006
$R_n$	1,098 ± 0,038	1,076 ± 0,047	1,062 ± 0,044

Ainsi, en prenant en compte le biais en masse et l'équation 11 de l'ID du Chapitre 1, on obtient l'équation suivante pour la détermination de la fraction massique de l'échantillon par ID :

$$W_s = W_{sp} \cdot \frac{m_{sp}}{m_s} \cdot \frac{M_s}{M_{sp}} \cdot \left( \frac{A_{sp}^b R_m k - A_{sp}^a}{A_s^a - k R_m A_s^b} \right) \quad \text{Équation 18}$$

### 1.3.2.3. Vérification de l'absence d'interférences

Afin de vérifier qu'il n'y a pas d'interférence sur les isotopes utilisés pour l'ID, des essais ont été réalisés avec l'utilisation de l'écart normalisé ( $E_N$ ). Cet outil statistique permet de comparer deux valeurs au regard de leur incertitude afin de déterminer si elles sont significativement différentes [196]. Le calcul de  $E_N$  s'effectue grâce à l'équation suivante :

$$E_N = \left| \frac{R_{éch} - R_{std}}{\sqrt{u^2_{R_{éch}} + u^2_{R_{std}} + u^2_{nat}}} \right| \quad \text{Équation 19}$$

Avec:

- $R_{éch}$  correspond au rapport isotopique mesuré de l'échantillon
- $R_{std}$  correspond au rapport isotopique issu de la mesure faite sur une solution étalon
- $u_{R_{éch}}$  et  $u_{R_{std}}$  correspondent aux incertitudes-types de  $R_{éch}$  et  $R_{std}$  respectivement
- $u_{nat}$  correspond à la variabilité naturelle sur le rapport théorique [24, 25]. L'introduction de ce dernier terme est la modification apportée à la formule originelle.

Le test est satisfaisant si  $E_N$  est inférieur à 2 (pour un intervalle de confiance de 95 %). L' $E_N$  est déterminé sur les différents échantillons avant la mise en place de l'ID.

Le **Tableau 22** montre un exemple de vérification d'absence d'interférences sur les isotopes 54, 56, 57 et 58 du Fe dans le SRM 1598a en moyenne résolution ( $R = 4500$ ).

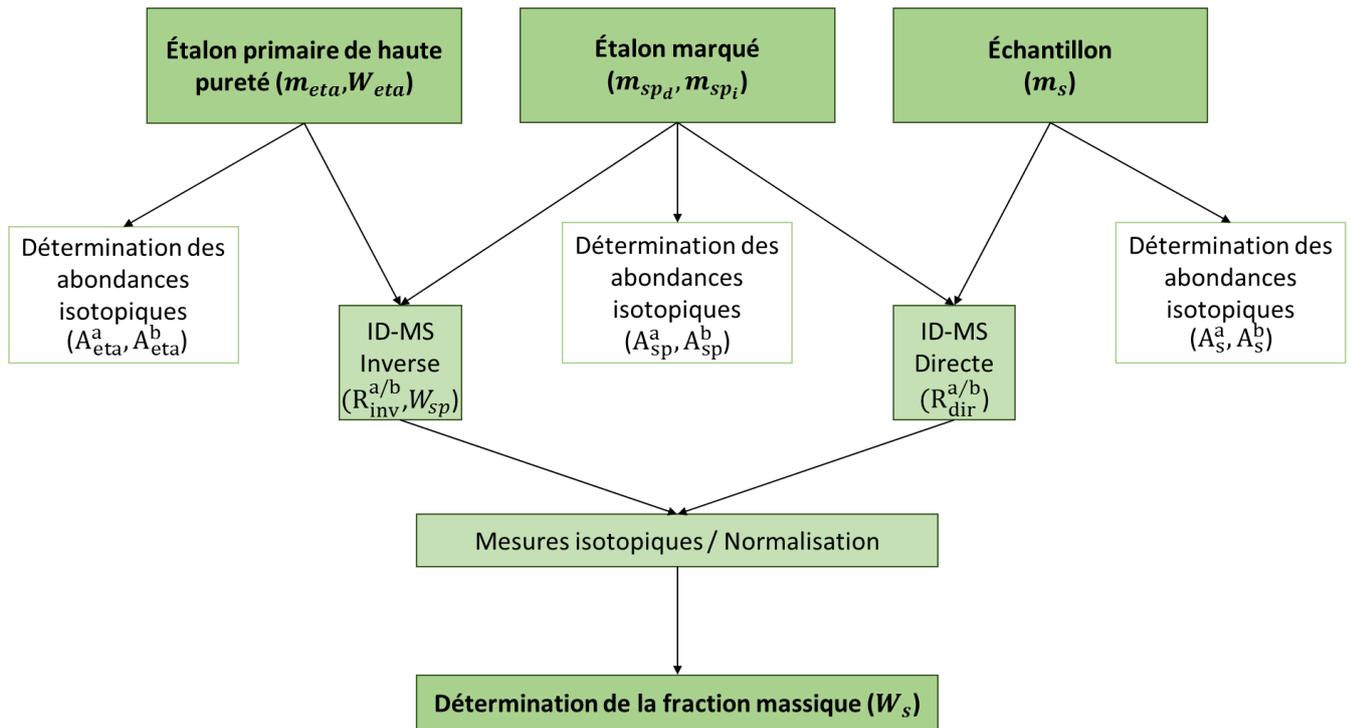
**Tableau 22 : Ecart normalisé pour la vérification d'absence d'interférences sur les isotopes 54, 56, 57 et 58 du Fe dans le matériau de référence SRM 1598a par HR-ICPMS.**

	$^{54}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$	$^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$	$^{58}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$
$R_{éch}$	$0,061 \pm 0,001$	$43,621 \pm 0,745$	$0,003 \pm 0,001$
$R_{std}$	$0,060 \pm 0,001$	$43,925 \pm 0,464$	$0,003 \pm 0,001$
$E_N$	$0,79 < 2$	$0,32 < 2$	$0,88 < 2$

Les  $E_N$  étant tous inférieurs à 2, il n'y a pas d'interférence sur les quatre isotopes stables du Fe dans l'échantillon SRM 1598a. Ceci est aussi vérifié sur tous les autres échantillons.

## 1.4. Mise en place du protocole de la double ID-ICPMS

Afin d'assurer le caractère primaire de la méthode, une approche métrologique de l'ID est par ailleurs nécessaire où les isotopes considérés seront le  $^{56}\text{Fe}$  et le  $^{57}\text{Fe}$ . Le protocole fait intervenir plusieurs étapes qui sont synthétisées dans la **Figure 28**.



**Figure 28 : Les différentes étapes nécessaires pour appliquer la double ID comme méthode primaire.**

A/ Les abondances isotopiques de l'étalon de haute pureté ( $A_{eta}^a, A_{eta}^b$ ), de l'étalon marqué ( $A_{sp}^a, A_{sp}^b$ ) et de l'échantillon ( $A_s^a, A_s^b$ ) doivent être déterminées.

B/ Cette étape correspond à l'**ID directe**. La fraction massique,  $W_s$ , de l'élément à doser (Fe) contenu dans l'échantillon est déterminée à partir de la mesure du rapport des isotopes A et B (respectivement  $^{56}\text{Fe}$  et  $^{57}\text{Fe}$ ) dans le mélange « échantillon-étalon marqué » ( $R_{dir}^{a/b}$ ). Ainsi l'équation 18 devient :

$$W_s = W_{sp} \cdot \frac{m_{sp_d}}{m_s} \cdot \frac{M_s}{M_{sp}} \cdot \left( \frac{R_{dir}^{a/b} A_{sp}^b k_{dir} - A_{sp}^a}{A_s^a - A_s^b k_{dir} R_{dir}^{a/b}} \right) \quad \text{Équation 20}$$

C/ Lors de l'application de la double ID, la fraction massique de l'étalon marqué ( $W_{sp}$ ) doit être évaluée lors de chaque utilisation si l'étalon marqué n'est pas certifié en concentration. Cette étape correspond à l'**ID inverse**.

Ainsi l'équation 20 correspondante au calcul de la fraction massique de l'échantillon est adaptée pour la détermination de la fraction massique de l'étalon marqué. Un mélange « étalon-étalon marqué » est mesuré par ICPMS où l'étalon est de haute pureté. L'équation 20 est donc adaptée en remplaçant, la fraction massique de l'étalon marqué,  $W_{sp}$ , comme valeur à déterminer et où la fraction massique de l'étalon,  $W_{eta}$ , est calculée par gravimétrie. L'équation de l'ID inverse peut s'écrire de la manière suivante :

$$W_{sp} = W_{eta} \cdot \frac{m_{eta}}{m_{spi}} \cdot \frac{M_{sp}}{M_{eta}} \cdot \left( \frac{A_{eta}^b - k_{inv} R_{inv}^{a/b} A_{eta}^a}{k_{inv} A_{sp}^a R_{inv}^{a/b} - A_{sp}^b} \right) \quad \text{Équation 21}$$

Ci-dessous sont indiquées les équations utilisées pour calculer la concentration du Fe dans le sérum. La fraction massique dans le mélange « échantillon-étalon marqué » ( $W_s$ , g.g<sup>-1</sup> Fe) est calculée en utilisant l'équation 20 de l'ID directe où  $W_{sp}$  est calculé selon l'équation 21. Enfin, en tenant compte des dilutions initiales et de la densité du sérum, on peut calculer la concentration en Fe dans le sérum ( $C_{serum}$ , g.L<sup>-1</sup> Fe) en appliquant l'équation 23:

$$W_s = W_{sp} \cdot \frac{m_{eta}}{m_{spi}} \cdot \frac{m_{spd}}{m_s} \cdot \frac{(A_{eta}^a - R_{inv}^{a/b} k_{inv} A_{eta}^b)}{(R_{inv}^{a/b} k_{inv} A_{sp}^b - A_{sp}^a)} \cdot \frac{(R_{dir}^{a/b} k_{dir} A_{sp}^b - A_{sp}^a)}{(A_s^a - R_{dir}^{a/b} k_{dir} A_s^b)} \quad \text{Équation 22}$$

$$C_{serum} = W_s \cdot F_{dilution} \cdot \rho_{serum} \quad \text{Équation 23}$$

Avec:

- $W_{sp}$  : fraction massique de l'étalon marqué dans le mélange « étalon-étalon marqué » (g.g<sup>-1</sup> Fe)
- $m_{eta}$  : masse de l'étalon dans le mélange « étalon-étalon marqué » (g)
- $m_{spi}$  : masse de l'étalon marqué dans le mélange « étalon-étalon marqué » (g)
- $A_{eta}^a$  : abondance naturelle de l'isotope A (<sup>56</sup>Fe) dans l'étalon (valeur IUPAC)
- $A_{eta}^b$  : abondance naturelle de l'isotope B (<sup>57</sup>Fe) dans l'étalon (valeur IUPAC)
- $R_{inv}^{a/b}$  : rapport isotopique <sup>56</sup>Fe/<sup>57</sup>Fe dans le mélange « étalon-étalon marqué »
- $k_{inv}$  : facteur de correction de biais en masse pour l'IDMS inverse
- $A_{sp}^a$  : abondance de l'isotope A (<sup>56</sup>Fe) dans l'étalon marqué
- $A_{sp}^b$  : abondance de l'isotope B (<sup>57</sup>Fe) dans l'étalon marqué
- $m_{spd}$  : masse de l'étalon marqué dans le mélange « échantillon-étalon marqué » (g)
- $m_s$  : masse de l'échantillon dans le mélange « échantillon-étalon marqué » (g)
- $R_{dir}^{a/b}$  : rapport isotopique <sup>56</sup>Fe/<sup>57</sup>Fe dans le mélange « échantillon-étalon marqué »
- $k_{dir}$  : facteur de correction de biais en masse pour l'IDMS directe
- $A_s^a$  : abondance de l'isotope A (<sup>56</sup>Fe) dans l'échantillon
- $A_s^b$  : abondance de l'isotope B (<sup>57</sup>Fe) dans l'échantillon
- $F_{dilution}$  : facteur de dilution du sérum
- $\rho_{serum}$  : masse volumique du sérum (g.mL<sup>-1</sup>)

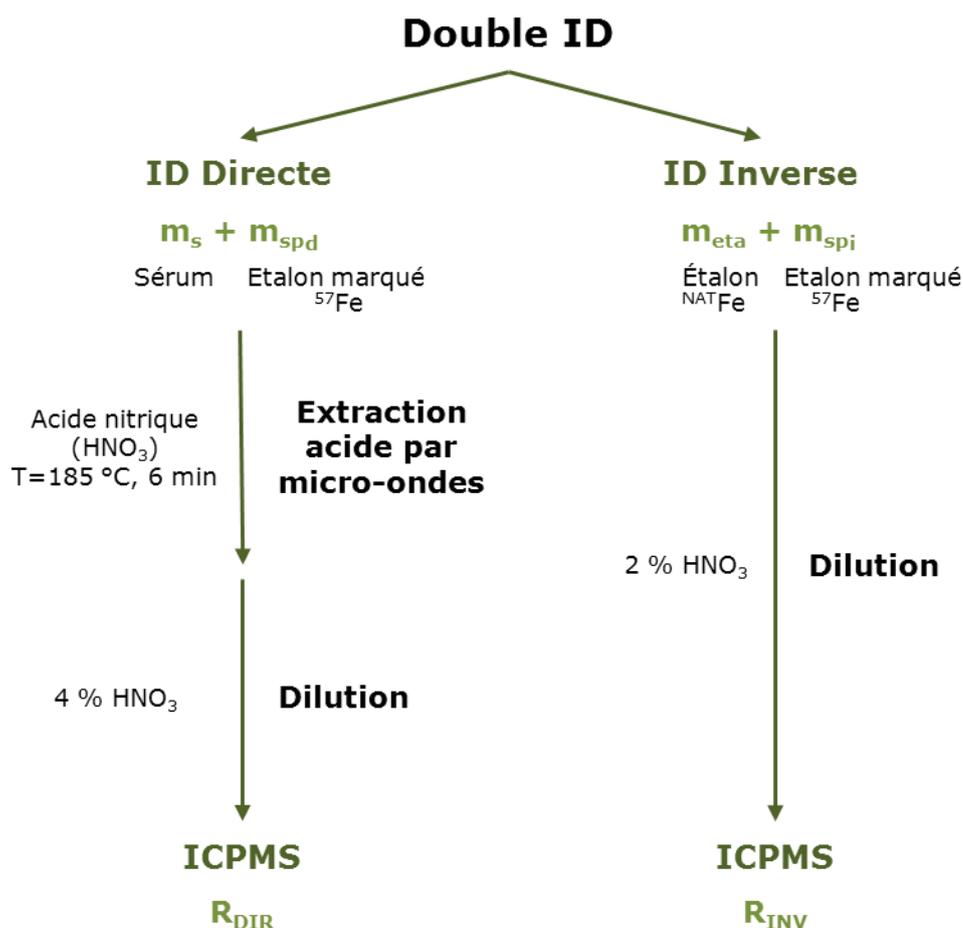
En combinant les équations 22 et 23, on obtient l'équation finale suivante qui permet de déterminer la concentration de l'échantillon (g.L<sup>-1</sup> Fe) :

$$C_s = W_{sp} \cdot \frac{m_{eta}}{m_{sp_i}} \cdot \frac{m_{sp_d}}{m_s} \cdot \frac{(A_{eta}^a - R_{inv}^{a/b} k_{inv} A_{eta}^b)}{(R_{inv}^{a/b} k_{inv} A_{sp}^b - A_{sp}^a)} \cdot \frac{(R_{dir}^{a/b} k_{dir} A_{sp}^b - A_{sp}^a)}{(A_s^a - R_{dir}^{a/b} k_{dir} A_s^b)} \cdot F_{dilution} \cdot \rho_{serum} \quad \text{Équation 24}$$

La procédure analytique pour la mise en place de la **double ID-ICPMS** peut donc être décrite. Tout d'abord, afin d'évaluer la gamme de concentrations dans laquelle se situent les échantillons et d'adapter, en conséquence, la double ID aux échantillons, une estimation préliminaire de la concentration des échantillons en Fe est effectuée à l'aide d'un étalonnage externe puis en réalisant des ajouts dosés sur l'échantillon afin de vérifier si les résultats sont comparables lorsque les matrices des échantillons sont plus complexes.

Le principe de la double ID-ICPMS est représenté par la **Figure 29**. Toutes les étapes de préparation sont réalisées par gravimétrie jusqu'à l'ajout de l'étalon marqué ( $^{57}\text{Fe}$ ). Dans chaque cas, l'étalon marqué doit être ajouté à l'échantillon le plus tôt possible lors du traitement.

Pour l'ID directe, une quantité d'étalon marqué ( $^{57}\text{Fe}$ ) est ajoutée à l'échantillon afin d'obtenir un rapport isotopique égal à 1 ( $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ ) puis l'ensemble (0,15 g à 0,30 g) est digéré sous champ de micro-ondes par 2 mL d' $\text{HNO}_3$ . La température du système est programmée pour augmenter à 185 °C en 4 min. Cette température est maintenue durant 2 min puis le système refroidit en environ 4 min. La pression maximum est de 27 bars et la puissance maximum est de 300 W. Les résidus de minéralisation sont ensuite repris dans 50 mL d'eau Milli-Q™ afin d'obtenir une concentration finale en Fe comprise entre 5 et 15  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  Fe (0,1 à 0,3  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  Fe). Au moins quatre mélanges «échantillon-étalon marqué» ont été préparés par gravimétrie (balance d = 0,1 mg). Les échantillons obtenus sont analysés par ICPMS.



**Figure 29 : Principe de la double ID appliquée pour l'analyse du Fe dans du sérum par ID-ICPMS.**

Afin de mettre en place la double ID-ICPMS pour assurer le caractère primaire de la méthode, il est nécessaire de réaliser simultanément une caractérisation de l'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  par ID inverse. La préparation des mélanges « échantillon-étalon marqué » pour l'ID directe et « étalon-étalon marqué » pour l'ID inverse a été réalisée de telle sorte que les rapports isotopiques soient égaux entre eux (à 5 % près). Pour l'ID inverse, une quantité identique d'étalon marqué ainsi que d'un étalon de haute pureté (BNM-001) en Fe est mise en solution acidifiée (2 %  $\text{HNO}_3$ ) afin d'obtenir un rapport isotopique égal à 1 ( $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ ). L'étape de digestion acide par micro-ondes n'est pas nécessaire dans ce cas-là. La concentration finale des solutions est comprise entre 5 et 15  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  Fe (0,1 à 0,3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Fe). Au moins quatre mélanges « étalon-étalon marqué » ont été préparés par gravimétrie (balance d = 0,1 mg) où deux solutions mères indépendantes de 1 000  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Fe de haute pureté sont utilisées pour préparer les mélanges. Par conséquent les mélanges « étalon-étalon marqué » sont indépendants deux à deux. Les échantillons obtenus sont analysés par ICPMS en même temps que ceux de l'ID directe.

Enfin, le biais en masse est calculé à partir de l'analyse d'une solution d'étalon de haute pureté en Fe à 2 % d' $\text{HNO}_3$ . Cette solution est préparée afin d'obtenir une concentration finale du même

ordre de grandeur que les différents mélanges analysés c'est-à-dire entre 5 et 15  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  Fe (0,1 à 0,3  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  Fe).

Parallèlement, une évaluation préliminaire de la teneur en Fe des flacons en Pyrex® utilisés pour la minéralisation est réalisée par ICPMS. Pour cela, avant chaque analyse, une série de dix blancs, contenant 2 % d' $\text{HNO}_3$  dans 50 mL d'eau, est préparée selon le même protocole que pour les échantillons. Les tubes de minéralisation ayant une concentration en Fe supérieure 10  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  Fe sont écartés.

La quantification du Fe a été réalisée sur des jours différents pour chaque échantillon et au moins 3 réplicats ( $n=3$ ) ont été analysés. Une séquence typique de double ID-ICPMS est donnée ci-dessous:

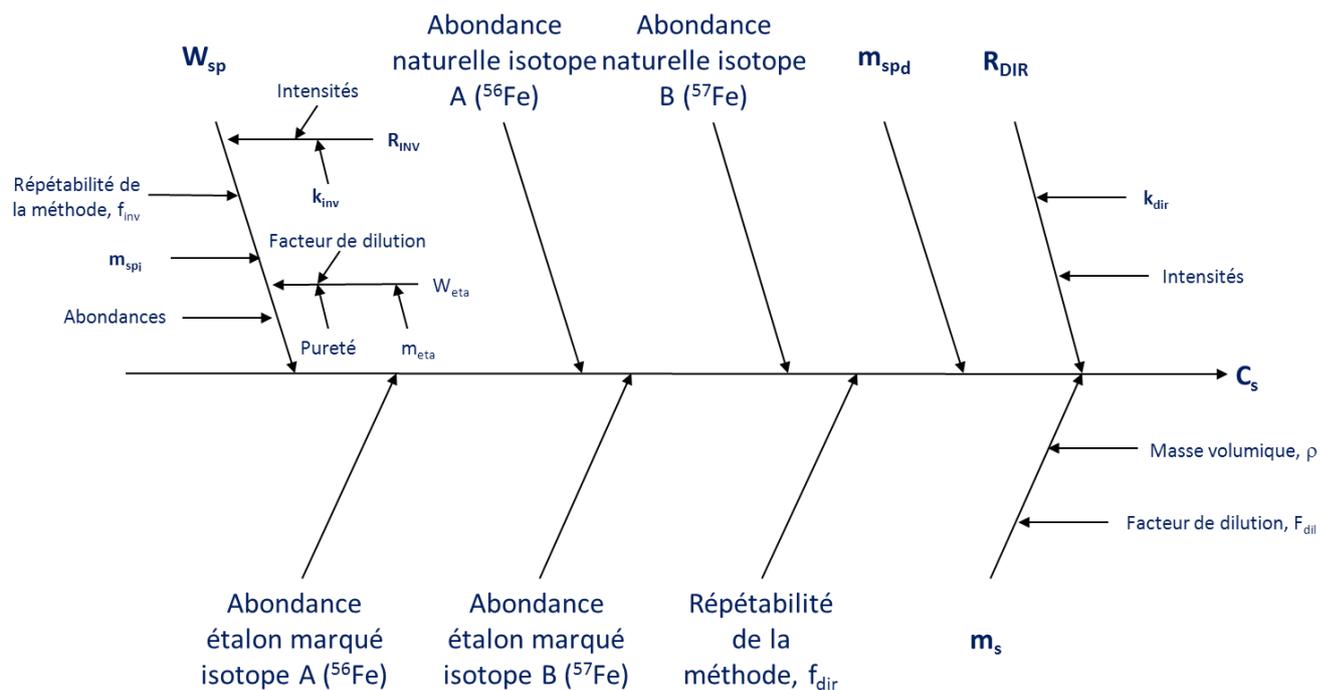
- Biais en masse : étalon de Fe ( $\approx 5\text{-}15 \mu\text{g.kg}^{-1}$  Fe)
- Mélange direct ID-ICPMS (« échantillon-étalon marqué »)
- Mélange inverse ID-ICPMS (« étalon-étalon marqué »)
- Biais en masse : étalon de Fe ( $\approx 5\text{-}15 \mu\text{g.kg}^{-1}$  Fe)
- Mélange direct ID-ICPMS (« échantillon-étalon marqué »)
- etc.

### 1.5. Évaluation des incertitudes

La comparabilité des résultats de mesure ne peut pas être assurée si une incertitude ne leur est pas associée. La démarche élaborée pour calculer les incertitudes dans le cas de l'analyse par double ID-ICPMS repose sur la méthode analytique préconisée par le GUM [15]. Il est possible de découper le calcul de l'incertitude en quatre étapes :

#### A/ Définition du mesurande avec l'écriture du modèle mathématique le représentant :

Dans le cadre de l'ID, le mesurande est la concentration de l'échantillon à déterminer ( $C_s$ ), son modèle mathématique est l'équation générale de la double ID (**équation 24**) à laquelle se rajoutent les différentes corrections des données (biais en masse, masse volumique, ...). Les différents paramètres pris en compte dans le calcul de  $C_s$  et de  $u(C_s)$  sont représentés dans le diagramme de causes et effets de la **Figure 30**.



**Figure 30 : Diagramme de causes et effets permettant de visualiser les facteurs pris en compte dans le calcul de l'incertitude de  $C_s$ .**

B/ Evaluation de l'incertitude-type de chaque grandeur d'entrée :

A chaque paramètre de l'équation de  $C_s$  (**équation 24**) sont associés son type de variable (type A pour des valeurs expérimentales ou type B pour des valeurs tabulées ou certifiées), son incertitude-type et une loi de distribution (qui représente la répartition des valeurs selon leur probabilité de présence dans l'intervalle donné). Le **Tableau 23** récapitule l'estimation des incertitudes-types pour chaque catégorie de facteurs.

**Tableau 23 : Estimation des incertitudes-types pour chaque catégorie de paramètre pris en compte dans le calcul de l'incertitude finale sur la concentration de l'échantillon déterminée par ID.**

Source d'incertitude	Type d'évaluation	Loi	Incertitude-type
Pureté de l'étalon ( $P = X \pm a_1$ )	B	$\square$ (uniforme)	$\frac{a}{\sqrt{3}}$
Masse volumique ( $\rho$ )	B	$\square$ (uniforme)	$\frac{a}{\sqrt{3}}$
Pesées pour préparation de la solution étalon primaire, dilutions successives ( $m_{\text{metal}}, m_1, m_2, \dots$ )	/	$k=1$	L'incertitude-type est estimée en fonction de l'écart maximum toléré, de l'incertitude liée à la masse étalon utilisée, de celle liée à l'excentration et de celle liée à la variation de la masse étalon
Pesées pour préparation des mélanges ID ( $m_{\text{eta}}, m_{\text{spi}}, m_{\text{spd}}, m_s$ )	/	$k=1$	
Abondances isotopiques issues des tables IUPAC ou des certificats	B	$\square$	$\frac{a}{\sqrt{3}}$
Mesures de rapports isotopiques ( $s$ : écart-type de répétabilité de $p$ mesures)	A	/	$s$
Répétabilité de la méthode ( $s$ : écart-type des $n$ déterminations de $W_{\text{sp}}$ ou $C_s$ )	A	/	$\frac{s}{\sqrt{n}}$

C/ Détermination de l'incertitude-type composée du résultat grâce à la loi de propagation des incertitudes :

Le logiciel Wincert (Version V.3.11.2002.0115, Implex, France, logiciel développé au LNE) permet de réaliser ce calcul de propagation.

D/ Expression du résultat accompagné de son incertitude élargie :

Cette valeur représente un intervalle dont il est attendu qu'il comprenne une fraction élevée de la distribution des valeurs qui pourraient être raisonnablement attribuées au mesurande.

L'incertitude élargie est déterminée selon la formule :

$$U = k \cdot u(C_{\text{éch}}) \quad \text{Équation 25}$$

Avec :

- $U$  est l'incertitude élargie de  $C_{\text{éch}}$
- $u_{C_{\text{éch}}}$  est l'incertitude-type composée de  $C_{\text{éch}}$
- $k$  est le facteur d'élargissement (généralement,  $k = 2$ )

Ainsi la concentration peut être accompagnée de son incertitude élargie,  $U$ .

## 2. Résultats

L'objectif est de développer et de valider une **méthode primaire** pour le **dosage du Fe** dans du **sérum**. Cette méthode doit permettre un dosage fiable pour des concentrations physiologiques comprises entre 10 à 30  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  Fe [27]. Cette méthode de référence permettra d'assigner des valeurs de référence traçables aux matériaux d'étalonnage et aux échantillons de contrôle de qualité, et aussi d'évaluer la justesse des méthodes de routine.

Un protocole métrologique de l'ID associée à l'ICPMS (double ID-ICPMS) a été mis en place pour atteindre cet objectif en caractérisant tout d'abord l'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  utilisé puis en validant la méthode par l'analyse d'un CRM (NIST 1598a) et par la participation à une comparaison clé dans le cadre du CCQM.

### 2.1. Caractérisation de l'étalon marqué en $^{57}\text{Fe}$

Pour s'assurer de la traçabilité des résultats de mesure, des étalons certifiés en isotopie et en teneur ont été utilisés. L'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$  d'Eurisotop (laboratoire non NMI) n'ayant pas été certifié selon un protocole métrologique reconnu, a été caractérisé. L'isotopie de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$  est étudiée pour les quatre isotopes stables du Fe : 54, 56, 57 et 58. Pour cela, des solutions d'étalon de Fe naturel de haute pureté (BNM-001) et d'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  sont préparées, afin d'obtenir une concentration finale d'environ 10  $\mu\text{g.g}^{-1}$  Fe. Les abondances isotopiques sont déterminées par calculs après mesures par ICPMS (iCAP Qc ICP-Q-MS et ELEMENT XR™ HR-ICPMS) des rapports isotopiques  $^{54}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ ,  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ ,  $^{58}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ . Les conditions expérimentales des deux ICPMS sont présentées dans les **Tableau 18** et **Tableau 19**. Le biais en masse du spectromètre de masse a été déterminé par rapport aux mesures isotopiques de ces mêmes rapports dans l'étalon de haute pureté en Fe à isotopie naturelle. Sur une période de six mois, 8 déterminations ( $p=8$ ) sur différents jours, de 3 réplicats ( $n=3$ ) chacune dans la même journée ont été réalisées pour caractériser la composition isotopique de l'étalon marqué enrichi en  $^{57}\text{Fe}$ . Un test statistique (Cochran) est réalisé afin d'éliminer les éventuelles valeurs aberrantes. Le **Tableau 24** résume les abondances isotopiques obtenues en comparaison avec celles indiquées par le fournisseur. Les incertitudes élargies mentionnées sont celles correspondant à deux fois l'incertitude-type composée ( $k = 2$ ).

**Tableau 24 : Abondances isotopiques de l'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  d'Eurisotop déterminées par ICPMS sur une période de six mois.**

	Abondance $^{54}\text{Fe}$ (% atomique)	Abondance $^{56}\text{Fe}$ (% atomique)	Abondance $^{57}\text{Fe}$ (% atomique)	Abondance $^{58}\text{Fe}$ (% atomique)
<b>Abondances évaluées</b>	0,01 ± 0,03	1,39 ± 0,36	96,63 ± 0,40	1,97 ± 0,24
<b>Valeurs fournies par Eurisotop</b>	0,03	1,65	96,28	2,04

Les valeurs obtenues sont compatibles avec celles données par le producteur du métal enrichi. Ceci indique que l'isotope de ce matériau est stable. **L'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  présente donc une abondance isotopique majoritaire de  $(96,63 \pm 0,40)$  % pour l'isotope 57.**

La solution d'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  provenant de l'IRMM à  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$   $^{57}\text{Fe}$  est certifiée en abondances isotopiques par ionisation thermique associée à la spectrométrie de masse. Le **Tableau 25** présente les abondances isotopiques certifiées.

**Tableau 25 : Les abondances isotopiques de l'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  de l'IRMM.**

	Abondance $^{54}\text{Fe}$ (% atomique)	Abondance $^{56}\text{Fe}$ (% atomique)	Abondance $^{57}\text{Fe}$ (% atomique)	Abondance $^{58}\text{Fe}$ (% atomique)
<b>Abondances certifiées</b>	$0,03 \pm 0,66$	$0,80 \pm 0,10$	$96,06 \pm 0,20$	$3,11 \pm 0,16$

## 2.2. Validation de la méthode

La validation de la méthode (justesse et incertitude) a été réalisée par l'analyse de l'échantillon SRM 1598a et en participant à une comparaison interlaboratoire.

Une série de quatre répliqués ( $n=4$ ) du matériau SRM 1598a est préparée et analysée sur les trois instruments de mesure. Les approches pour corriger les interférences sont différentes pour chaque instrument. En effet, l'ELEMENT XR utilise la moyenne résolution pour s'affranchir des interférences tandis que les ICP-Q-MS utilisent la CCT en mode collision avec un débit d'He pour l'iCAP Qc et en mode réactionnel avec un débit d' $\text{H}_2$  pour l'Agilent 7700x.

La teneur en Fe certifiée par le NIST est de  $(30,1 \pm 1,1) \mu\text{mol.L}^{-1}$  ( $k = 2$ ) avec une masse volumique d'échantillon de  $(1,0274 \pm 0,0006) \text{ g.mL}^{-1}$ . Les résultats reportés dans le **Tableau 26** sont les valeurs moyennes des quatre répliqués pour chaque instrument de mesure avec leurs incertitudes élargies de répétabilité ( $k = 2$ ). Pour l'instrument HR-ICPMS, quatre répliqués ( $n=4$ ) sur deux jours différents ( $p=2$ ) ont été effectués. Les valeurs mesurées peuvent être comparées à la valeur certifiée en utilisant  $E_N$  [196].

**Tableau 26 : Concentrations en Fe de l'échantillon de sérum NIST SRM 1598a obtenues par double ID-ICPMS avec différents instruments.**

	( $\text{H}_2$ ) ICP-Q-MS ( $n=4$ )	HR-ICPMS ( $n \times p=8$ )	(He) ICP-Q-MS ( $n=4$ )
<b>Concentration</b> ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ Fe, $k=2$ )	$29,6 \pm 0,7$	$29,7 \pm 1,1$	$29,2 \pm 0,7$
<b>Erreur relative (%)</b>	- 2	- 1	- 3
<b><math>E_N</math></b>	0,8	0,5	1,3

L' $E_N$  est calculé pour chaque concentration déterminée avec les trois ICPMS. L'équation 26 permet de calculer  $E_N$ .

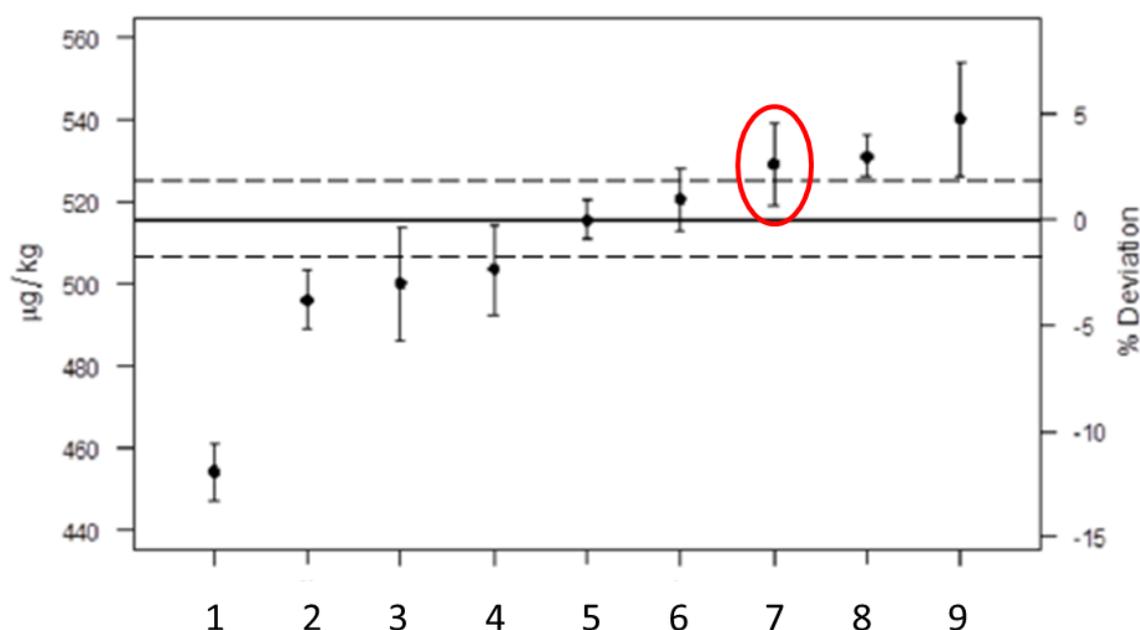
$$E_N = \left| \frac{C_{\text{éch}} - C_{\text{cert}}}{\sqrt{u^2 C_{\text{éch}} + u^2 C_{\text{cert}}}} \right| \quad \text{Équation 26}$$

Avec:

- $C_{\text{éch}}$  correspond à la concentration mesurée de l'échantillon
- $C_{\text{cert}}$  correspond à la valeur certifiée de l'échantillon
- $u_{C_{\text{éch}}}$  est l'incertitude-type composée de  $C_{\text{éch}}$
- $u_{C_{\text{cert}}}$  est l'incertitude-type de  $C_{\text{cert}}$

Les  $E_N$  obtenus avec les trois instruments sont inférieurs à 2, ce qui signifie que les valeurs mesurées ne sont pas statistiquement significativement différentes de la valeur de référence. **La méthode développée est donc validée par l'analyse de ce matériau de référence certifié.** De plus, il n'y a pas de différence significative entre les valeurs des trois instruments donc il n'y a pas d'impact du mode de correction des interférents.

Une deuxième validation a été effectuée lors de la participation du LNE à la comparaison clé organisée dans le cadre du CCQM (**comparaison CCQM-K107**) pilotée en 2013 par le laboratoire de métrologie au Royaume-Uni (LGC) sur l'échantillon « ERM-DA 120a » [197]. La méthode de quantification retenue par tous les laboratoires, à l'exception du laboratoire numéro 1 (aucune information n'est disponible sur la méthode analytique utilisée), est l'ID-ICPMS : six ont utilisé l'ICPMS à secteur magnétique et deux, l'ICPMS quadripôle avec une CCT. L'étape de préparation d'échantillon choisie par la majorité des participants est une digestion acide par champ de micro-ondes. Seulement deux laboratoires (numéros 2 et 3) ont réalisé une simple dilution du sérum. Les laboratoires ont tous utilisés un étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  pour l'application de l'ID-ICPMS. La **Figure 31** montre les résultats obtenus par tous les laboratoires participants. Le laboratoire 1 obtient le résultat le plus éloigné de la valeur médiane. Ceci peut s'expliquer par la méthode utilisée différente de celles des autres laboratoires qui ont choisi l'ID-ICPMS.



**Figure 31 : Résultats de l'analyse du Fe total ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) dans l'échantillon de sérum ERM-DA 120a. Les barres d'erreurs représentent les incertitudes-types. La ligne solide correspond à la valeur KCRV de  $515.63 \mu\text{g.kg}^{-1}$  Fe tandis que les lignes en pointillées représentent son incertitude-type associée pour un  $k=1$ . La valeur entourée en rouge correspond à la valeur déterminée par le LNE.**

Les résultats obtenus sur l'échantillon ERM-DA 120a par le LNE sont représentés dans le **Tableau 27**. La méthode utilisée est la double ID-ICPMS avec l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$  et minéralisation des échantillons.

**Tableau 27 : Résultats de la comparaison CCQM-K107 (échantillon ERM®-DA-120a).**

	Valeur de référence mesurée	Valeur KCRV*	$E_N$
<b>Concentration (<math>\mu\text{g.kg}^{-1}</math> Fe, <math>k=2</math>)</b>	$529 \pm 20$	$516 \pm 22$	$0,87 < 2$

\*Valeur médiane obtenue lors de la comparaison

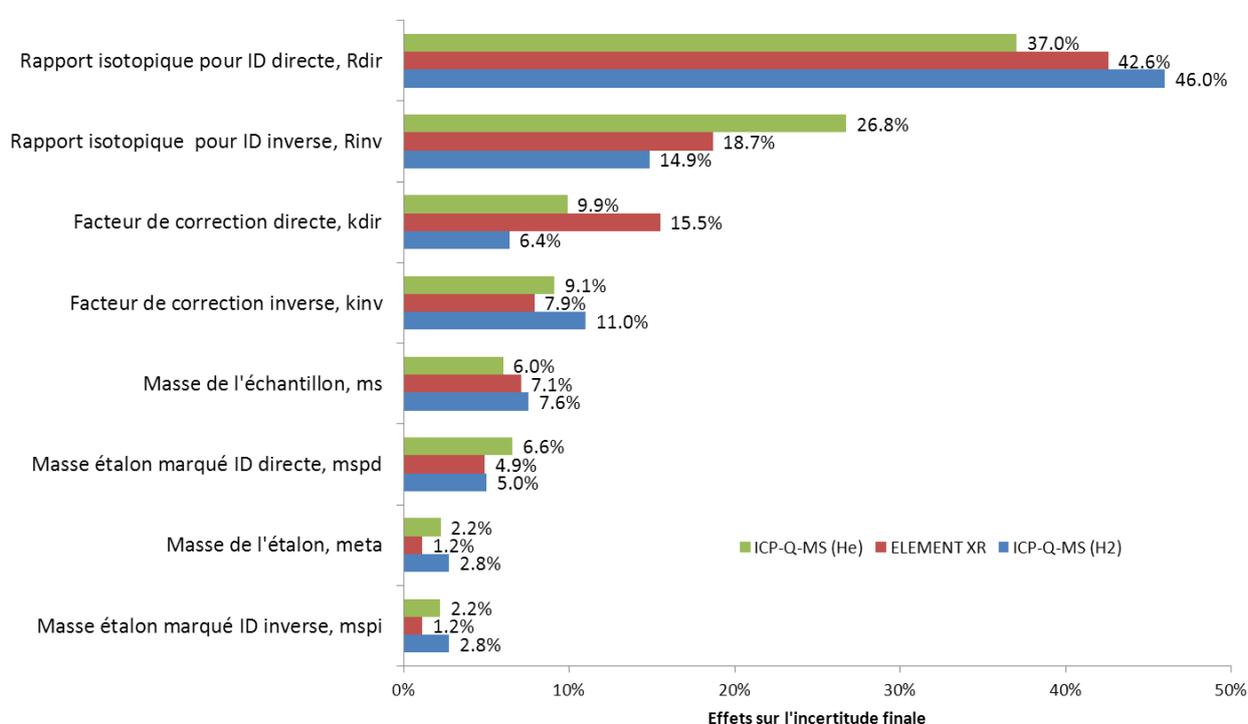
L'échantillon ayant une masse volumique de  $(1,0226 \pm 0,0203) \text{ g.mL}^{-1}$ , la concentration est donc de  $9,9 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$  Fe avec un facteur d'élargissement de 2. La comparaison des moyennes entre les résultats du LNE et la valeur de référence KCRV conduit à un  $E_N$  inférieur à 2, ce qui montre la justesse de la méthode développée et l'absence de biais. On peut noter que la concentration en Fe du sérum ERM-DA 120a est environ trois fois moins élevée que celle du sérum SRM 1598a. L'incertitude relative obtenue est de l'ordre de 4 %, ce qui est inférieur à l'incertitude cible de la comparaison (5 %).

**La méthode développée a été ainsi validée pour un domaine de concentrations en Fe comprises entre  $9 \mu\text{mol.L}^{-1}$  et  $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$  avec une incertitude élargie ( $k = 2$ ) inférieure à 5 % sur l'ensemble du domaine.**

### 2.3. Évaluation de l'incertitude de mesure

Une évaluation des principales sources d'incertitude est effectuée. La **Figure 32** montre un exemple de la répartition des composantes d'incertitude pour une mesure individuelle lors de l'analyse du SRM 1598a avec les trois ICPMS.

Les principales sources d'incertitude sont les rapports isotopiques inverses ( $R_{inv}$ ) et directs ( $R_{dir}$ ). La tendance reste sensiblement la même suivant le type d'ICPMS utilisé. L'effet sur l'incertitude finale des rapports isotopiques directs a tendance à être plus élevé que celui des rapports isotopiques inverses. En effet, le type d'échantillon est différent puisque pour l'ID directe, l'échantillon est le sérum donc une matrice complexe, tandis que pour l'ID inverse, l'échantillon est une solution d'un étalon de haute pureté.



**Figure 32 : Répartition des composantes d'incertitude sur la détermination de la concentration en Fe par ID-ICPMS en prenant en compte les trois instruments différents.**

D'autres facteurs ont un effet mineur sur l'incertitude finale notamment les facteurs de correction de biais en masse ( $k_{dir}$  et  $k_{inv}$ ) ainsi que les différentes prises d'essai ( $m_s$ ,  $m_{spd}$ ,  $m_{spi}$ ,  $m_{eta}$ ). Tous ces facteurs correspondent au calcul de l'incertitude pour une mesure.

Cependant, lorsque la valeur finale est calculée sur la base de plusieurs réplicats (ici  $n=4$ ), la fidélité doit être prise en compte. La **fidélité** est l'écart entre les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés [1]. Ce facteur se calcule en divisant l'écart type par la racine carrée du nombre de réplicats. Plus la dispersion des résultats est élevée, plus la fidélité sera importante. Ainsi la fidélité pour l'ID directe ( $f_{dir}$ ) et la fidélité pour l'ID inverse ( $f_{inv}$ ) sont prises en

compte dans le calcul de la concentration finale. L'équation 27 est donc une adaptation de l'équation 24.

$$C_s = W_{sp} \cdot \frac{m_{eta}}{m_{spi}} \cdot \frac{m_{spd}}{m_s} \cdot \frac{(A_{eta}^a - R_{inv}^{a/b} k_{inv} A_{eta}^b)}{(R_{inv}^{a/b} k_{inv} A_{sp}^b - A_{sp}^a)} \cdot \frac{(R_{dir}^{a/b} k_{dir} A_{sp}^b - A_{sp}^a)}{(A_s^a - R_{dir}^{a/b} k_{dir} A_s^b)} \cdot F_{dilution} \cdot \rho_{serum} + f_{inv} + f_{dir}$$

Équation 27

La Figure 33 montre un exemple de la répartition des composantes d'incertitude pour plusieurs mesures individuelles lors de l'analyse du SRM 1598a avec les trois ICPMS.

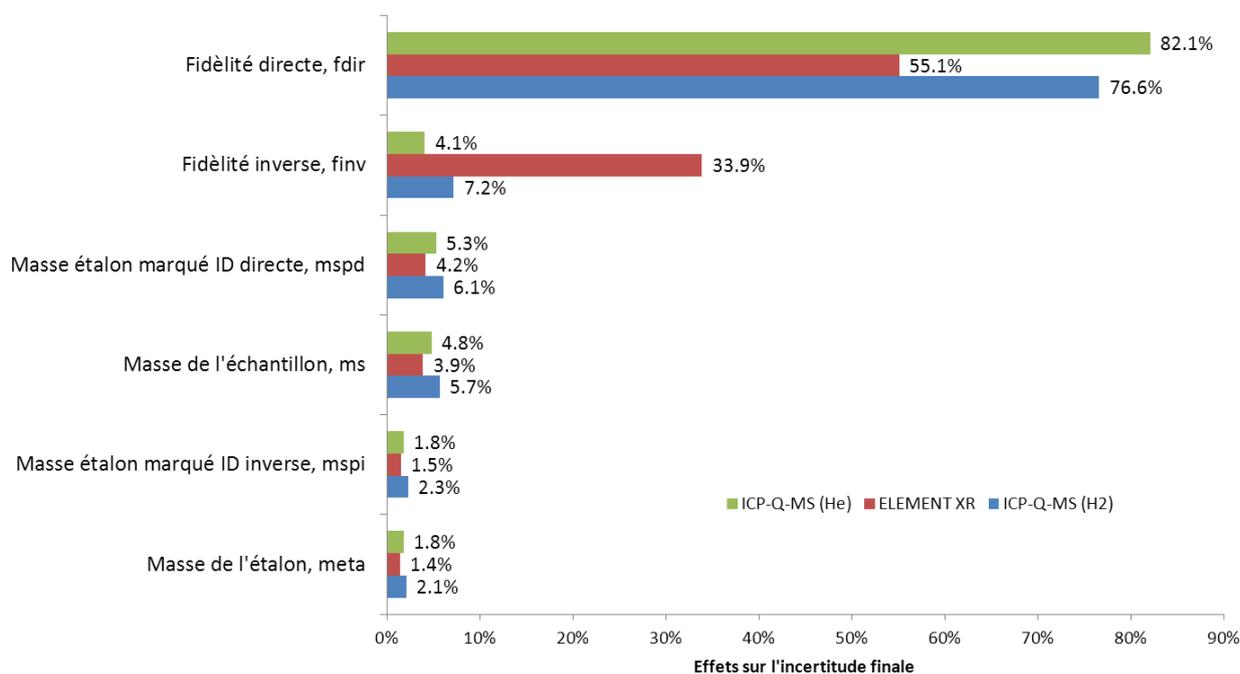


Figure 33 : Répartition des composantes d'incertitude sur plusieurs déterminations de la concentration en Fe par ID-ICPMS en prenant en compte les trois instruments différents.

Dans ce cas, les facteurs de fidélité directe et indirecte sont largement prépondérants par rapport aux autres données sur l'incertitude finale.

### 3. Application de la méthode à des échantillons inconnus de sérum et à d'autres matrices

Une fois la validité de la méthode démontrée dans l'intervalle de concentrations et aux incertitudes cibles, elle a été appliquée à la caractérisation d'échantillons inconnus afin d'assurer la mise en œuvre de programmes d'assurance qualité ou de contrôle qualité pour les laboratoires d'analyse biomédicale. La méthode est ici appliquée à deux échantillons de sérum dont la teneur en Fe est inconnue : le BCR<sup>®</sup>-637, un matériau de référence certifié mais pas pour le Fe, et à un échantillon fourni par l'ANSM lors d'un contrôle national de qualité (CNQ) effectué en 2012 (échantillon B17). De plus, cette méthode a été appliquée sur un matériau de contrôle de sang total contenant une valeur indicative en Fe, Seronorm<sup>TM</sup> – *Trace Elements Whole Blood*, afin d'élargir le domaine d'application de la méthode.

#### 3.1. Échantillon BCR<sup>®</sup>-637

L'échantillon BCR<sup>®</sup>-637 a été analysé par l'ELEMENT XR<sup>TM</sup> HR-ICPMS (n=4). Afin de contrôler la justesse de l'analyse, l'échantillon SRM 1598a a été utilisé comme point de contrôle. Cet échantillon est inséré dans la séquence d'analyse après chaque échantillon du BCR. Le **Tableau 28** présente les résultats obtenus. Il faut noter qu'il n'y a pas eu de biais de mesure lors de l'analyse, au regard du résultat obtenu pour le SRM. En effet, l' $E_N$  est largement inférieur à 2, ce qui indique la justesse de la mesure. La fraction massique obtenue est de  $1097 \pm 42 \mu\text{g.kg}^{-1}$  Fe soit une concentration égale à  $20,1 \pm 0,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$  Fe avec une masse volumique de  $1,0237 \pm 0,0006 \text{g.mL}^{-1}$ . Cette valeur est comprise dans la gamme des valeurs physiologiques. De plus, l'incertitude finale est acceptable puisqu'elle est de l'ordre de 4%.

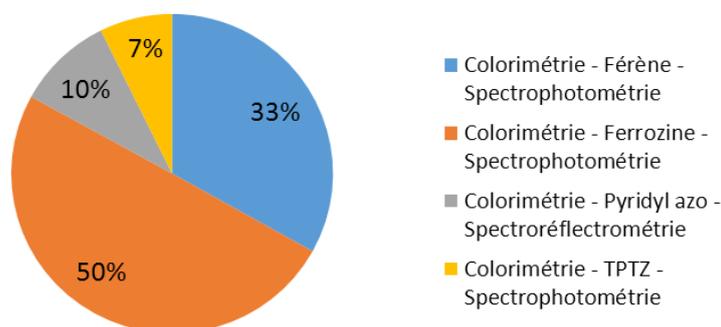
**Tableau 28 : Concentration en Fe du BCR<sup>®</sup>-637 par ID-ICPMS en utilisant le SRM 1598a comme point de contrôle.**

	BCR <sup>®</sup> -637 (n=4)	Point de contrôle : SRM 1598a ( $30,1 \pm 1,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Fe)
Concentration ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ Fe, $k=2$ )	$20,1 \pm 0,8$	$29,9 \pm 1,3$
$E_N$	-	$0,2 < 2$

#### 3.2. Échantillon B17

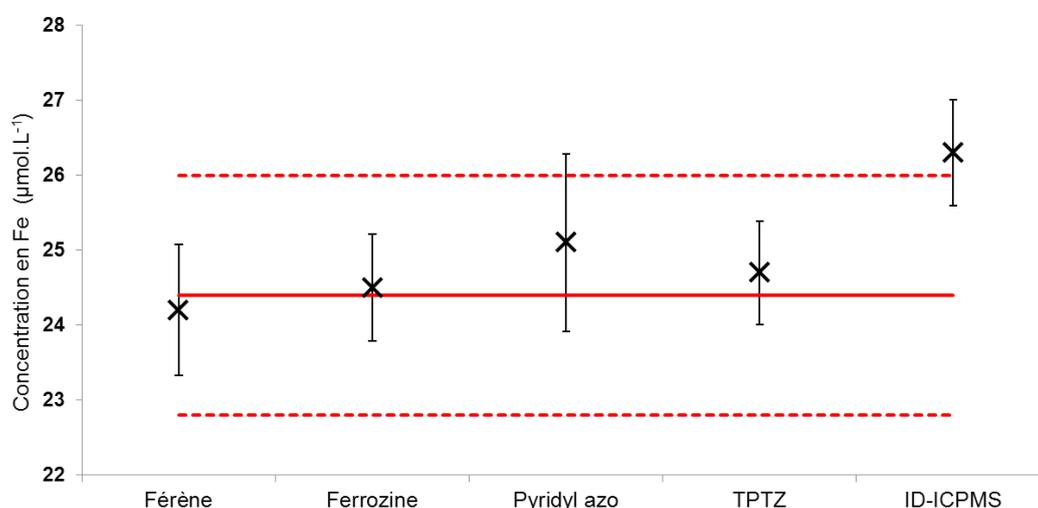
Pour le dosage du Fe dans cet échantillon, 1472 laboratoires ont participé au CNQ organisé par l'ANSM en 2012 [193]. Tous les laboratoires participants ont utilisé une méthode colorimétrique. Environ 90 % d'entre eux ont associé la méthode colorimétrique à une détection

spectrophotométrique. Le chromogène le plus représenté était le ferrozine, utilisé par la moitié des laboratoires (**Figure 34**).



**Figure 34 : Répartition des méthodes de routine utilisées lors du CNQ ANSM 2012 pour la mesure du Fe.**

La valeur consensuelle, moyenne de l'ensemble des résultats des laboratoires après élimination des valeurs aberrantes est de  $24,4 \pm 0,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$  Fe. La valeur déterminée par la méthode développée (ID-ICPMS) est de  $26,3 \pm 1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$  Fe ( $k = 2$ ), la masse volumique est de  $(1,0270 \pm 0,0001 \text{ g.mL}^{-1})$ . Le résultat obtenu est une moyenne des valeurs déterminées à l'aide de l'instrument ELEMENT XR ( $n=4$ ) ainsi que de l'instrument iCAP Qc ( $n=4$ ). Cette valeur est comparée aux concentrations déterminées par les autres laboratoires (**Figure 35**).



**Figure 35 : Résultats du CNQ de 2012 (sur l'échantillon B17). Les valeurs sont représentées avec les écart-types associés. Les limites acceptables de la valeur consensuelle (ligne pleine rouge) sont délimitées en pointillés.**

La valeur obtenue par la méthode primaire développée est comprise entre les limites acceptables définies par l'ANSM. Cependant cette valeur déterminée par ID-ICPMS est plus élevée (entre 5 % et 8 %) que les valeurs déterminées par les méthodes utilisées par les différents laboratoires. En effet, les méthodes de dosage utilisées sont différentes étant donné que les laboratoires ont effectué des dosages colorimétriques. La colorimétrie présente comme principal inconvénient de

nécessiter une étape de pré-traitement des échantillons pour les analyser par spectrophotométrie (Chapitre 1 paragraphe 3.1.1). Durant cette étape il y a le risque d'une dissociation incomplète du Fe lié aux protéines, d'une co-précipitation du Fe avec des protéines ainsi que de la réduction incomplète du Fe(III) en Fe(II) qui pourrait expliquer ce biais. Or, dans la méthode développée, le Fe, quelle que soit sa forme chimique, est dissocié des protéines par la digestion acide assistée par champs micro-ondes. Le biais observé peut non seulement provenir des performances des méthodes, mais d'un effet de matrice susceptible de varier d'une méthode à une autre, sachant que ce dernier est minimisé par l'utilisation de l'ID associée à l'ICPMS.

### 3.3. Seronorm™

Ce matériau de sang total est certifié pour 20 éléments comme l'aluminium, le plomb ou le mercure. Une valeur indicative en Fe est évaluée par ICPMS et correspond à  $5927 \pm 590 \mu\text{mol.L}^{-1}$  Fe avec une masse volumique de  $1,0307 \pm 0,0001 \text{ g.mL}^{-1}$ . Après reconstitution de l'échantillon (paragraphe 1.2.1.3), la méthode de la double ID-ICPMS développée est appliquée pour cet échantillon. Une dilution supplémentaire est effectuée à la fin du protocole afin d'obtenir une concentration finale des mélanges comprise entre 5 et  $15 \mu\text{g.kg}^{-1}$  Fe. Le **Tableau 29** présente les résultats obtenus pour une détermination sur un jour avec quatre réplicats indépendants.

**Tableau 29 : Résultat de l'analyse du Seronorm™ par double ID-ICPMS.**

	Valeur de référence	Valeur corrigée après reconstitution	Valeur mesurée (n=4)
<b>Concentration</b> ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ Fe, $k=2$ )	$5927 \pm 590$	$5462 \pm 590$	$5354 \pm 36$
$E_N$	-	-	$0,5 < 2$

Ces analyses montrent une bonne concordance entre la valeur corrigée et la valeur mesurée. En effet, l' $E_N$  est inférieur à 2, ce qui indique la justesse des résultats. L'utilisation de ce matériau pour l'analyse du Fe par ID-ICPMS montre que la méthode peut être appliquée pour d'autres types de matrice comme le sang.

## 4. Conclusion

Le développement d'une méthode de référence primaire basée sur la mise en œuvre de la double ID associée à l'ICPMS pour la détermination du Fe total dans du sérum s'est montré concluant. En effet, le protocole analytique a été validé par l'analyse d'un matériau de référence certifié (SRM 1598a) ainsi que par la participation à la comparaison clé CCQM-K107. La traçabilité au SI des résultats obtenus a été établie à travers l'utilisation d'un étalon primaire certifié en Fe (BNM-001), par la mise en œuvre de protocoles métrologiques durant toutes les étapes de la préparation des échantillons et par l'établissement d'un bilan complet de l'incertitude de mesure. L'application de cette méthode à d'autres échantillons de sérum (BCR-637 et échantillon du CNQ de l'ANSM B17) a démontré la validité de la méthode sur la mesure du Fe pour des concentrations dans la gamme des valeurs physiologiques avec des incertitudes relatives inférieures à 5 % ainsi que la faisabilité de l'application de la méthode pour l'assignation de valeurs de référence lors de programmes de contrôle qualité. Le **Tableau 30** résume les résultats sur la détermination du Fe par double ID-ICPMS dans différents échantillons de sérum.

**Tableau 30 : Résultats obtenus sur les différents échantillons de sérum exprimés en  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  Fe avec leurs incertitudes élargies en %.**

	Concentration ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ Fe) Incertitudes élargies (%)	Valeurs physiologiques ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ Fe)
<b>NIST SRM 1598a</b>	30 (3,7)	10 – 30
<b>ERM<sup>®</sup>-DA-120a</b>	9,9 (3,8)	
<b>BCR<sup>®</sup>-637</b>	20 (4,0)	
<b>B17</b>	26 (3,8)	

De plus, l'application de la méthode pour la détermination du Fe dans une autre matrice comme le sang avec l'analyse de l'échantillon Seronorm<sup>TM</sup> s'est montrée satisfaisante.

Suite aux résultats positifs obtenus par le LNE lors de la comparaison clé CCQM-K107, le département Biomédical et Chimie inorganique du LNE a obtenu en 2015 l'accréditation Cofrac selon les référentiels ISO EN 17025 et ISO EN 15195 pour le dosage du Fe par ID-ICPMS. La méthode développée pourra ainsi être transférée sur d'autres éléments essentiels comme par exemple des éléments d'importance en biologie médicale tels que Cl, Mg et K.

Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans la **Revue Française de Métrologie** (voir Annexe 1).



CHAPITRE 3 : DÉVELOPPEMENT DE  
MÉTHODES POUR L'ANALYSE DE  
L'HÉMOGLOBINE TOTALE PAR  
DILUTION ISOTOPIQUE



A l'heure actuelle, aucune méthode de référence primaire n'existe pour la détermination de l'Hb. Pour compenser ce manque, l'ICSH a établi la méthode HiCN comme méthode de référence internationale consensuelle [58]. D'autres méthodes de référence peuvent néanmoins être proposées si elles ont préalablement été comparées aux résultats obtenus avec la méthode de référence. Mais d'un point de vue métrologique, la méthode HiCN présente le principal inconvénient d'utiliser un étalon international consensuel [143] qui ne respecte pas les exigences d'un étalon primaire (Chapitre 1 Paragraphe 3.2.2.1).

L'objectif principal de cette étude est **le développement d'une méthode primaire pour la détermination de l'Hb totale**. En vue d'assurer la traçabilité métrologique, l'**ID-ICPMS** est idéale car elle est reconnue par le CCQM comme méthode potentiellement primaire (**Figure 36**). La validation de la méthode est effectuée à travers l'analyse du CRM JCCRM 912 et le calcul des incertitudes. Dans un premier temps, le développement d'une méthode basée sur la détermination de l'Hb par (Fe)-ID-ICPMS à partir de la teneur en Fe en prenant en compte la stœchiométrie de la molécule de l'Hb (4Fe(Hb)) après minéralisation de l'échantillon est présenté. Puis, une méthode d'analyse de spéciation élémentaire couplant séparation par chromatographie liquide et ICPMS est mise en place selon deux modes de ID : le mode non-spécifique et le mode spécifique. En raison de l'absence d'étalon enrichi d'Hb disponible commercialement, la première étape du mode spécifique sera la synthèse d'un étalon d'Hb marqué en isotope 57 du Fe. L'étalon synthétisé sera ensuite caractérisé, en terme de composition isotopique et de stabilité, afin d'appliquer l'ID. Puis, la caractérisation d'un étalon naturel d'Hb (notre étalon secondaire) sera effectuée pour établir la traçabilité métrologique des résultats.

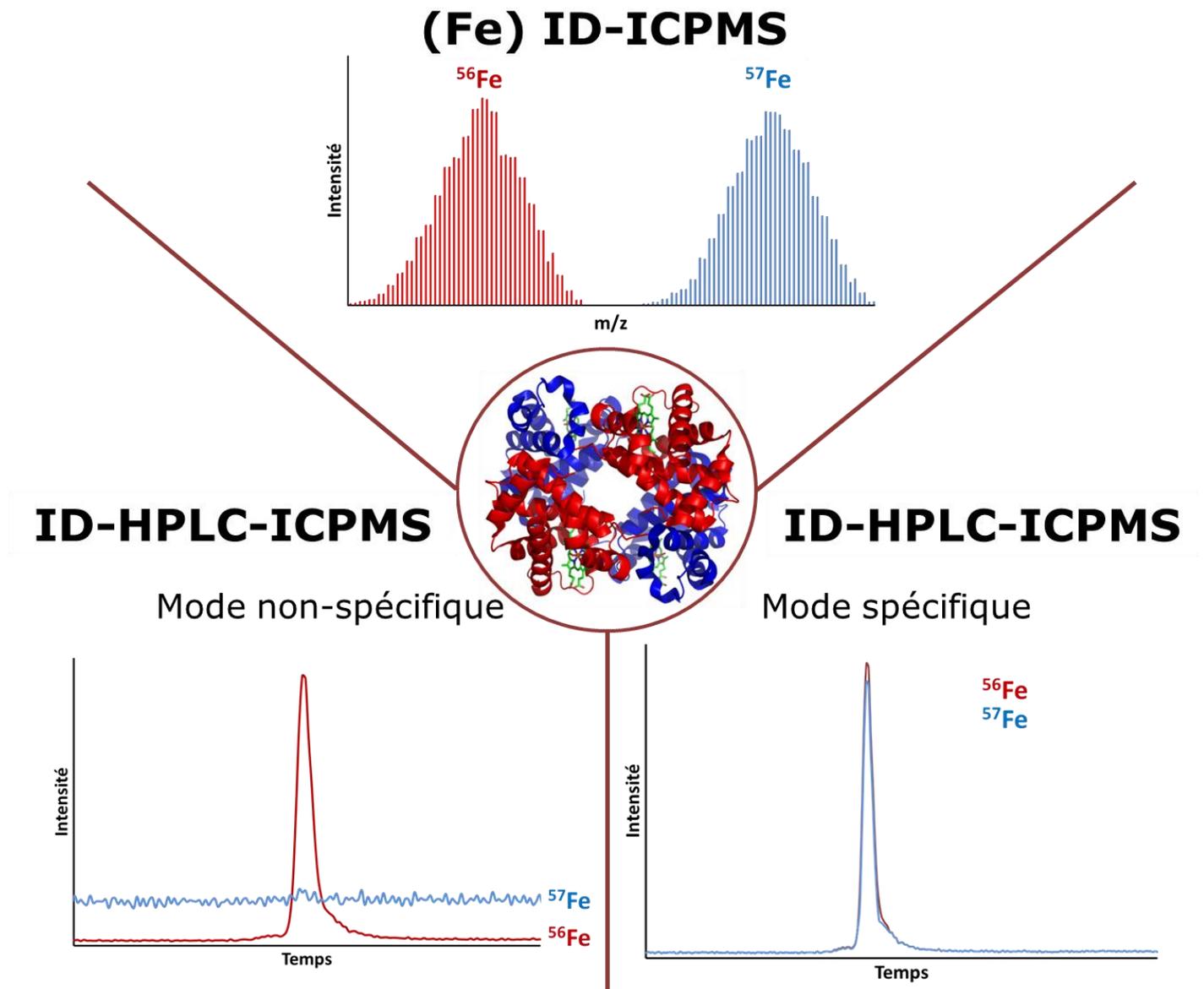
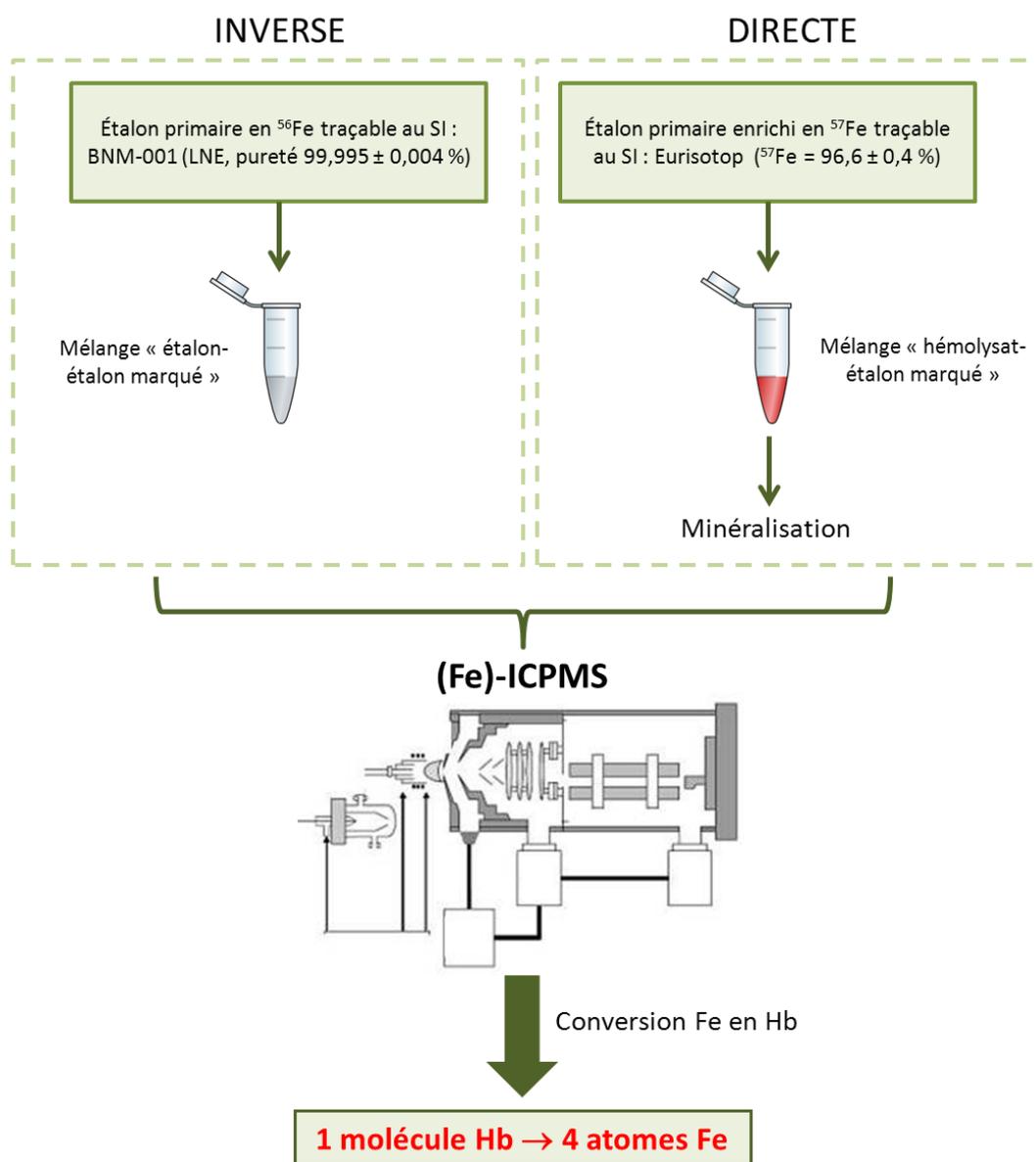


Figure 36 : Evaluation de différentes applications de l'ID associée à l'ICPMS pour l'analyse de l'Hb totale dans de l'hémolysat.

## 1. Détermination de l'Hb par double (Fe)-ID-ICPMS

La méthode pour la détermination de l'Hb totale dans de l'hémolysat par double (Fe)-ID-ICPMS est une adaptation de la méthode développée dans le Chapitre 2 pour l'analyse du Fe dans du sérum. Le principe général de cette méthode pour la quantification de l'Hb est présenté par la **Figure 37**.



**Figure 37 :** Workflow expliquant l'approche de la double (Fe)-ID-ICPMS pour la détermination de l'Hb dans de l'hémolysat.

Grâce à la connaissance de la stœchiométrie de l'Hb, la fraction massique en Fe déterminée par ID-ICPMS peut être convertie en fraction massique en Hb en tenant compte du rapport : une molécule d'Hb correspond à 4 atomes de Fe.

## 1.1. Réactifs et matériels

Le matériau de référence certifié en Hb totale, servant pour la validation de la méthode, est fourni par *Reference Material Institute for Clinical Chemistry Standards* (ReCCS) à trois niveaux de concentrations (CRM JCCRM 912-1 et 2 ; Low, Medium, High; Japon). Sa masse volumique est égale à 1,039 g.mL<sup>-1</sup>. C'est un hémolysat de sang d'origine humaine ce qui signifie que c'est le produit résultant de l'hémolyse des globules rouges. La préparation des étalons est réalisée à partir d'un matériau de référence certifié de haute pureté pour le Fe, BNM-001 (LNE, (99,995 ± 0,004) % (k=2)). La préparation de la solution en étalon marqué <sup>57</sup>Fe est réalisée à partir d'un métal enrichi provenant de chez Eurisotop (Saint Aubin, France). Ce métal est digéré dans un mélange à 2-4 % d'HNO<sub>3</sub> pour obtenir une solution d'environ 1000 µg.g<sup>-1</sup> Fe. L'HNO<sub>3</sub> est de haute pureté (67-69%, 10 ppt Fe, Fisher chemical, Canada). La solution tampon est préparée avec du Tris(hydroxyméthyle)aminométhane (Tris) (99.9%, Sigma Aldrich, Etats-Unis). La solution multiélémentaire pour le *tune* provient de chez Thermo Fisher. L'eau ultra pure de 18,2 MΩ.cm est obtenue en utilisant le système Milli-Q™ (Millipore SAS, France). Tous les réactifs sont des réactifs analytiques de haute pureté et les solutions sont préparées par gravimétrie dans une salle blanche classée ISO 7 à partir de la norme 14644-1. L'ultrafiltration est réalisée dans des tubes: Amicon Ultra-0,5mL 3K, Ultracel – 3K Membrane, cellulose 3,000 MWCO (Sigma Aldrich, Etats-Unis). Les tubes de minéralisation utilisés sont d'une contenance de 10 mL en Pyrex (CEM Corporation, Matthews, Etats-Unis) et les tubes de préparation sont de 50 mL en polypropylène (115/28, gradué, AnaLab, France).

## 1.2. Instrumentation

Les isotopes <sup>56</sup>Fe et <sup>57</sup>Fe sont mesurés avec un ICPMS à secteur magnétique : l'ELEMENT XR™ HR-ICPMS. Les conditions analytiques utilisées sont identiques à celles présentées dans le **Tableau 19** du Chapitre 2. Pour l'analyse du Fe, la moyenne résolution (m/Δm = 4500) est utilisée afin d'éviter les interférences polyatomiques (pour le <sup>56</sup>Fe : <sup>40</sup>Ar<sup>16</sup>O<sup>+</sup>, pour le <sup>57</sup>Fe : <sup>40</sup>Ar<sup>16</sup>OH<sup>+</sup>).

La digestion acide assistée par système micro-ondes est réalisée avec le système Discover SP-D (CEM Corporation, Matthews, États-Unis). La centrifugeuse Ultracentrifugate Sigma 2-16PK (Fisher Scientific Bioblock, France) est utilisée pour réaliser l'ultrafiltration. Le pHmètre provient de chez Mettler Toledo (Five easy).

Les balances utilisées présentent les caractéristiques suivantes:

- Balance avec une capacité maximum de 200 g et une résolution de 0,1 mg (Mettler Toledo).
- Balance avec une capacité maximum de 30 g et une résolution de 0,001 mg (Sartorius).

Les balances sont étalonnées périodiquement (tous les 6 mois) et vérifiées quotidiennement en utilisant des masses étalons.

### 1.3. Procédures

#### 1.3.1. Mise en place du protocole de la double (Fe)-ID-ICPMS

L'approche métrologique de la double (Fe)-ID-ICPMS est identique à celle présentée dans le Chapitre 2 (paragraphe 1.4). Ainsi la concentration en Fe dans l'échantillon est déterminée à partir de l'équation 28 qui prend en compte la fraction massique en Fe obtenue par ID, les dilutions ( $F_{dilution}$ ) et la masse volumique de l'hémolysat ( $\rho_{hémolysat}$ ). Pour convertir cette concentration en Fe en Hb, il faut prendre en compte la stœchiométrie de la molécule ((4Fe)Hb) : 4 atomes de Fe pour une molécule d'Hb ainsi que la masse moléculaire des éléments ( $M_{Fe}$  et  $M_{Hb}$ ). L'équation 29 présente cette conversion.

$$C_s = W_{sp} \cdot \frac{m_{eta}}{m_{spi}} \cdot \frac{m_{spd}}{m_s} \cdot \frac{(A_{eta}^a - R_{inv}^{a/b} k_{inv} A_{eta}^b)}{(R_{inv}^{a/b} k_{inv} A_{sp}^b - A_{sp}^a)} \cdot \frac{(R_{dir}^{a/b} k_{dir} A_{sp}^b - A_{sp}^a)}{(A_s^a - R_{dir}^{a/b} k_{dir} A_s^b)} \cdot F_{dilution} \cdot \rho_{hémolysat} \quad \text{Équation 28}$$

$$Hb_{calculée} = \frac{C_s \cdot M_{Hb}}{4 \cdot M_{Fe}} \quad \text{Équation 29}$$

Avec :

- $F_{dilution}$  est le facteur de dilution correspondant à la dilution de l'échantillon.
- $\rho_{hémolysat}$  est la masse volumique de l'échantillon exprimée en g.mL<sup>-1</sup>.
- $Hb_{calculée}$  est la concentration en Hb en g.L<sup>-1</sup> obtenue après conversion.
- $C_s$  est la concentration obtenue après analyses par (Fe)-ID-ICPMS en g.L<sup>-1</sup> Fe.
- $M_{Hb}$  correspond à la masse moléculaire de l'Hb qui est égale à 64458 Da.
- $M_{Fe}$  correspond à la masse atomique du Fe qui est de 55,845 g.mol<sup>-1</sup>.

Le protocole analytique expliqué en détail dans le Chapitre 2 est appliqué pour la détermination de l'Hb par la double (Fe)-ID-ICPMS.

Pour la mise en place de l'ID directe, les échantillons d'hémolysats du CRM JCCRM 912-1 et 912-2 étant disponibles à différentes concentrations (de 78,0 à 185,7 g.L<sup>-1</sup> Hb) et en faible quantité (flacon de 500 µL pour chaque niveau de concentration), une dilution dans une solution tampon (10 mmol.L<sup>-1</sup> Tris, pH 7,5 - 8,0) est nécessaire afin d'obtenir une concentration moyenne de 1,2 µg.kg<sup>-1</sup> Hb ( $\approx 4,0$  ng(Fe).kg<sup>-1</sup>). Les mélanges « échantillon-étalon marqué » sont préparés en utilisant la solution d'étalon marqué en <sup>57</sup>Fe.

Pour préparer les mélanges « étalon-étalon marqué » de l'ID inverse, deux solutions mères indépendantes de 1 000 mg.kg<sup>-1</sup> Fe de haute pureté sont utilisées. Par conséquent les mélanges « étalon-étalon marqué » sont indépendants deux à deux.

Le biais en masse est calculé à partir de l'analyse d'une solution d'étalon en Fe de haute pureté (BNM-001) préparée dans 2 % d' $\text{HNO}_3$ .

Les mélanges « échantillon-étalon marqué » et « étalon-étalon marqué » sont préparés en au moins quatre réplicats chacun. Les mélanges ainsi que la solution pour évaluer le biais en masse ont tous une concentration finale comprise entre 5 et 15  $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$  Fe. Ces solutions sont analysées par ICPMS.

### 1.3.2. Ultrafiltration à 3 kDa

Etant donné que la méthode utilisée repose sur l'analyse du Fe contenu dans la molécule d'Hb, pour vérifier la présence ou l'absence d'espèces ferriques de faibles masses moléculaires (par exemple : Fe libre) dans notre échantillon, une étape d'ultrafiltration avec un filtre à 3 kDa est réalisée. Une quantité de 0,5 g d'échantillon dilué à 1,2  $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$  Hb ( $\approx 4,0 \text{ ng}(\text{Fe}).\text{kg}^{-1}$ ) est pesée avec précision dans les tubes d'ultrafiltration et centrifugée à 14000 g, 4°C pendant 30 min. Après la centrifugation, chaque partie du filtre (fraction < 3kDa et fraction > 3kDa) est pesée avec précision. Les cycles de centrifugation sont répétés jusqu'à ce que les pesées soient constantes pour chaque fraction. Ensuite, afin de récupérer la fraction > 3 kDa présente sur le filtre, une autre centrifugation est nécessaire à 5000 g, 4 °C pendant 10 min. Les différentes fractions sont analysées par double (Fe)-ID-ICP-MS selon le protocole décrit préalablement (1.3.1). La **Figure 38** présente le schéma représentant les différentes étapes de l'ultrafiltration.

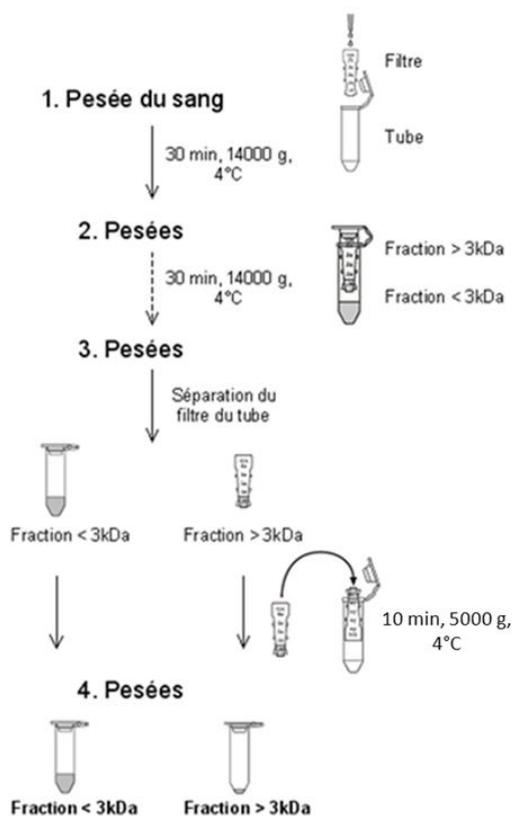


Figure 38 : Schéma de la procédure de l'ultrafiltration.

## 1.4. Evaluation des incertitudes

La démarche élaborée pour calculer les incertitudes dans le cas de l'analyse par double (Fe)-ID-ICPMS repose sur la méthode analytique préconisée par le GUM et expliquée dans le Chapitre 2 (paragraphe 1.5) [15]. Après avoir défini l'écriture du modèle mathématique correspondant à la détermination de l'Hb totale par double (Fe)-ID-ICPMS ainsi qu'évaluer les incertitudes-types de chaque grandeur d'entrée, l'incertitude-type composée du résultat,  $u_{C_s}$ , est calculée à partir du logiciel Wincert. L'équation finale utilisée pour évaluer les incertitudes en prenant en compte la fidélité ( $f_{dir}$ ,  $f_{inv}$ ) est représentée ci-dessous :

$$C_s = W_{sp} \cdot \frac{m_{eta}}{m_{spi}} \cdot \frac{m_{spd}}{m_s} \cdot \frac{(A_{eta}^a - R_{inv}^{a/b} k_{inv} A_{eta}^b)}{(R_{inv}^{a/b} k_{inv} A_{sp}^b - A_{sp}^a)} \cdot \frac{(R_{dir}^{a/b} k_{dir} A_{sp}^b - A_{sp}^a)}{(A_s^a - R_{dir}^{a/b} k_{dir} A_s^b)} \cdot F_{dilution} \cdot \rho_{serum} \cdot \frac{1 \cdot M_{Hb}}{A \cdot M_{Fe}} + f_{inv} + f_{dir}$$

### Équation 30

Le résultat est accompagné de son incertitude élargie,  $U$ , calculée avec un facteur d'élargissement,  $k$ , égal à 2.

## 1.5. Résultats

Afin de valider la méthode développée sur le dosage de l'Hb dans de l'hémolysat à partir de sa teneur en Fe par double (Fe)-ID-ICPMS, deux lots de CRM JCCRM 912 (lot 1 et lot 2) ont été analysés. L'hypothèse que tout le Fe mesuré provienne de l'Hb est émise si au préalable une vérification de l'absence d'espèces ferriques de faible masse moléculaire (par exemple : Fe libre, hème, ...) a été effectuée. La double ID est appliquée pour l'analyse des CRM JCCRM 912 1et 2.

### 1.5.1. Validation de la méthode par double (Fe)-ID-ICPMS

La validation de la méthode développée a été réalisée par l'utilisation du CRM JCCRM 912-1 et 2 (ReCCS) certifié en Hb totale dans de l'hémolysat par la méthode de référence HiCN (sur trois niveaux de concentrations : L, M et H).

Dans un premier temps, la méthode développée est utilisée sur le CRM JCCRM 912-1. Pour chaque niveau de concentration, quatre réplicats ( $n=4$ ) ont été effectués par une détermination. Les valeurs obtenues sont en accord avec les valeurs certifiées (voir le **Tableau 31**).

**Tableau 31 : Détermination de l'Hb dans le CRM JCCRM 912-1 par double (Fe)-ID-ICPMS.**

	Fe, mg.L <sup>-1</sup> ( $k=2$ )	Hb, g.L <sup>-1</sup> ( $k=2$ )	Hb (certifiée) g.L <sup>-1</sup> ( $k=2$ )	$E_N$	Erreur relative (%)
<b>JCCRM 912-1L (n=4)</b>	287,2 ± 6,8	82,9 ± 2,0	80,7 ± 1,0	1,97 < 2	+ 2,7
<b>JCCRM 912-1M (n=4)</b>	474,4 ± 13,6	136,9 ± 3,9	136,7 ± 1,6	0,10 < 2	+ 0,2
<b>JCCRM 912-1H (n=4)</b>	628,6 ± 18,9	181,3 ± 5,4	185,7 ± 2,2	1,50 < 2	- 2,4

Les  $E_N$ , calculés à partir de l'équation 26 du Chapitre 2, sont inférieurs à 2, ce qui signifie que les valeurs mesurées ne sont pas statistiquement significativement différentes de la valeur de référence. De plus, l'erreur relative obtenue est satisfaisante, car elle est inférieure à 3 %. La méthode développée est donc validée par l'analyse de ce matériau de référence certifié (912-1).

De plus, afin de vérifier la présence ou l'absence d'espèces ferriques de faibles masses moléculaires dans le CRM, la solution non traitée ainsi que les deux fractions obtenues après ultrafiltration (**Figure 38**) sont analysées par double ID-ICP-MS. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 32**.

**Tableau 32 : Détermination de l'Hb dans les différentes fractions du CRM JCCRM 912-1 par double (Fe)-ID-ICPMS**

JCCRM 912-1L (n=4)	Fe, mg.L <sup>-1</sup> (k=2)	Hb, g.L <sup>-1</sup> (k=2)	Hb (certifiée) g.L <sup>-1</sup> (k=2)
<b>Non traitée</b>	287,2 ± 6,8	82,9 ± 2,0	
<b>Fraction &gt; 3kDa</b>	297,0 ± 15,1	85,7 ± 4,3	80,7 ± 1,0
<b>Fraction &lt; 3kDa</b>	< 1,0	< 0,2	

La valeur déterminée pour la fraction > 3kDa est en bonne concordance avec la valeur déterminée pour la solution non traitée ainsi que la valeur certifiée. Dans la fraction < 3 kDa, la valeur de Fe mesurée est inférieure à 1,0 mg.L<sup>-1</sup>. Au regard de ces résultats, il n'y a pas d'espèces contenant du Fe de masse inférieure à 3 kDa dans le CRM JCCRM 912-1 ce qui renforce l'hypothèse effectuée au préalable. D'autre part le traitement par ultrafiltration à 3 kDa permet de récupérer la quasi-totalité de l'échantillon après le traitement. En effet, le **Tableau 33** récapitule les pourcentages de récupération obtenus après chaque étape de centrifugation et un recouvrement total de 98,5 % est observé.

**Tableau 33 : Bilan de récupération du CRM après l'ultrafiltration à 3 kDa.**

CRM JCCRM 912-1L	
<b>Masse de CRM (g)</b>	0,4909 ± 0,0001
<b>Fraction &lt; 3 kDa (%)</b>	
<b>Centrifugation 1</b>	85,35 ± 0,01
<b>Centrifugation 2</b>	5,36 ± 0,01
<b>Centrifugation 3</b>	1,91 ± 0,01
<b>Centrifugation 4</b>	0,65 ± 0,01
<b>Recouvrement &lt; 3 kDa</b>	<b>93,27 ± 0,01 %</b>
<b>Fraction &gt; 3 kDa (%)</b>	
<b>Centrifugation 1</b>	5,27 ± 0,01
<b>Recouvrement &gt; 3 kDa</b>	<b>5,27 ± 0,01 %</b>
<b>Recouvrement total</b>	<b>98,54 ± 0,01 %</b>

La méthode (Fe)-ID-ICPMS a ensuite été utilisée sur un nouveau lot de CRM (JCCRM 912-2). Pour chaque niveau de concentration, trois et quatre réplicats ont été effectués pour deux

déterminations ( $p=2$ ) pour les niveaux M et H et trois déterminations ( $p=3$ ) pour le niveau L. Les valeurs obtenues sont en accord avec les valeurs certifiées (voir **Tableau 34**).

**Tableau 34: Détermination de l'Hb dans le CRM JCCRM 912-2 par double (Fe)-ID-ICPMS.**

	Fe, mg.L <sup>-1</sup> ( $k=2$ )	Hb, g.L <sup>-1</sup> ( $k=2$ )	Hb (certifiée) g.L <sup>-1</sup> ( $k=2$ )	E <sub>N</sub>	Erreur relative (%)
<b>JCCRM 912-2L (n×p=9)</b>	276,8 ± 11,1	79,9 ± 3,2	78,0 ± 0,9	1,13 < 2	+ 2,4
<b>JCCRM 912-2M (n×p=6)</b>	489,5 ± 14,9	141,2 ± 4,3	137,2 ± 1,5	1,78 < 2	+ 2,9
<b>JCCRM 912-2H (n×p=7)</b>	626,1 ± 21,5	180,7 ± 6,2	179,5 ± 2,1	0,36 < 2	+ 0,7

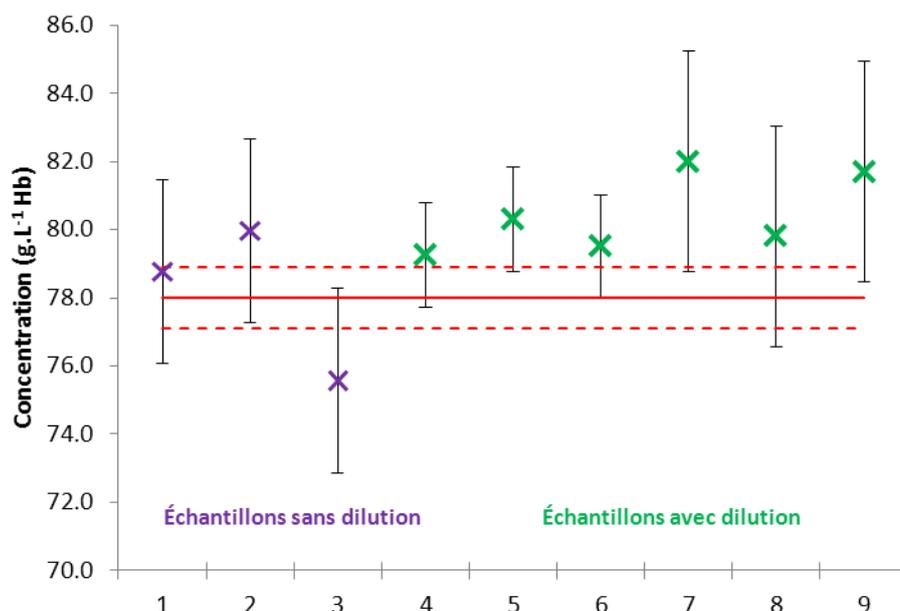
Ainsi, les E<sub>N</sub> obtenus sont inférieurs à 2, ce qui signifie que les valeurs mesurées ne sont pas statistiquement significativement différentes de la valeur de référence. De plus, l'erreur relative obtenue est satisfaisante car elle est inférieure ou égale à 3 %. La méthode développée est donc validée par l'analyse du CRM JCCRM 912-2.

Ensuite, pour le CRM de niveau bas (2L), une détermination supplémentaire par rapport aux deux autres niveaux a été effectuée. Cette détermination est réalisée pour observer l'impact de la dilution initiale de l'échantillon lors de la mise en place de l>ID. Dans l'idéal, l'étalon marqué doit être ajouté le plus tôt possible afin de compenser des pertes pendant l'étape de préparation. En revanche, comme la quantité d'échantillon est très faible (500 µL) et les concentrations initiales assez élevées, le choix a été fait de diluer l'échantillon initial avant l'ajout de l'étalon marqué. Le **Tableau 35** regroupe les valeurs obtenues avec ou sans dilution du CRM de niveau de concentration le plus bas.

**Tableau 35 : Résultats obtenus par double (Fe)-ID-ICPMS pour l'analyse du JCCRM 912-2L avec ou sans dilution initiale.**

JCCRM 912-2L	Fe, mg.L <sup>-1</sup> ( $k=2$ )	Hb, g.L <sup>-1</sup> ( $k=2$ )	Hb (certifiée) g.L <sup>-1</sup> ( $k=2$ )	E <sub>N</sub>	Erreur relative (%)
<b>Avec dilution (n×p=6)</b>	279,9 ± 9,4	80,8 ± 2,7	78,0 ± 0,9	1,94 < 2	+ 3,5
<b>Sans dilution (n=3)</b>	270,7 ± 11,2	78,1 ± 3,2		0,06 < 2	+ 0,1

Les résultats montrent une amélioration de l'erreur relative pour les valeurs obtenues sans dilution, cependant, cette différence n'est pas significative car suivant le nombre de détermination, la variation de l'erreur relative peut être comprise entre - 5 % et 5 %. En effet, la **Figure 39** montre les différents résultats obtenus pour chaque réplicat avec ou sans dilution et une dispersion des mesures est observée pour les échantillons n'ayant pas subi de dilution initiale. Aucune influence n'a donc été observée que l'échantillon subisse une étape de dilution ou non.



**Figure 39 : Représentation graphique des valeurs individuelles obtenues par double (Fe)-ID-ICPMS pour l'analyse du JCCRM 912-2L avec ou sans dilution initiale. La ligne en rouge représente la valeur moyenne obtenue associée à son incertitude en pointillé ( $78,0 \pm 0,9 \text{ g.L}^{-1} \text{ Hb}$ ).**

Par ailleurs, le JCCRM 912-2H, comme le CRM JCCRM 912-1, subit une étape d'ultrafiltration à 3 kDa (**Figure 38**). La solution non traitée ainsi que les deux fractions obtenues après ultrafiltration sont analysées par double ID-ICPMS. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 36**.

**Tableau 36 : Détermination de l'Hb dans les différentes fractions du CRM JCCRM 912-2 par double (Fe)-ID-ICPMS.**

JCCRM 912-2H (n=4)	Fe, $\text{mg.L}^{-1}$ ( $k=2$ )	Hb, $\text{g.L}^{-1}$ ( $k=2$ )	Hb (certifiée) $\text{g.L}^{-1}$ ( $k=2$ )
Non traitée	$626,1 \pm 21,5$	$180,7 \pm 6,2$	
Fraction > 3kDa	$611,1 \pm 16,2$	$176,4 \pm 4,7$	$179,5 \pm 2,1$
Fraction < 3kDa	< 1,0	< 0,2	

La valeur déterminée pour la fraction > 3kDa est aussi en bonne concordance avec la valeur déterminée pour la solution non traitée ainsi que la valeur certifiée. Dans la fraction < 3 kDa, la valeur de Fe mesurée est inférieure à  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ . Au regard de ces résultats, il n'y a pas d'espèces contenant du Fe inférieures à 3 kDa dans le CRM JCCRM 912-2.

La méthode développée par double (Fe)-ID-ICPMS a été validée par l'analyse des matériaux de référence certifiés en Hb, JCCRM 912-1 et 2, sur trois niveaux de concentration compris entre  $78,0$  et  $185,7 \text{ g.L}^{-1} \text{ Hb}$  avec la vérification de l'absence d'espèces ferriques de faible masse moléculaire.

### 1.5.2. Comparaisons interlaboratoires

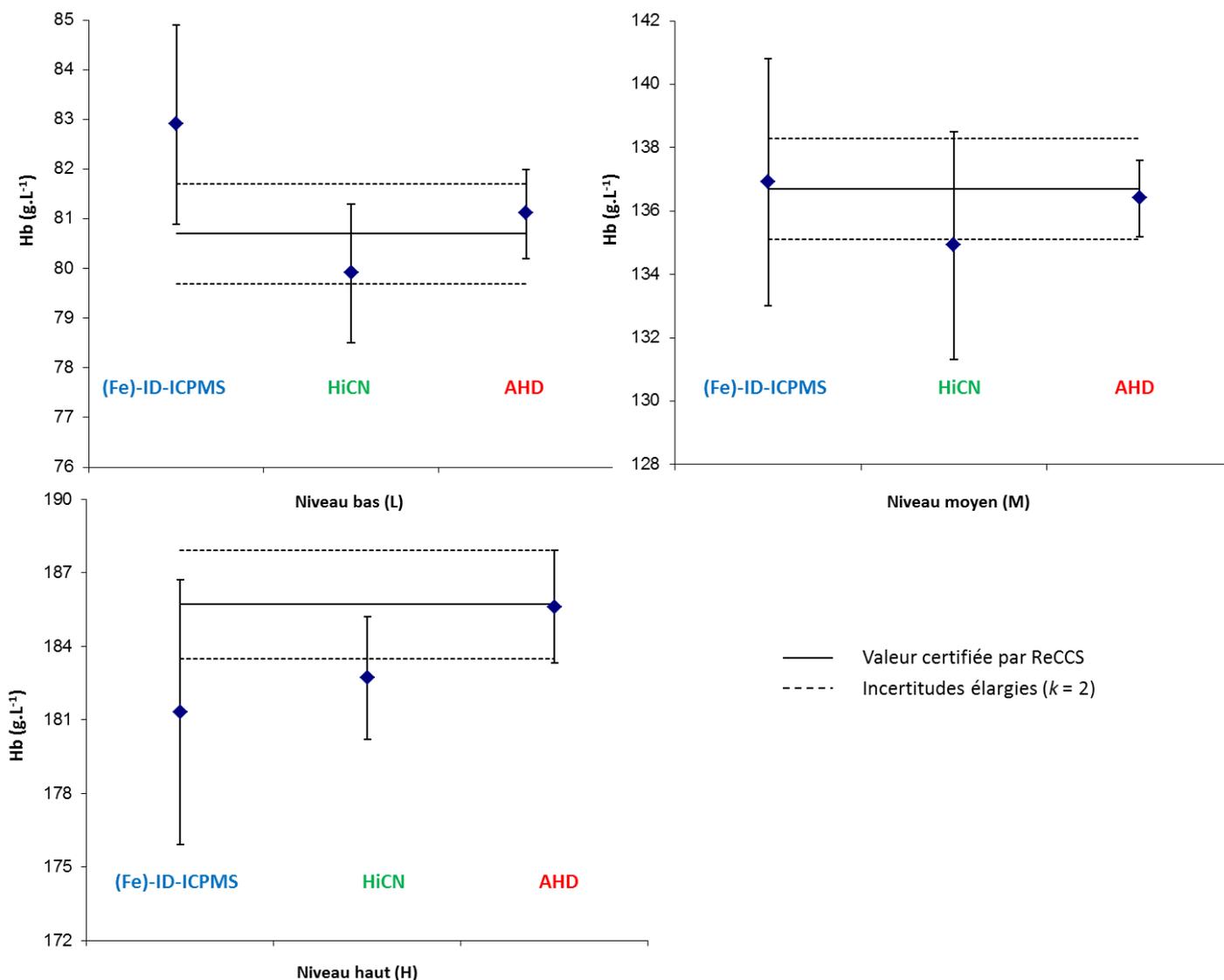
Dans le cadre du projet EMRP *HLT05 – Metallomics*, deux comparaisons interlaboratoires différentes sur ces matériaux de référence, ont été conduites entre le LNE et la PTB Berlin et Braunschweig (NMI allemand). Des mesures par les méthodes spectrophotométriques et par spectrométrie de masse sont réalisées pour analyser le CRM JCCRM 912-1 et 2.

A/ Une première comparaison a été effectuée sur le CRM JCCRM 912-1 sur les trois niveaux de concentration par détermination avec la méthode (Fe)-ID-ICPMS et par mesure spectrophotométrique. Les mesures d'absorbance par les méthodes HiCN et AHD ont été réalisées par la PTB Berlin [147]. Pour ces trois méthodes, la même molécule cible est analysée, l'Hb, mais les méthodes de mesure sont sensibles à différentes sous-unités, à savoir le groupe chromophore Fe-porphyrine pour la détection par spectrophotométrie et le Fe lié à l'hème pour la détection par ICPMS. Le **Tableau 37** regroupe les différents résultats obtenus pour l'analyse du CRM 912-1.

**Tableau 37 : Concentrations d'Hb totale déterminées par (Fe)-ID-ICPMS et par mesure d'absorbance par spectrophotométrie sur le CRM 912-1.**

	(Fe)-ID-ICPMS Hb, g.L <sup>-1</sup> (k=2)	HiCN-VISIBLE Hb, g.L <sup>-1</sup> (k=2)	AHD-VISIBLE Hb g.L <sup>-1</sup> (k=2)	Hb (certifiée) g.L <sup>-1</sup> (k=2)
<b>JCCRM 912-1L</b>	82,9 ± 2,0	79,9 ± 1,4	81,1 ± 0,9	<b>80,7 ± 1,0</b>
<b>JCCRM 912-1M</b>	136,9 ± 3,9	134,9 ± 3,6	136,4 ± 1,2	<b>136,7 ± 1,6</b>
<b>JCCRM 912-1H</b>	181,3 ± 5,4	182,7 ± 2,5	185,6 ± 2,3	<b>185,7 ± 2,2</b>

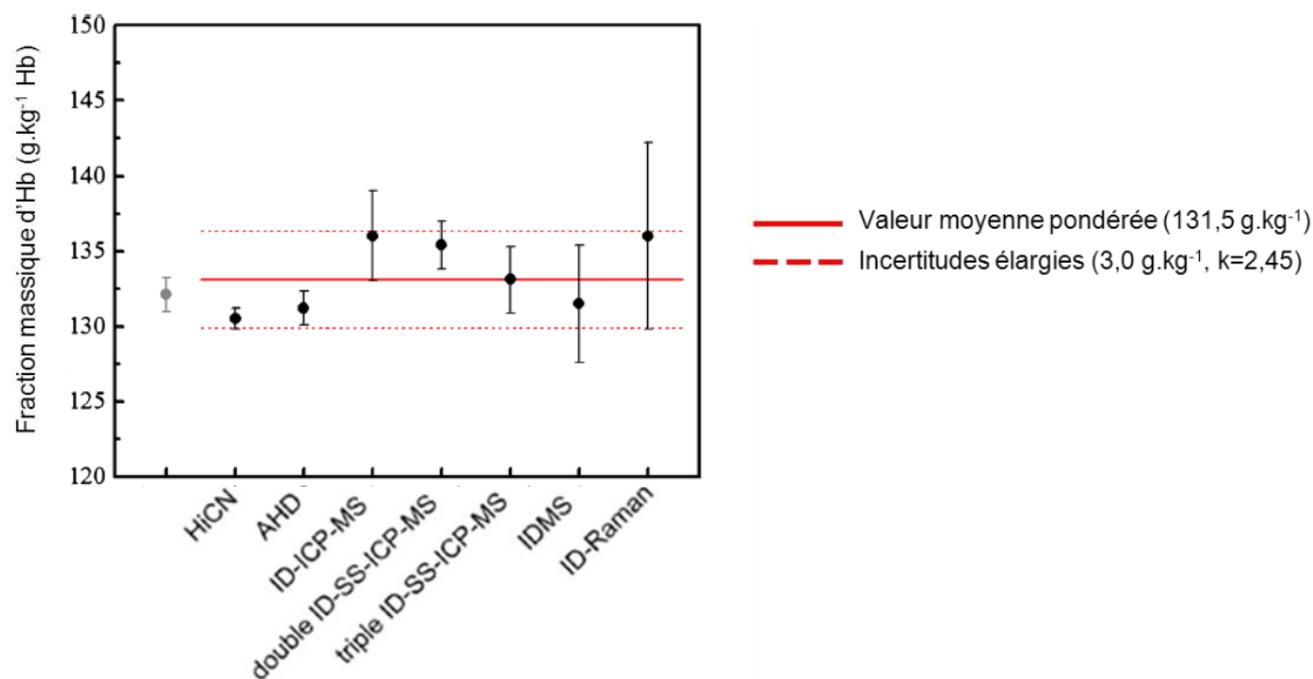
Les données expérimentales figurant dans le **Tableau 37** et représentées sur la **Figure 40** indiquent qu'un bon accord a été obtenu entre les mesures d'absorbance (HiCN et AHD) et les mesures par (Fe)-ID-ICPMS. Les  $E_N$  obtenues pour les méthodes par HiCN et AHD sont inférieures à 2. Ainsi, les valeurs obtenues sont également en bon accord avec la valeur certifiée par le ReCCS au Japon qui utilise le protocole par HiCN.



**Figure 40 : Comparaison des valeurs d’Hb totale du CRM sur les trois niveaux de concentration en appliquant les méthodes HiCN, AHD et (Fe)-ID-ICPMS.**

B/ Une deuxième comparaison a été effectuée en comparant six méthodes de quantification d’Hb totale par l’analyse du matériau de référence JCCRM 912-2M, dont la concentration en Hb totale est certifiée [198]. Des procédures de mesures d’absorbance (méthodes HiCN et AHD) ont été comparées avec celles qui emploient l’ID associée à une détection par MS ou Raman afin d’obtenir des résultats traçables au SI. Les différentes méthodes sont basées sur des procédures complémentaires, mais elles visent toutes à quantifier le même mesurande (l’Hb dans l’hémolysat). Tandis que les mesures d’absorbance détectent le groupe chromophore, ID-MS inorganique détecte le composant métallique de la protéine après séparation par chromatographie (double et triple ID-SS-ICPMS [115]) ou après minéralisation ((Fe)-ID-ICPMS - LNE), l’ID-MS organique répond à la composante globine et la spectrométrie Raman (ID-Raman) est sensible à la protéine dans son

ensemble. Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 41** et les données expérimentales sont récapitulées dans le **Tableau 38**.



**Figure 41 : Fractions massiques de l'Hb et leurs incertitudes élargies correspondantes ( $k = 2$ ) obtenues avec les différentes méthodes pour JCCRM 912-2M. La valeur certifiée est représentée en orange et est égale à  $132,1 \pm 1,5 \text{ g.kg}^{-1} \text{ Hb}$  [198].**

Les résultats pour la quantification de l'Hb totale de toutes les méthodes sont en bon accord avec la valeur certifiée du JCCRM 912-2M ( $132,1 \pm 1,5 \text{ g.kg}^{-1} \text{ Hb}$ ) ainsi que la moyenne pondérée de toutes les méthodes ( $131,5 \pm 3,0 \text{ g.kg}^{-1} \text{ Hb}$ ).

**Tableau 38 : Valeur certifiée, fractions massiques d'Hb, concentration massique d'Hb et les incertitudes correspondantes élargies ( $k = 2$ ) à partir des différentes méthodes appliquées sur le JCCRM 912-2M [198].**

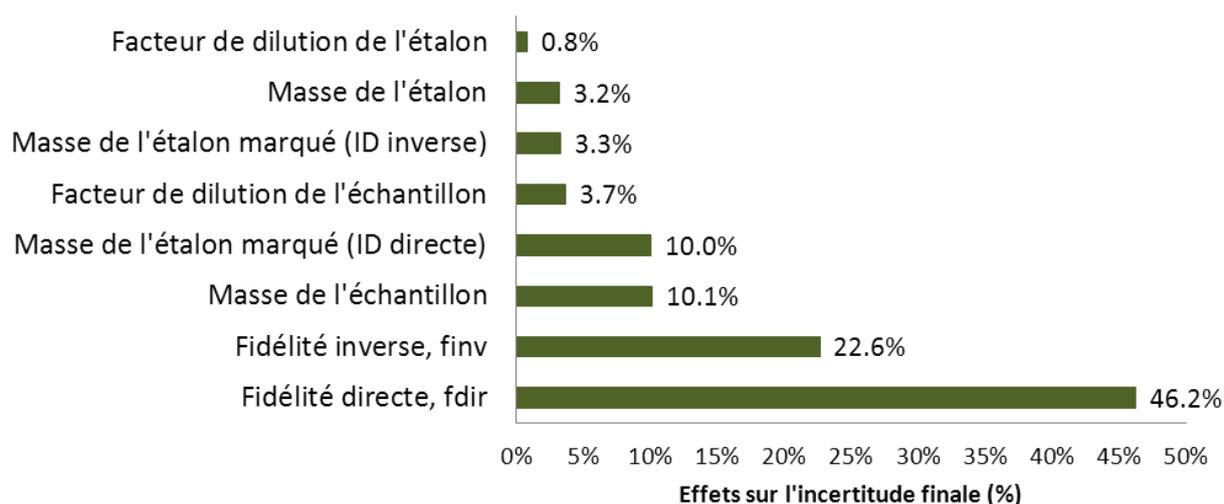
Méthode	Fraction massique ( $\text{g.kg}^{-1} \text{ Hb}$ )	Concentration ( $\text{g.L}^{-1} \text{ Hb}$ )
<b>Valeur certifiée</b>	<b><math>132,1 \pm 1,5</math></b>	<b><math>137,2 \pm 1,5</math></b>
HiCN	$130,5 \pm 0,9$	$136,6 \pm 0,9$
AHD	$131,2 \pm 1,5$	$136,3 \pm 1,5$
<b>Double (Fe)-ID-ICPMS</b>	$136,0 \pm 3,9$	$141,3 \pm 4,0$
<b>Triple ID-SS-ICPMS</b>	$135,4 \pm 2,1$	$140,4 \pm 2,2$
<b>Double ID-SS-ICPMS</b>	$133,1 \pm 2,9$	$138,3 \pm 3,0$
ID-MS	$131,5 \pm 5,6$	$136,6 \pm 5,8$
ID-Raman	$136,0 \pm 8,5$	$141,3 \pm 8,8$

Par conséquent, l'excellent accord trouvé dans cette étude peut être considéré comme une validation croisée réussie entre différentes méthodes appliquées. Les différentes approches en ID constituent un outil pour établir des mesures traçables au SI. De plus, en comparant les méthodes spectrophotométriques avec les procédures de mesures primaires qui sont basées sur l'ID, la justesse des méthodes spectrophotométriques pour Hb totale est démontrée.

La deuxième comparaison interlaboratoire a donné lieu à une publication soumise dans le journal *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (voir Annexe 2).

### 1.5.3. Incertitudes

L'incertitude finale obtenue pour la détermination de l'Hb totale du CRM JCCRM 912 (lots 1 et 2) par double (Fe)-ID-ICPMS est faible, elle représente moins de 4 % du résultat final pour toutes les analyses. La **Figure 42** montre la répartition moyenne des composantes de l'incertitude finale sur la détermination de l'Hb totale. Les principales sources d'incertitude sont liées à la fidélité des mesures sur les rapports isotopiques direct ( $R_{dir}$ ) et inverse ( $R_{inv}$ ). L'effet sur l'incertitude finale de la fidélité directe ( $f_{dir}$ ) a tendance à être plus élevé (46 %) que celui de la fidélité inverse,  $f_{inv}$  (23 %). En effet, le type d'échantillon est différent puisque pour l'ID directe, l'échantillon est de l'hémolysat donc une matrice complexe qui doit subir une minéralisation, tandis que pour l'ID inverse, l'échantillon est une solution d'un étalon de Fe de haute pureté (qui ne subit pas de minéralisation).



**Figure 42 : Répartition des composantes de l'incertitude finale de  $C_{éch}$ .**

Enfin, intéressons-nous aux incertitudes obtenues par les autres méthodes présentées dans la comparaison interlaboratoires. Les contributions majeures sur les incertitudes finales obtenues pour les différentes méthodes sont présentées dans le **Tableau 39**. Les incertitudes des méthodes spectrophotométriques dépendent, entre autres, du coefficient d'extinction molaire du complexe obtenu avec la méthode AHD et HiCN. Ces facteurs sont des valeurs tabulées [199, 200]. Les incertitudes liées aux méthodes utilisant d'ID dépendent principalement des rapports isotopiques

mesurés et de la pureté de l'étalon. Les incertitudes obtenues par les méthodes utilisant l'ICPMS sont très faibles par rapport aux autres techniques de détection (ID-MS organique et ID-Raman).

**Tableau 39 : Contributions principales sur les incertitudes élargies ( $k=2$ ) des différentes méthodes interlaboratoires.**

Méthodes	Quantités	Contribution sur l'incertitude
<b>HiCN</b>	Coefficient d'extinction molaire	44 %
	Absorbance mesurée à 540 nm	14 %
<b>AHD</b>	Coefficient d'extinction molaire	56 %
	Absorbance mesurée à 574 nm	20 %
<b>Triple ID-SS-ICPMS</b>	Rapport isotopique mesuré dans le mélange « étalon-étalon marqué », $R_{inv}$	55 %
	Rapport isotopique mesuré dans le mélange « échantillon-étalon marqué », $R_{dir}$	34 %
<b>Double ID-SS-ICPMS</b>	Rapport isotopique mesuré dans le mélange « étalon-étalon marqué », $R_{inv}$	63 %
	Pureté de l'étalon	27 %
<b>ID-MS</b>	Pureté de l'étalon déterminé par analyse d'acide aminé (IDMS)	77 %
	Fraction massique de l'Hb dans l'échantillon	23 %
<b>ID-Raman</b>	Quantité de la fraction d'Hb dans le mélange « échantillon-étalon marqué »	56 %
	Quantité de la fraction d'Hb dans le mélange « étalon-étalon marqué »	20 %

## 1.6. Conclusions

Le développement d'une méthode associant la double ID à l'ICPMS pour la détermination de l'Hb à partir de sa teneur en Fe a été validé par l'analyse du matériau certifié en Hb (JCCRM 912-1 et 912-2). Cette méthode est une approche prometteuse (erreur relative inférieure à 3 %) pour assurer une justesse des résultats avec de faibles incertitudes (inférieures à 4 %). De plus, les comparaisons des résultats obtenus pour les deux lots de JCCRM avec d'autres méthodes comme les mesures spectrophotométriques ou d'autres techniques d'ID associées à l'ICPMS, la MS ou la spectroscopie Raman, ont permis de confirmer la validation de la méthode.

Cependant, cette méthode est seulement applicable s'il n'y a pas de présence de Fe libre ou d'espèces contenant du Fe autre que l'Hb dans notre échantillon. C'est pour cette raison qu'il est nécessaire de développer une méthode d'analyse de spéciation permettant la quantification spécifique de l'Hb.

## 2. Détermination de l'Hb par HPLC-ICPMS

L'objectif est de mettre en place **une méthode primaire en spéciation élémentaire pour l'analyse de l'Hb totale dans de l'hémolysat par couplage HPLC** (colonne échangeuse d'ions) et **ICPMS**. Tout d'abord, une optimisation des conditions de séparation chromatographique est effectuée sur les colonnes d'échange de cations et d'anions. La mise en place du couplage HPLC-ICPMS est réalisée, avec quantification par étalonnage externe et ajouts dosés. Ensuite, le développement de la dilution isotopique d'abord en mode non-spécifique par l'utilisation d'un étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  inorganique puis spécifique grâce à la synthèse et la caractérisation d'un étalon marqué d'Hb enrichi en  $^{57}\text{Fe}$  est effectué.

### 2.1. Réactifs

Tous les réactifs utilisés pour la détermination de l'Hb par HPLC-ICPMS sont regroupés ci-dessous.

L'eau ultra pure est obtenue avec un système Milli-Q<sup>TM</sup> (Millipore, Etats-Unis) et permettant d'avoir une résistivité de  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ .

Des réactifs sont obtenus chez Sigma Aldrich (France) :

- Acétone Chromasolv®, pour HPLC,  $\geq 99,8 \%$  (34850-1L-D)
- Acide 2-(N-morpholino)-éthanosulfonique monohydraté (MES), BioUltra, pour molécules biologiques,  $\geq 99,5\%$
- Acide citrique anhydre (ultra  $\geq 99,5\%$ )
- Acide formique (AF)
- Acide malonique - ReagentPlus®  $\geq 99,5\%$
- Acide trifluoroacétique (TFA), éluant pour LC-MS (40967-10X1mL-F)
- Acide trifluoroacétique (TFA), pour les analyses de séquence de protéines,  $\geq 99,5 \%$  (91699-25mL)
- Anhydrase carbonique I (CA I), provenant d'érythrocytes humains – C4396
- Azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) - ReagentPlus®  $\geq 99,5\%$
- Acétate d'ammonium pour molécules biologiques,  $\geq 98\%$
- C18, gel de silice, 200 – 400 mesh, haute pureté
- Catalase (CAT), provenant de foie bovin – 2000-5000 unités. $\text{mg}^{-1}$  de protéines – C1345
- Dithiothreitol (DTT)
- Hémine, d'origine bovine,  $\geq 90 \%$  (H9039-1G)
- Hémoglobine A<sub>0</sub> d'origine humaine, stabilisée en Fe – poudre lyophilisée – H0267
- Hémoglobine d'origine humaine – poudre lyophilisée – H7379
- Hydrogénophosphate disodium ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), NIST SRM 2186II

- Hydroxyde de sodium, pastilles, 99,998 %
- Iodoacétamide (IAA)
- Protoporphyrine IX,  $\geq 95\%$  (P8293-1G)
- Tris(hydroxyméthyle)aminométhane (Tris), 99.9%

Des réactifs proviennent de chez Merck Millipore (Allemagne) : l'acide acétique (glacial), 100 %, anhydre pour analyse ; la solution d'ammonium à 25 % pour analyse et le peroxyde d' $H_2$  Suprapur (30%).

Les autres réactifs utilisés sont :

- Acétate de sodium trihydraté, min. 98%, GPR RECTAPUR (VWR Chemicals)
- Acétonitrile, pour HPLC (AC Scharlau)
- Acide hydrochlorique Ultrapur (30%, 500 ppt Fe, Fischer Chemicals, Canada)
- Acide nitrique ( $HNO_3$ ), de haute qualité (67-69%, 10 ppt Fe, Fisher chemical, Canada)
- Citrate de sodium (Biology grade, Calbiochem, France)
- Hydrogénophosphate de disodium (186 II, NIST)
- Trypsine, *Trypsin sequence grade modified*, provient de Roche (France).

Le kit utilisé pour l'analyse de l'Hb par spectrophotomètre est Haemodirect®, *Kit for the Quantitative Determination of Blood Haemoglobin Levels* (Medisynthana Diagnostics). La résine chélatante Chelex® 100, 200 – 400 mesh, forme sodium, de grade analytique est fournie par BioRad (France).

Le matériau de référence certifié en Hb totale, servant pour la validation de la méthode, est fourni par ReCCS dans trois niveaux de concentrations (CRM JCCRM 912-1 ; Low, Medium, High; Japon). La préparation d'étalons en Fe est préparée à partir d'un matériau de référence certifié de haute pureté pour le Fe, BNM-001 (LNE,  $(99,995 \pm 0,004) \%$  ( $k=2$ )). Les solutions en étalon marqué  $^{57}Fe$  et  $^{54}Fe$  sont préparées à partir d'un métal enrichi soit en  $^{57}Fe$  soit en  $^{54}Fe$  provenant de chez Eurisotop (Saint Aubin, France) où le métal est digéré avec 2 à 4 % d' $HNO_3$  afin d'obtenir des solutions d'environ  $1000 \mu g \cdot g^{-1} Fe$ .

## 2.2. Préparation des étalons et échantillons

Les solutions étalons sont préparées à partir d'une solution mère d'Hb (H7379) de concentration comprise entre 1 et  $2 g \cdot L^{-1}$  Hb. L'étalon d'Hb utilisé se présente sous forme lyophilisée, ainsi une dilution dans un tampon (10 mM Tris, pH 7,5-8,0) est nécessaire. La concentration est déterminée par gravimétrie ( $d = 0,001 mg$ ). Cette solution mère est préparée pour chaque utilisation.

La préparation de l'étalon en Hb A<sub>0</sub> (H0267) est aussi réalisée dans un tampon (10 mM Tris, pH 7,5-8,0) par gravimétrie ( $d = 0,001 mg$ ).

Le matériau de référence CRM JCCRM 912 certifié en Hb se présente sous la forme d'un flacon d'une contenance de 500  $\mu\text{L}$  stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour chaque niveau de concentration. Afin de limiter les contaminations, cet échantillon est divisé en 12 aliquots d'environ 40  $\mu\text{L}$  chacun dans des tubes Eppendorf LoBind.

Les blancs sont préparés avec la solution tampon utilisée pour toutes les préparations des étalons et des échantillons.

### 2.3. Matériels

La colonne Mono S<sup>TM</sup> 5/50 GL Tricorn<sup>TM</sup> (5x50 mm, 10 $\mu\text{m}$ , GE Healthcare), est une colonne échangeuse de cations de haute performance adaptée pour la séparation des protéines, peptides, poly nucléotides et autres biomolécules. Ses principales caractéristiques sont représentées dans le **Tableau 40**.

**Tableau 40 : Caractéristiques de la colonne Mono S<sup>TM</sup>**

<b>Matrice</b>	Copolymères réticulés : Polystyrène/divinylbenzène
<b>Forme des particules</b>	Rigide, sphérique, monodisperse poreuse
<b>Dimensions de la colonne</b>	5 × 50 mm
<b>Volume de remplissage</b>	1 mL
<b>Capacité moyenne « d'absorption »</b>	50 mg
<b>Gamme de pH</b>	2-12 pour une utilisation régulière 1-14 pour un nettoyage
<b>Température</b>	4 à 40 °C
<b>Débit</b>	0,5 à 3,0 mL/min (maximum 3,0 mL/min)
<b>Pression maximale de la colonne</b>	4 MPa, 40 bar, 580 psi
<b>Type d'échange</b>	Échange fort de cations
<b>Groupement chargé</b>	-CH <sub>2</sub> -SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (sulfonique)
<b>Capacité ionique</b>	0,12 – 0,15 mmol Milieu H <sup>+</sup> /mL

La colonne utilisée est une colonne échangeuse d'anions Source<sup>TM</sup> 15Q 4,6/100 PE (4,6×100 mm, 15 $\mu\text{m}$ , GE Healthcare, Suède) de haute performance pour les protéines, peptides, poly nucléotides et autres biomolécules. Ses principales caractéristiques sont présentées dans le **Tableau 41**.

**Tableau 41 : Caractéristiques de la colonne Source 15Q**

<b>Matrice</b>	Copolymères réticulés : Polystyrène/divinylbenzène
<b>Forme des particules</b>	Rigide, sphérique, monodisperse poreuse
<b>Taille des particules</b>	15 µm
<b>Dimensions de la colonne</b>	4.6 × 100 mm
<b>Volume de remplissage</b>	1,7 mL
<b>Capacité moyenne « d'absorption »</b>	40 mg
<b>Gamme de pH</b>	2-12 pour une utilisation régulière 1-14 pour un nettoyage
<b>Température</b>	4 à 40 °C
<b>Débit</b>	0,5 à 2,5 mL/min (maximum 5,0 mL/min)
<b>Pression maximale de la colonne</b>	4 MPa, 40 bar, 580 psi
<b>Type d'échange</b>	Échange fort d'anions
<b>Groupement chargé</b>	-CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (amine quaternaire)
<b>Capacité ionique</b>	0,09 – 0,15 mmol Gel Cl <sup>-</sup> /mL

Le matériel nécessaire pour la synthèse organique (ballon, réfrigérant, béchers) provient de chez VWR (France). Les tubes à centrifuger de 50 mL en polypropylène ainsi que les tubes à dialyse, Dialyseur Spectra/Por<sup>®</sup> Float-A-Lyser<sup>®</sup> G2 (5 mL, 3,5-5 kDa) sont achetés chez Fisher Scientific. Pour l'ultrafiltration, les tubes Amicon<sup>®</sup> Ultra – 0.5 mL, *centrifugal filters*, Ultracel<sup>®</sup> – 30 K (Merck Millipore) sont utilisés. La plaque chauffante avec agitation magnétique est le modèle HC1202 de la marque Bibby (Merck).

## 2.4. Couplage HPLC-ICPMS

D'un point de vue technique, le couplage HPLC-ICPMS consiste à unir la sortie de la colonne analytique au nébuliseur de l'ICPMS à l'aide d'un tube en PEEK (plastique inerte, diamètre interne de 0,010 mm) de longueur réduite pour éviter des volumes morts et les élargissements des pics chromatographiques. Les limitations de ce couplage proviennent des caractéristiques des phases mobiles. Elles ne doivent pas contenir de solvants organiques (tels que le méthanol ou l'acétonitrile) en trop grande proportion pour ne pas obstruer les cônes par un dépôt de matières organiques qui pourrait entraîner une déstabilisation du plasma ou une dérive du signal. De plus, les concentrations en sels pour les solutions tampons sont également à limiter pour les mêmes raisons (< à 1 g.L<sup>-1</sup>). Pour cela, l'utilisation de tampons volatils est recommandée, comme l'acétate d'ammonium. Les phases mobiles sont filtrées à 0,22 µm avec un système de trompe à eau. Le débit utilisé est de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

La séparation chromatographique est réalisée avec un chromatographe HPLC PDA Surveyor (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis) constituée d'un détecteur UV-VIS à barrette diodes (PDA Surveyor), d'une pompe quaternaire. La boucle d'injection est de 50 µL (en PEEK, Poly-éther-éther-

cétone) et la vanne d'injection est une Rheodyne. La détection est effectuée aux longueurs d'ondes 415 nm (caractéristique du groupe hème), 540 nm et 577 nm (caractéristiques de l'oxy-Hb).

Une deuxième chaîne chromatographique est utilisée, l'HPLC Dionex ICS 5000<sup>+</sup> (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis) qui a la propriété d'être chimiquement inerte (notamment en métaux). Elle est composée d'une pompe haute pression à double piston et d'un détecteur UV-VIS (Dionex Ultimate 3000, RS Variable Wavelength Detector). La boucle d'injection est de 50 µL (en PEEK) et la vanne d'injection est une Rheodyne (en PEEK). Enfin, elle possède un système thermostaté pour le compartiment des colonnes (5–85 °C) ainsi qu'un passeur d'échantillons avec un système de refroidissement (Dionex AS-AP).

L'ICPMS utilisé pour effectuer les analyses est un ICPMS haute résolution ELEMENT XR™ (Thermo Fisher Scientific, Allemagne) dont les caractéristiques ont été présentées dans le paragraphe 1.2. Le **Tableau 42** récapitule les conditions opératoires de l'ICPMS spécifiques au couplage avec l'HPLC. Le mode d'acquisition « chromatographie » correspond à une acquisition de l'intensité (cps) versus le temps (min).

**Tableau 42 : Caractéristiques opératoires de l'ICPMS haute résolution.**

ICPMS	ELEMENT XR™ HR ICPMS
<b>Puissance</b>	1 550 W
<b>Débit gaz auxiliaire</b>	0,8 L.min <sup>-1</sup>
<b>Débit gaz vecteur</b>	1,00 – 1,10 L.min <sup>-1</sup>
<b>Résolution</b>	Moyenne résolution (m/Δm = 4500)
<b>Mode d'acquisition</b>	Chromatographie
<b>Type d'intégration</b>	Haut du pic
<b>Isotopes mesurés</b>	<sup>56</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe
<b>Temps d'intégration/point</b>	0,05 s
<b>Nombre de points/pic</b>	20
<b>Nombre de balayage</b>	15
<b>Répétition</b>	5

Les pompes péristaltiques utilisées sont la Minipuls (Gilson, Etats-Unis) et la Perimax® (Spetec, Allemagne).

## 2.5. Optimisation de la séparation de l'Hb

Dans ce travail, deux types de mécanismes ont été utilisés pour séparer l'Hb totale dans de l'hémolysat : échange de cations et échange d'anions. En effet, une attention extrême doit être requise pour préserver la structure de composition et de coordination de la protéine native contenant le métal durant toute la procédure d'analyse. Ces types de mécanismes d'échange d'ions permettent de s'assurer de la conservation de la liaison métal-protéine contrairement à l'utilisation de la chromatographie de phase inverse. De plus, la molécule d'Hb possède la caractéristique d'être sous forme cationique ou anionique selon le pH.

L'objectif est d'optimiser la **méthode de séparation par colonne d'échange de cations et par colonne d'échange d'anions pour l'analyse de l'Hb**. Pour cela, trois axes majeurs seront considérés :

- la minimisation de la quantité de Fe dans les phases mobiles,
- la minimisation du bruit de fond,
- l'évaluation de l'influence d'autres espèces (catalase, anhydrase carbonique) que l'Hb sur la séparation.

### 2.5.1. Mécanisme d'échange de cations

Le principe de séparation de la colonne échangeuse de cations se déroule en 4 phases. La première étape consiste à équilibrer la phase stationnaire avec la phase mobile (Phase A). Lorsque l'équilibre est atteint, la phase stationnaire chargée négativement est associée à des contre-ions chargés positivement contenus dans la phase mobile. La deuxième étape consiste à introduire l'échantillon. Le but est de permettre à la molécule cible de se lier à la phase stationnaire et d'éliminer tout ce qui n'est pas lié. Le tampon utilisé pour diluer l'échantillon doit avoir le même pH et la même force ionique que la phase mobile initiale afin de lier les protéines chargées de manière appropriée. La troisième étape correspond à celle de l'éluion. Les espèces retenues par la colonne sont éluées grâce à un changement de phase mobile (Phase B). La principale différence entre les phases mobiles A et B est l'augmentation de la concentration en sel dans la phase mobile B afin d'élever la force ionique. Les protéines sont éluées en fonction de leur nombre de charges. Enfin, la quatrième et dernière étape consiste à régénérer la colonne afin d'éliminer toutes les molécules qui peuvent être encore liées à la phase stationnaire.

#### 2.5.1.1. Optimisation de la méthode de séparation par colonne d'échange de cations

Le choix de la phase mobile est dépendant du type de colonne, des espèces à séparer, du pH du milieu et des contraintes de détection. Les phases mobiles pour ce type d'application possèdent une

forte teneur en sels ( $\text{Na}^+$ ). A partir des exemples de séparation chromatographique par colonne d'échange de cations présentés dans le **Tableau 14** (Chapitre 1), on observe que la colonne Mono S est, dans la grande majorité, utilisée avec des phases mobiles constituées de malonate de sodium afin de déterminer l'Hb A<sub>1C</sub>. Cependant d'autres phases mobiles contenant du phosphate de potassium ou du Bis-Tris peuvent être utilisées. La séparation de la protéine se fait en utilisant un gradient (soit la force ionique est augmentée, soit le pH est modifié) qui permet d'éluer la protéine d'intérêt dans un temps minimum. Pour la détection dans le domaine visible la longueur d'onde généralement utilisée est celle de 415 nm, caractéristique du groupement hème. Manjula et *al.* mentionnent une autre longueur d'onde pour la détection de l'Hb A de 540 nm qui est caractéristique de l'oxy-Hb [201].

Dans ce travail, plusieurs phases mobiles ont été testées (acide malonique, Tris, phosphate, MES) afin de choisir la plus adaptée pour la séparation de l'Hb totale. Étant donné que l'objectif est de coupler la séparation chromatographique avec une détection du Fe par ICPMS, il est important de s'assurer que la quantité de Fe contenue dans chaque phase mobile soit la plus faible possible. Pour cela, une gamme d'étalonnage en Fe inorganique de haute pureté (BNM-001) de 0,2 à 15  $\mu\text{g.L}^{-1}$  Fe est réalisée. Les phases mobiles sont toutes préparées à une concentration de 20  $\text{mmol.L}^{-1}$ . Tous les échantillons sont analysés par ICPMS (en mode classique). Le **Tableau 43** regroupe les teneurs en Fe obtenues pour les quatre phases mobiles choisies.

**Tableau 43 : Résultats de l'évaluation de la teneur en Fe de phases mobiles par étalonnage externe.**

Phase mobile	Concentration en Fe ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
Acide malonique	5
Phosphate	5
Tris	< 0,2
MES	< 0,2

À la vue de ces résultats, dans un premier temps les phases mobiles contenant du Tris et du MES ont été retenues car la quantité de Fe initialement présente est la plus faible. Deux couples de phases mobiles ont ainsi été réalisés :

- Phase A : 20 mM Tris, pH 6,0 (pH ajusté avec  $\text{NH}_3$ )
- Phase B : Phase A + 300 mM d'acétate d'ammonium, pH 6,0 (pH ajusté avec HAc)
- Phase A : 20 mM MES, pH 6,0 (ajusté avec  $\text{NH}_3$ )
- Phase B : Phase A + 300 mM d'acétate d'ammonium, pH 6,0 (pH ajusté avec HAc)

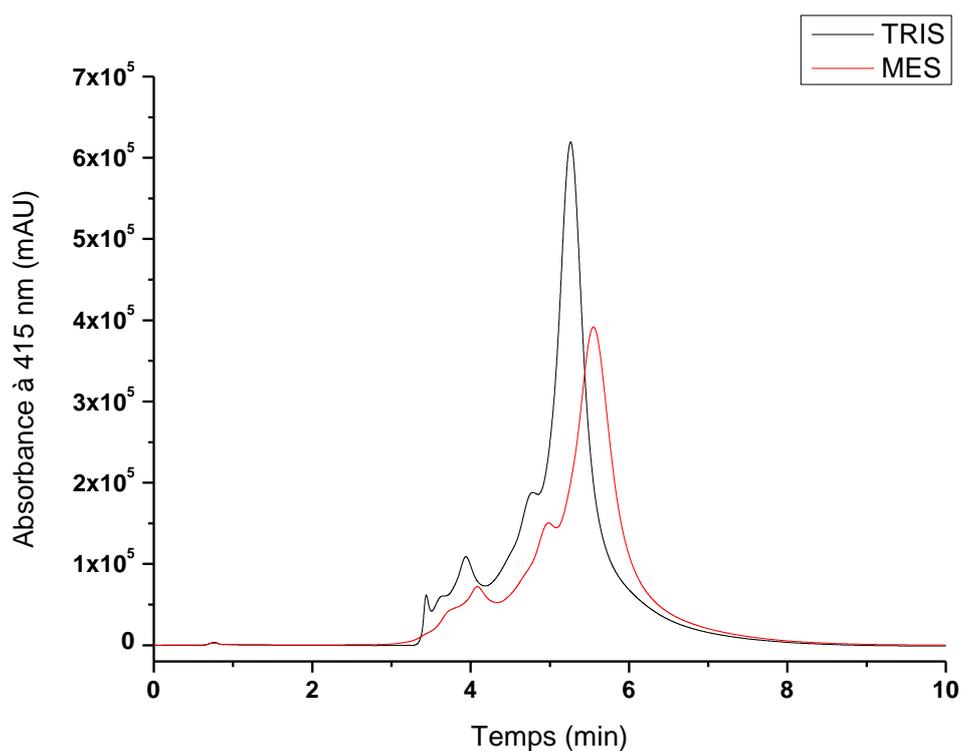
Il est également important que la concentration en sels dissous soit inférieure à 1 % afin d'éviter des dépressions ou augmentations du signal de l'ICPMS, ainsi que des obstructions de nébuliseur et/ou du cône échantillonneur [202]. Des phases mobiles alternatives doivent donc être utilisées comme par exemple les sels d'ammonium qui sont volatils à faible pression [203]. Ainsi, le NaCl ou le LiCl, généralement utilisés dans la préparation des phases mobiles, ont été remplacés par

l'utilisation d'acétate d'ammonium. Un pH de 6,0 a été choisi pour que la molécule se trouve principalement sous forme cationique étant donné que le pHi de l'Hb est de 6,81.

Pour chaque couple de phases mobiles, une optimisation du gradient a été effectuée en utilisant une solution d'étalon d'Hb (H7379) à  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Le débit est de  $1 \text{ mL.min}^{-1}$  et la détection est réalisée à 415nm. Les gradients optimisés sont identiques pour les deux couples de phases mobiles :

- 0 min : 10% B
- 0 à 1,5 min : 10 à 75% B
- 1,5 à 3 min : 75 à 100% B
- 3 à 10 min : 100 à 0% B

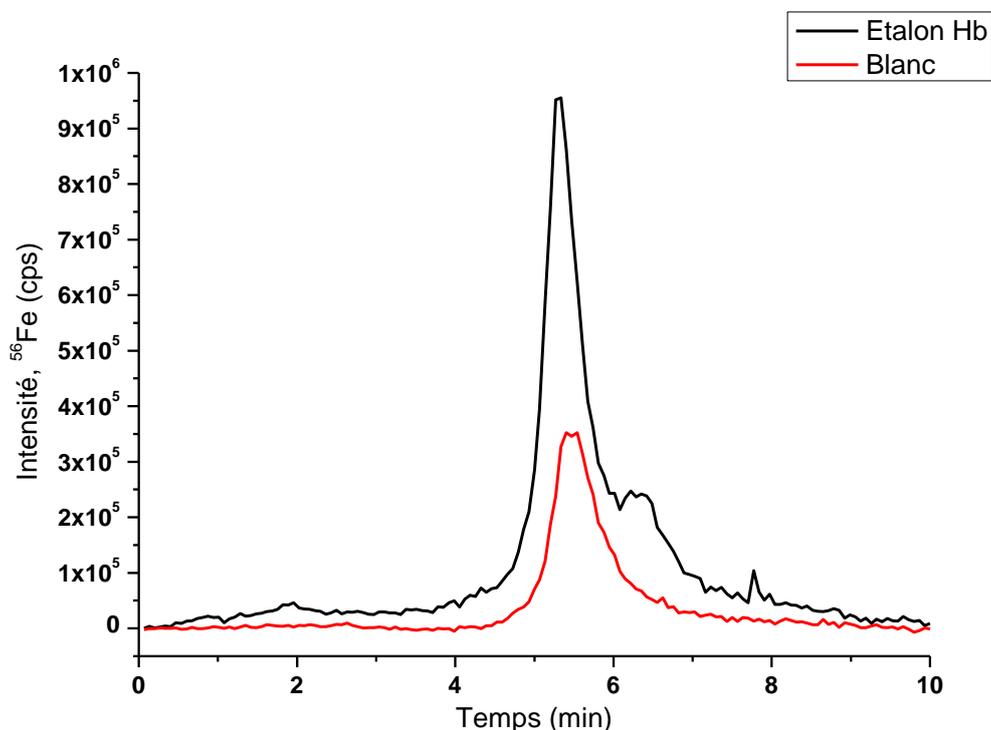
Les chromatogrammes obtenus avec les différentes phases mobiles et les gradients optimisés sont représentés dans la **Figure 43**. Ces deux profils chromatographiques sont très similaires et les pics d'intensité maximum sont élués à 5,26 min pour la phase mobile contenant le Tris et à 5,54 min pour la phase mobile contenant le MES.



**Figure 43 : Chromatogrammes d'une solution étalon d'Hb à  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  avec une colonne Mono S, deux phases mobiles différentes et une détection à 415 nm.**

Après optimisation de la séparation en utilisant la détection par spectrophotométrie à 415nm, il convient de s'assurer de la faisabilité du couplage avec l'ICPMS. Des essais sont ainsi réalisés en analysant des blancs de réactifs (constitués de solution tampon) ainsi que des échantillons de solution étalon d'Hb de concentration comprise entre 0,1 et  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  Hb en utilisant le gradient optimisé et les conditions instrumentales du **Tableau 42**. Grâce à ces essais, un problème dans l'analyse de blanc est

observé. En effet, quelles que soient les phases mobiles utilisées, la teneur du blanc en Fe représente plus de 50% de l'échantillon malgré plusieurs rinçages de la colonne (voir **Figure 44**). Les phases mobiles contenant du Tris et du MES ne seront donc pas retenues.



**Figure 44 : Chromatogrammes d'une solution étalon d'Hb à  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  et d'un blanc par Mono S – ICPMS et une phase mobile constituée de TRIS.**

Les deux autres phases mobiles généralement utilisées pour la séparation sont constituées d'acide malonique ou de phosphate. Cependant, la teneur en Fe dans la solution phosphate étant supérieure à celle obtenue pour la solution d'acide malonique, ce dernier semble le plus adapté pour notre séparation. Après différents tests de concentration, les phases mobiles retenues sont composées de :

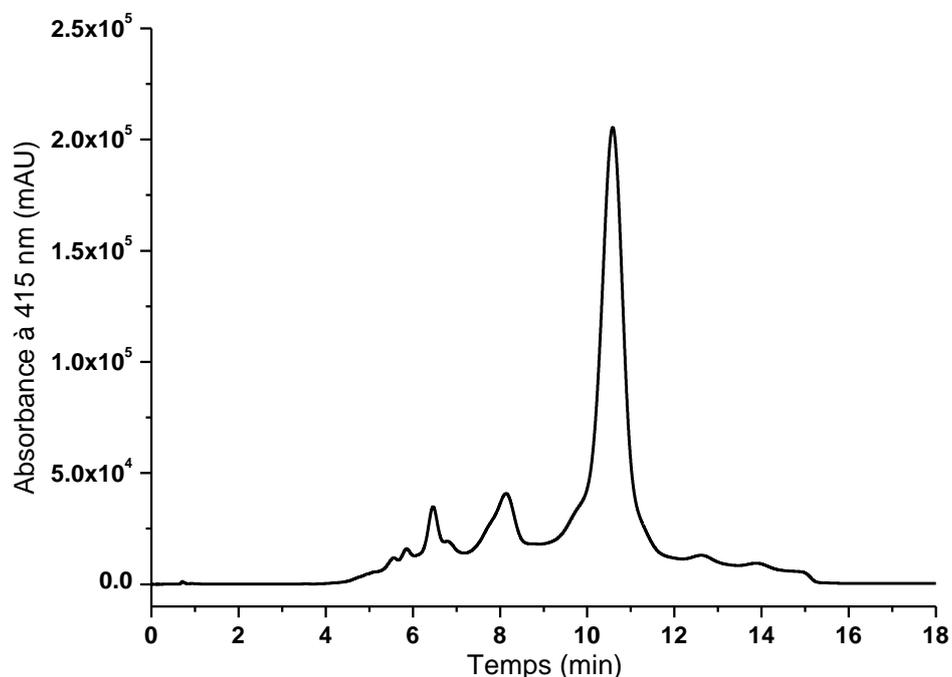
- Phase A : 10 mM acide malonique, pH 5,7 (pH ajusté avec  $\text{NH}_3$ )
- Phase B : Phase A + 300 mM d'acétate d'ammonium

Le gradient obtenu après optimisation est:

- 0 min : 0% B
- 0 à 4 min : 0 à 60% B
- 4 à 8 min : 60 à 75% B
- 8 à 13 min : 75 à 100% B
- 13.01 à 18 min : 100 à 0% B

L'optimisation est effectuée avec une solution étalon d'Hb à  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  et un débit de  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ , toujours à 415 nm. Le chromatogramme obtenu avec les phases mobiles d'acide malonique et le gradient optimisé est représenté dans la **Figure 45**. Le profil chromatographique est

différent de celui obtenu avec les deux autres phases mobiles car le gradient est plus long (18 min contre 10 min) ainsi les espèces sont éluées plus lentement. Le pic d'intensité maximum est élué à 10,6 min.



**Figure 45 : Chromatogramme d'une solution étalon d'Hb à 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> obtenu avec une colonne Mono S à 415 nm.**

Pour s'assurer également que la détection par ICPMS est correcte, une solution étalon d'Hb à 0,5 mg/mL ainsi que des solutions de blanc sont analysées. La **Figure 46** représente les chromatogrammes obtenus après séparation par colonne Mono S et détection du <sup>56</sup>Fe par ICPMS. Les profils chromatographiques sont identiques avec une détection VIS à 415 nm et par ICPMS sur <sup>56</sup>Fe. Ceci permet de confirmer que toutes les espèces présentes dans l'étalon d'Hb correspondent à différents variants d'Hb. D'autre part, la présence d'un bruit de fond dû à la phase mobile est observée dans l'échantillon et le blanc, cependant il n'y a pas de présence de pic résiduel comme avec les autres phases mobiles.

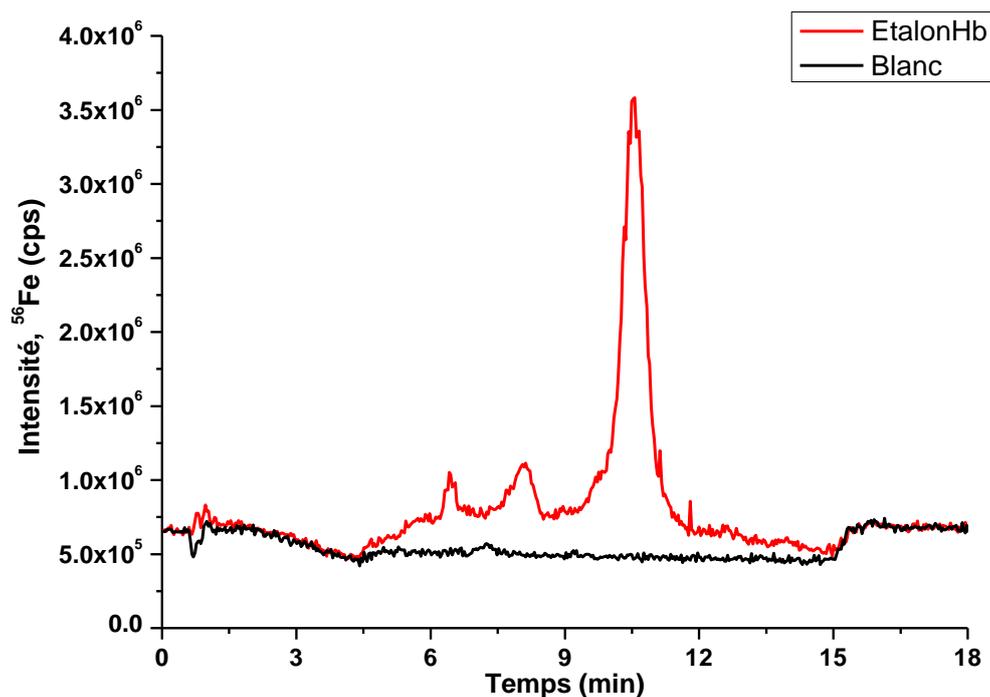
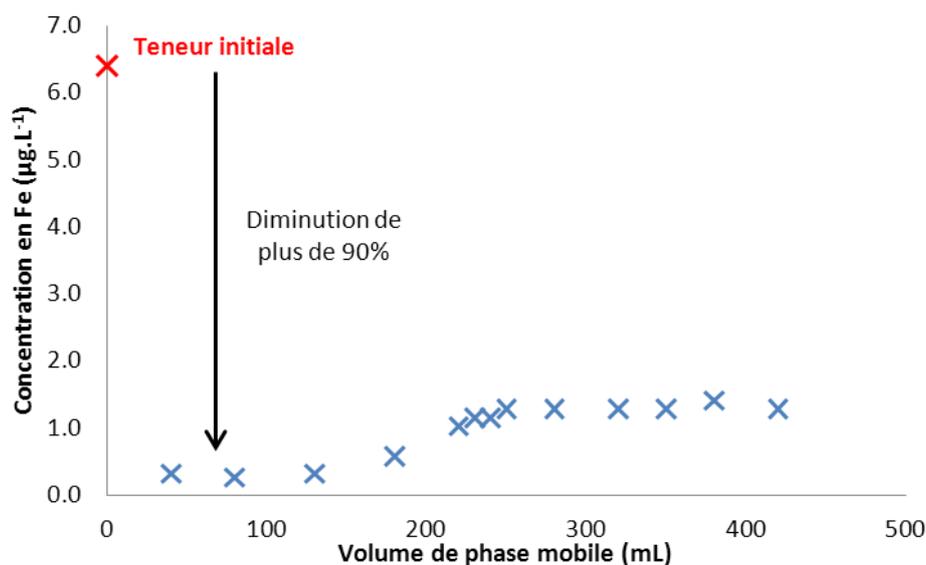


Figure 46 : Chromatogrammes d'une solution étalon d'Hb à  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  et d'un blanc (eau ultra pure) obtenus après séparation par colonne Mono S en détectant le  $^{56}\text{Fe}$  par ICPMS.

Il est apparu nécessaire de trouver une méthode permettant de diminuer au maximum le bruit de fond par conséquent la quantité de Fe présente dans la phase mobile. La **résine Chelex** est choisie pour retenir la grande majorité du Fe contenu dans les phases mobiles [204]. En effet, c'est une résine chélatante échangeuse d'ions ayant une forte préférence pour le Cu, le Fe et autres métaux lourds ainsi que des cations monovalents tels que le Na et le K. Elle est composée de copolymères de styrène et de divinylbenzène contenant des ions iminodiacétate qui agissent comme des groupes chélateurs pour lier les ions métalliques. De plus, autour de pH 5,0, la résine Chelex a une forte sélectivité pour le  $\text{Fe}^{2+}$ . Avant l'utilisation de cette résine Chelex, une étape de purification est nécessaire [205] (voir Annexe 3).

Un premier essai en batch est effectué en ajoutant directement la résine dans la phase mobile. Environ 5 g de Chelex sont ajoutés pour 100 mL de phase mobile puis le mélange est mis sous agitation pendant 2h et filtré sur filtre de nitrocellulose de taille de pore de  $0,22 \mu\text{m}$ . Cependant, il n'y a eu aucun impact positif sur la teneur en Fe de la phase mobile.

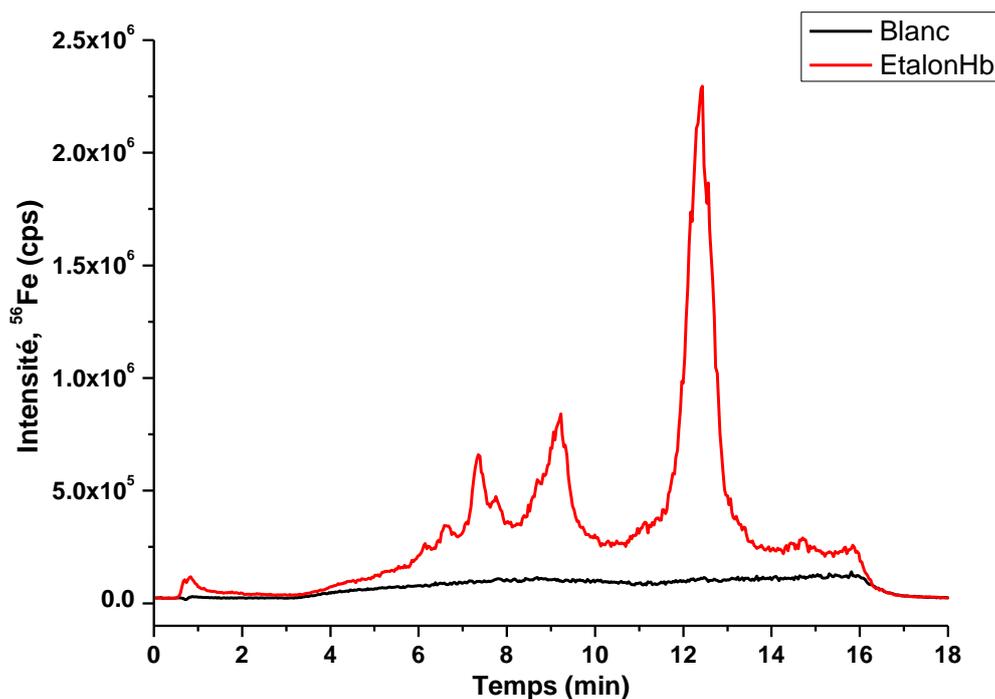
Un deuxième essai sur colonne ( $4 \times 250 \text{ mm}$ ) de résine Chelex est également conduit en faisant percoler la phase mobile A et en collectant différentes fractions. Ces fractions sont analysées par ICPMS afin de déterminer leur teneur en Fe. La **Figure 47** présente les résultats obtenus pour les fractions de phase mobile.



**Figure 47 : Teneur en fer des différentes fractions de phase mobile A purifiée après élution dans la colonne Chelex.**

Ces résultats montrent que la colonne Chelex permet de diminuer la concentration en Fe dans la phase mobile A de plus de 90 %. La concentration initiale d'environ  $6,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  Fe diminue à  $\approx 0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  Fe durant les 200 premiers millilitres élués. Un deuxième plateau est observé pour des volumes compris entre 200 et 420 mL où la teneur en Fe est d'environ  $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  Fe. La colonne Chelex montre une efficacité de rétention du Fe pour des volumes importants. Cependant, pour régénérer la colonne Chelex, il est nécessaire de la rincer avec une solution à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  d' $\text{HNO}_3$  pendant 3h à un débit de  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ . Cette colonne est installée en amont de la colonne Mono S pour effectuer la filtration de la phase mobile avant l'injection de l'échantillon. Cependant, le temps de rétention n'est pas stable et il diminue au fur et à mesure de la séquence d'analyse. Ceci s'explique par la modification du pH des phases mobiles après leur passage dans la colonne Chelex. En effet, le pH initial est de 5,7 et une perte de deux unités pH pour la phase A et d'une unité pH pour la phase B est observée après le passage dans la colonne Chelex.

Un troisième essai est réalisé en remplissant une nouvelle colonne de même dimension que celle précédemment utilisée mais un remplissage constitué d'un mélange de résine Chelex et de gel de silice greffée avec des groupements C18. L'efficacité de cette colonne mixte est la même que celle obtenue avec la colonne remplie uniquement de résine Chelex. La **Figure 48** représente les profils chromatographiques obtenus avec l'utilisation de la colonne Chelex/C18 en amont de la colonne Mono S après une détection par ICPMS. L'objectif de diminuer la ligne de base est atteint grâce à cette colonne préparée avec de la résine Chelex et de la silice C18.



**Figure 48 : Chromatogrammes d'une solution étalon d'Hb à  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  et d'un blanc (eau ultra pure) obtenus après filtration des phases mobiles en amont de la séparation par colonne Mono S et détection du  $^{56}\text{Fe}$  par ICPMS.**

Un dernier essai consiste à filtrer au préalable et non plus en ligne les deux phases mobiles sur la colonne Chelex/C18 avant les analyses et d'en ajuster le pH. Cette méthode permet de s'assurer que le pH est stable ainsi que de contrôler la concentration en Fe des phases mobiles. La teneur en Fe dans le bruit de fond reste identique à celle observée en couplant la colonne Chelex/C18 couplée à la colonne Mono S.

L'optimisation de la méthode de séparation par colonne échangeuse de cations (Mono S) permet d'obtenir les conditions finales présentées dans le Tableau 44. Les phases mobiles contiennent de l'acide malonique et de l'acétate d'ammonium et le gradient utilisé est de 18 min. Une filtration des phases mobiles avec la colonne composée de Chelex et de C18 est effectuée au préalable et le pH est ajusté à 5,7. La méthode peut ainsi être évaluée en étudiant ses performances analytiques.

**Tableau 44 : Conditions analytiques de la séparation chromatographique**

<b>Phases mobiles</b>	Phase A : 10 mM acide malonique, pH 5,7 (pH ajusté avec $\text{NH}_3$ ) Phase B : Phase A + 300 mM d'acétate d'ammonium
<b>Colonne de filtration</b>	50 % Chelex - 50 % C18
<b>Gradient</b>	0 min : 0% B 0 à 4 min : 0 à 60% B 4 à 8 min : 60 à 75% B 8 à 13 min : 75 à 100% B 13.01 à 18 min : 100 à 0% B

### 2.5.1.2. Performances analytiques de la méthode par colonne d'échange de cations

Une fois la méthode de séparation optimisée, ses performances analytiques sont étudiées. Pour cela, des gammes d'étalonnage en étalon d'Hb (H7379) sont analysées et répétées sur trois jours différents ( $p=3$ ) avec trois injections de chaque étalon par jour. La gamme d'étalonnage est préparée pour chaque jour d'analyse. La gamme de travail a été validée de 0,1 à 0,5 g.L<sup>-1</sup> Hb. La linéarité ainsi que les limites de détection (LD) et les limites de quantification (LQ) sont évaluées par analyse sur l'isotope 56 du Fe par détection ICPMS et à 415 nm par détection VISIBLE.

La détermination des LD peut s'effectuer par diverses méthodes de calcul. Ces méthodes se basent sur l'écart-type de la réponse et sur la pente [206]. Différents écarts-types peuvent être pris en compte pour le calcul :

- l'écart-type de la réponse de blancs,
- l'écart-type résiduel de la régression linéaire,
- l'écart-type de l'ordonnée à l'origine de la régression linéaire.

Dans ce travail, l'écart-type de l'ordonnée à l'origine a été choisi pour calculer la LD dont l'équation de calcul est indiquée ci-dessous [206]:

$$LD = \frac{t s(b_0)}{b_1} \quad \text{Équation 31}$$

Avec :

- $t$  : le coefficient de Student, pris pour un intervalle de confiance de 95 %
- $s(b_0)$  : l'écart type de l'ordonnée à l'origine obtenu sur  $n$  mesures
- $b_1$  : la pente obtenue par l'analyse d'une gamme d'étalonnage en utilisant les aires de pics

Les LD obtenues par ICPMS et VISIBLE sont respectivement de 18 mg.L<sup>-1</sup> Hb et 22 mg.L<sup>-1</sup> Hb. Chaque LD a été validée par l'analyse d'un étalon à une concentration égale à sa valeur et la vérification de l'obtention des aires de pic significativement différentes de la ligne de base.

La LQ est basée sur le même principe de calcul que la LD ainsi les différents écarts-types peuvent être pris en compte. Comme pour la LD, l'écart-type de l'ordonnée à l'origine est utilisé [206]. L'équation 32 montre le calcul effectué.

$$LQ = \frac{10 s(b_0)}{b_1} \quad \text{Équation 32}$$

Les LQ obtenues par ICPMS et VISIBLE sont respectivement de 59 mg.L<sup>-1</sup> Hb et 75 mg.L<sup>-1</sup> Hb.

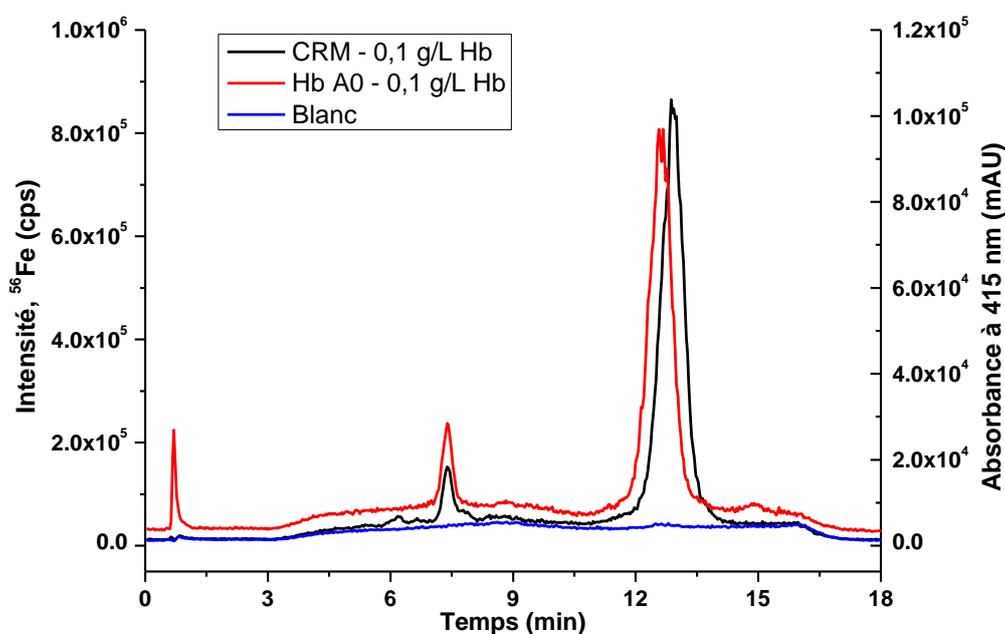
Le **Tableau 45** regroupe les différents paramètres étudiés pour l'évaluation des performances analytiques de la séparation pour 50 µL d'échantillon injecté. La linéarité est évaluée en calculant le coefficient de détermination ( $R^2$ ). Ce coefficient est supérieur à 0,99 pour les types de détection ce qui est satisfaisant. La précision de mesure sur les temps de rétention est inférieure à 1 % intra et inter

jours quel que soit le mode de détection. En effet, sur une même journée (intra-journalière) la précision du temps de rétention est de 0,5 % en ICPMS tandis que sur différents jours (inter-journalière), elle est égale à 0,7 %. Une différence de l'ordre de 1 % est observée pour la précision des aires de pics par détection ICPMS ( $\approx 2,6$  %) et VISIBLE ( $\approx 3,5$  %) mais, les résultats restent inférieurs à 4 % ce qui est satisfaisant.

**Tableau 45 : Performances analytiques pour la séparation avec échange de cations par détection ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ) et VISIBLE (415nm).**

	ICPMS, $^{56}\text{Fe}$	VISIBLE, 415 nm
<b>Gamme de travail</b>	0,1 à 0,5 g.L <sup>-1</sup> Hb	
<b>Linéarité</b>	R <sup>2</sup> = 0,9912	R <sup>2</sup> = 0,9910
<b>LD (mg.L<sup>-1</sup> Hb)</b>	18	22
<b>LQ (mg.L<sup>-1</sup> Hb)</b>	59	75
<b>Précision (intra jour)</b>		
- Temps de rétention	0,5 %	0,4 %
- Aire des pics	2,4 %	3,4 %
<b>Précision (inter jour)</b>		
- Temps de rétention	0,7 %	0,6 %
- Aire des pics	2,7 %	3,5 %

La **Figure 49** représente des exemples d'applications de la méthode développée sur des échantillons d'hémolysat (le CRM JCCRM 912-1L) et d'étalon en Hb A<sub>0</sub> (H0267) pour des concentrations de l'ordre 0,1 g.L<sup>-1</sup> d'Hb et en utilisant les deux modes de détection (ICPMS et VISIBLE).



**Figure 49 : Chromatogrammes obtenus par chromatographie d'échange de cations d'un matériau d'hémolysat certifié en Hb et d'un étalon d'Hb A<sub>0</sub>.**

**La méthode chromatographique par échange de cations montre des performances analytiques intéressantes et sensiblement plus satisfaisantes pour la détection par ICPMS (meilleures LD et LQ). Cependant, la nécessité de filtrer les phases mobiles avant la séparation chromatographique implique des sources d'erreurs potentielles.**

### **2.5.2. Mécanisme d'échange d'anions**

L'Hb étant une protéine, elle a donc la capacité à former des résidus chargés positivement ou négativement. Cette particularité nous permet de pouvoir utiliser les deux mécanismes de chromatographie à échange d'ions (d'anions et de cations). Ainsi, la chromatographie échangeuse d'anions est aussi développée pour la détermination de l'Hb totale.

Le principe de séparation est identique à celui de la colonne échangeuse de cations présenté dans le paragraphe 2.5.1. La seule différence se trouve dans la première étape où lorsque l'équilibre est atteint, la phase stationnaire chargée positivement est associée à des contre-ions chargés négativement contenus dans la phase mobile.

#### **2.5.2.1. Optimisation de la méthode de séparation par colonne d'échange d'anions**

Les phases mobiles généralement utilisées pour l'analyse de l'Hb par colonne échangeuse d'anions sont constituées de TRIS comme le montre le **Tableau 15** du Chapitre 1. Les concentrations varient de 10 à 50 mmol.L<sup>-1</sup> et le pH est compris entre 7,0 et 8,6. La séparation s'effectue en utilisant des gradients où soit la force ionique augmente soit le pH évolue. La détection par VISIBLE utilise un plus grand nombre de longueurs d'ondes lorsqu'on utilise la chromatographie pour purifier un échantillon. Cependant, la longueur d'ondes de 415 nm reste toujours présente dans ce type d'analyse mais d'autres longueurs d'ondes sont utilisées car l'objectif est de purifier l'Hb donc de détecter toutes les espèces pouvant présentes dans l'échantillon.

La colonne utilisée pour la chromatographie d'échange d'anions afin de séparer l'Hb est la Source™ 15Q 4.6/100 PE. Dans un premier temps, différents essais de concentrations et de pH de phases mobiles ont été réalisés. Dans chaque cas, le composé TRIS est utilisé pour préparer les phases mobiles ainsi que l'acétate d'ammonium comme contre-ion. Le pH est testé sur une gamme de 7,0 à 8,5 qui est optimale pour l'utilisation du TRIS. Le pH de 8,0 est retenu pour une bonne élution de la molécule cible, l'Hb car son pHi est inférieur à 8,0 (6,81). La concentration en TRIS est ajustée de 10 à 50 mmol.L<sup>-1</sup> ainsi que la teneur en sel d'ammonium (de 200 à 500 mmol.L<sup>-1</sup>). Les phases mobiles utilisées sont :

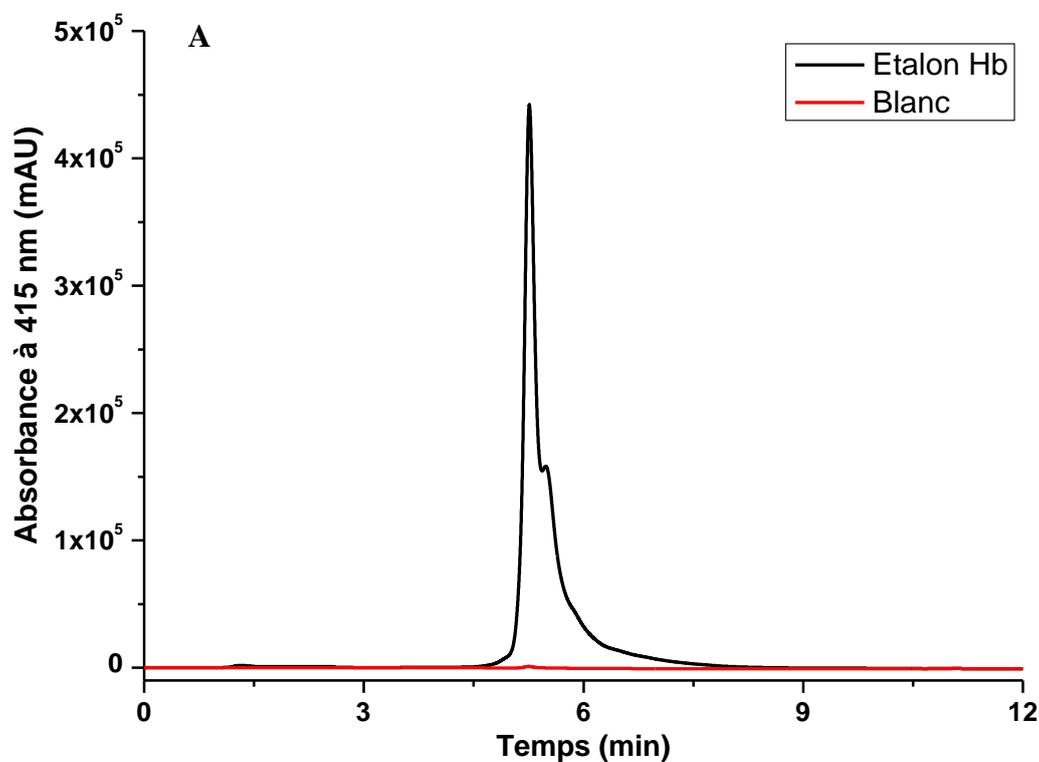
- Phase A : 10 mM Tris, 0,2 g/L NaN<sub>3</sub>, pH 8,0 (pH ajusté avec HAc)
- Phase B : Phase A + 500 mM d'acétate d'ammonium

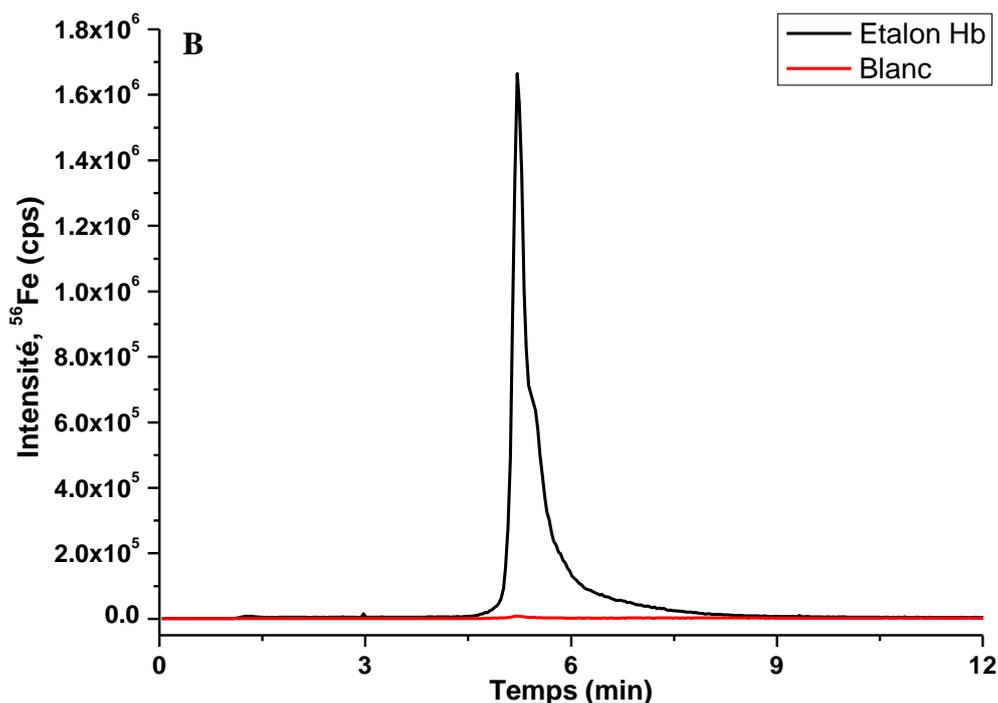
L'utilisation d'acétate d'ammonium comme contre-ion à la place du NaCl est choisie afin de limiter l'apport en sels dissous dans l'ICPMS. L'azoture de sodium (NaN<sub>3</sub>) est un biocide permettant,

notamment, d'éviter le développement bactérien dans des solutions. Dans un second temps, le gradient est optimisé pour une séparation optimale de la molécule d'Hb. Le gradient obtenu après optimisation est:

- 0 à 2 min : 0% B
- 2 à 9 min : 0 à 100% B
- 9 à 16 min : 100% B
- 16.01 à 21 min : 100 à 0% B

La **Figure 50** montre le profil chromatographique d'une solution étalon d'Hb à  $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$  obtenue à partir des conditions optimisées ci-dessus. La détection par VISIBLE intervient à une longueur d'onde de 415 nm et la détection élémentaire est réalisée par ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ). Le débit utilisé est de  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ .





**Figure 50 : Chromatogramme d'une solution étalon d'Hb à 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> obtenu avec une colonne Source 15 Q par détection VISIBLE à 415 nm (A) et par détection ICPMS pour le <sup>56</sup>Fe (B).**

Le profil chromatographique de l'étalon d'Hb montre un large pic avec un léger décolllement signifiant la présence d'un autre variant d'Hb. Malgré ce petit épaulement de pic, ce profil est cependant plus adapté que celui obtenu avec la colonne échangeuse de cations puisque l'objectif est d'analyser et de quantifier l'Hb totale (donc tous les variants de l'Hb). Le profil est identique quel que soit le mode de détection utilisé (VISIBLE ou ICPMS). Le temps de rétention du pic d'intérêt est compris entre 5,2 et 5,3 min.

L'optimisation de la méthode de séparation par colonne échangeuse d'anions (Source 15Q) conduit aux conditions finales présentées dans le Tableau 46. Les phases mobiles contiennent du TRIS et de l'acétate d'ammonium pour un pH de 8,0 et le gradient utilisé est de 21 min. Cette séparation présente l'avantage de ne pas utiliser de colonne de filtration pour les phases mobiles. De plus, les blancs obtenus ont une ligne de base faible en Fe (inférieure à 500 mAU et à 10000 cps). La méthode peut ainsi être évaluée en étudiant ses performances analytiques.

**Tableau 46 : Conditions analytiques de la séparation chromatographique.**

<b>Phases mobiles</b>	Phase A : 10 mM Tris, 0,2 g/L NaN <sub>3</sub> , pH 8,0 (pH ajusté avec NH <sub>3</sub> ) Phase B : Phase A + 500 mM d'acétate d'ammonium
<b>Gradient</b>	0 à 2 min : 0% B 2 à 9 min : 0 à 100% B 9 à 16 min : 100% B 16,01 à 21 min : 100 à 0% B

### 2.5.2.2. Performances analytiques de la méthode par colonne d'échange d'anions

La méthode de séparation optimisée, ses performances analytiques sont étudiées, à partir de l'analyse de solutions d'étalon d'Hb par ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ) et par détection VISIBLE (415 nm). Pour cela, des gammes d'étalonnage en Hb sont analysées et répétées sur trois jours différents et chaque étalon est injecté trois fois durant la même journée. La LD et la LQ sont calculées de manière identique au paragraphe 2.5.1.2 qui correspond aux performances analytiques pour la colonne par échange de cations. Les LD obtenues par ICPMS et VISIBLE sont respectivement de  $9 \text{ mg.L}^{-1}$  Hb et  $8 \text{ mg.L}^{-1}$  Hb. Chaque LD a été validée par l'analyse d'un étalon à une concentration égale à sa valeur et la vérification de l'obtention des aires de pic significativement différentes de la ligne de base. Les LQ obtenues par ICPMS et VISIBLE sont respectivement de  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  Hb et  $25 \text{ mg.L}^{-1}$  Hb.

Le **Tableau 47** regroupe les différents paramètres étudiés pour l'évaluation des performances analytiques de la séparation pour  $50 \mu\text{L}$  d'échantillon injecté. Le coefficient de détermination est supérieur à 0,99 pour les types de détection ce qui est satisfaisant. La précision de mesures sur les temps de rétention est inférieure à 1 % intra et inter jours quel que soit le mode de détection. Pour la détection par ICPMS, la précision sur le temps de rétention sur une même journée est de 0,2 % et sur des jours différents, elle est égale à 0,9 %. Les résultats restent inférieurs à 5 % ce qui est correct pour la précision des aires de pics par détection ICPMS et VISIBLE.

**Tableau 47 : Performances analytiques pour la séparation avec échange d'anions par détection ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ) et VISIBLE (415nm).**

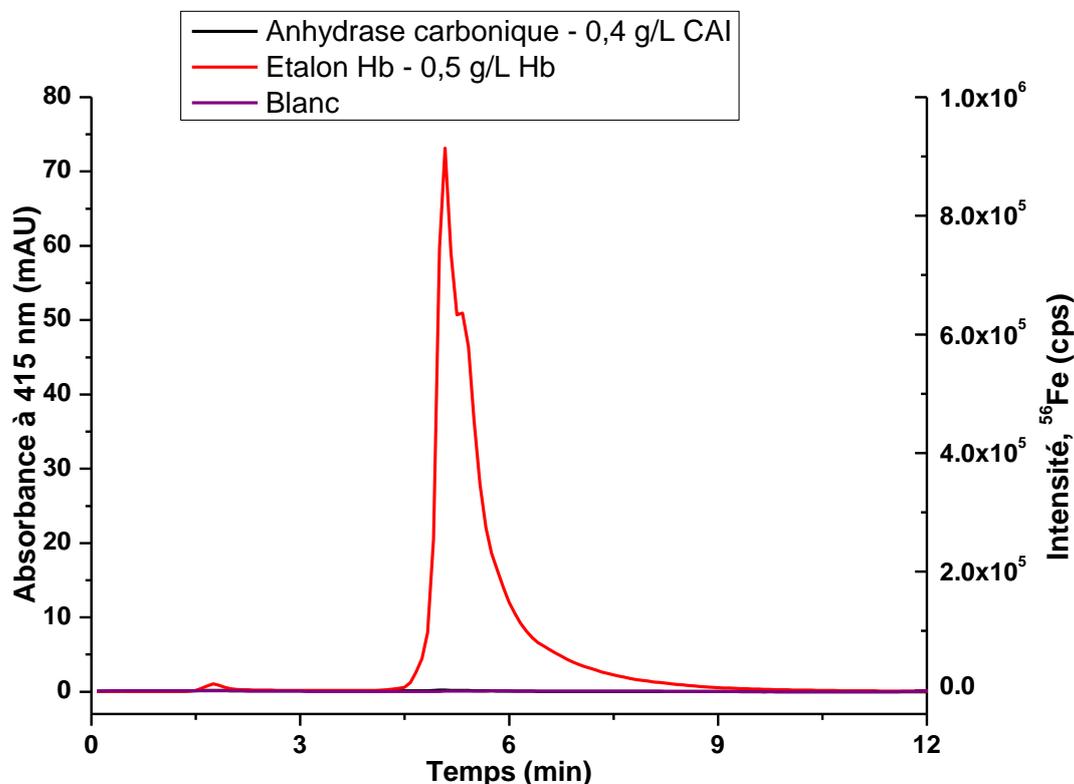
	ICPMS, $^{56}\text{Fe}$	VISIBLE, 415 nm
<b>Gamme de travail</b>	0,05 à 0,5 $\text{g.L}^{-1}$ Hb	
<b>Linéarité</b>	$R^2 = 0,9942$	$R^2 = 0,9970$
<b>LD (<math>\text{mg.L}^{-1}</math> Hb)</b>	9	8
<b>LQ (<math>\text{mg.L}^{-1}</math> Hb)</b>	30	25
<b>Précision (intra jour)</b>		
- Temps de rétention	0,2 %	0,1 %
- Aire des pics	3,7 %	2,4 %
<b>Précision (inter jour)</b>		
- Temps de rétention	0,9 %	0,9 %
- Aire des pics	4,0 %	4,5 %

La méthode chromatographique par échange d'anions montre des performances analytiques intéressantes et identiques pour les deux types de détection. Ces performances sont plus satisfaisantes (LQ et LD plus faibles) que celles obtenues avec la chromatographie d'échange de cations. Cela peut s'expliquer notamment par la diminution du bruit de fond en Fe et l'élution de la protéine sous un seul pic.

### 2.5.3. Spécificité

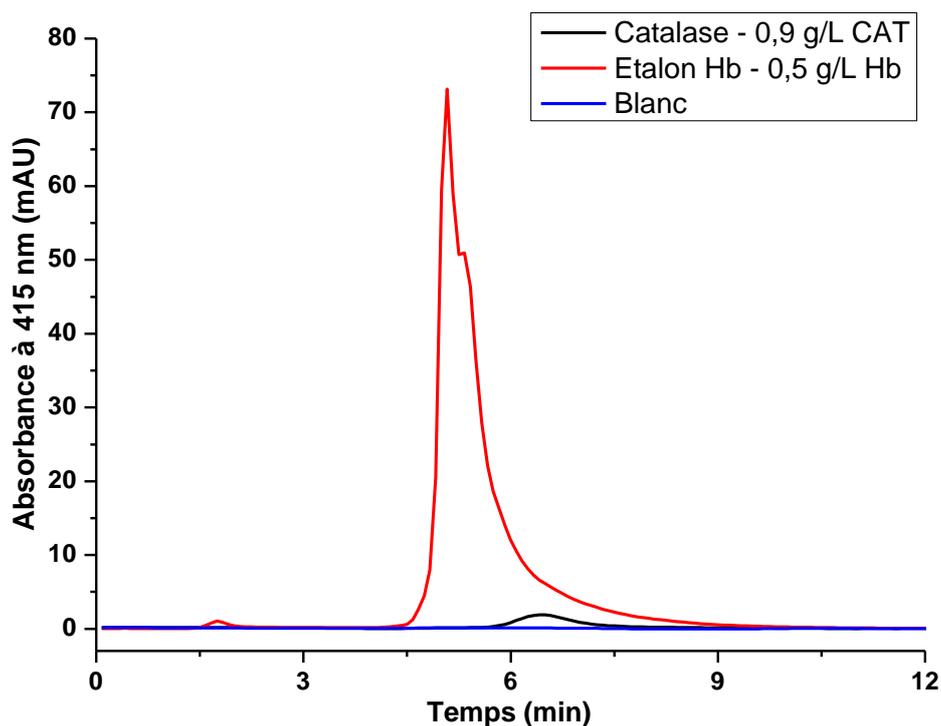
Lors du développement d'une méthode de chromatographie destinée à la détermination de l'Hb totale, il est nécessaire d'évaluer l'influence d'autres espèces qui peuvent affecter la précision des mesures de l'Hb.

La seconde protéine la plus abondante des globules rouges après l'Hb est l'anhydrase carbonique (CA), que l'on trouve chez les humains, tous les animaux et les organismes photosynthétiques. Il existe cinq familles :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ , mais seulement la famille  $\alpha$ -CA est présente chez les mammifères. Cette catégorie est aussi divisée en plusieurs isoformes de CA mais l'anhydrase carbonique I (CA I) est la forme majoritaire présente dans les globules rouges et dont la masse moléculaire moyenne est de 28870 Da (UniProt – P00915, CAH1-Human). Son point isoélectrique est égal à 6,59 [207]. La CA I est une métalloprotéine contenant du Zn activant l'hydratation du CO<sub>2</sub> en acide carbonique [181, 208]. Afin d'assurer l'absence de substances interférentes dans la fenêtre d'observation du pic de l'Hb, l'analyse de CA I a été effectuée en utilisant les conditions analytiques développées dans le paragraphe précédent (**Tableau 47**). Une solution contenant 0,4 g.L<sup>-1</sup> de CA I et 0,5 g.L<sup>-1</sup> d'Hb est analysée par HPLC-ICPMS. Ces analyses montrent que la CA I n'interfère pas sur la séparation de l'Hb dans les conditions analytiques développées. En effet, aucun pic significatif n'est présent par détection VISIBLE à 415 nm et par détection ICPMS du <sup>56</sup>Fe comme représenté dans la **Figure 51**.



**Figure 51 : Chromatogrammes représentant l'analyse de la CA I par colonne d'échange d'anions associée à une détection VISIBLE à 415 nm et une détection ICPMS à <sup>56</sup>Fe en comparaison avec l'étalon d'Hb et un blanc.**

Le sang contient également différentes enzymes dont la catalase (CAT) qui est composée de quatre sous-unités identiques de 59756 Da (UniProt – P04040 – CATA-Human) chacune contenant quatre groupement hème [209]. Sa masse moléculaire est d'environ 240 kDa et son point isoélectrique est égal à 6,90. Cette enzyme est largement distribuée dans le corps, avec une concentration élevée dans le foie, les reins et les globules rouges (plus de 98% de la CAT dans le sang est présente dans le cytosol des globules rouges) [170]. Dans les globules rouges, la catalase et la glutathion peroxydase protègent conjointement l'Hb contre l'oxydation. La CAT catalyse la décomposition du peroxyde d'H<sub>2</sub> par deux types de réactions. La gamme normale de CAT est d'environ  $0,84 \pm 0,10 \text{ MU.g}^{-1} \text{ Hb}$  ce qui signifie que pour 1 g d'Hb il y a entre 0,2 et 0,4 g de CAT [210, 211]. L'étude d'une potentielle interférence de la catalase sur le dosage de Hb a été effectuée en utilisant les conditions analytiques développées dans le paragraphe précédent (**Tableau 47**). Une solution contenant  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  d'Hb et  $0,9 \text{ g.L}^{-1}$  de CAT est analysée par HPLC-ICPMS (voir **Figure 52**). Cette analyse montre l'élution d'un pic correspondant à la CAT à 6,4 min alors que l'Hb est éluée à 5,3 min. Cependant, le pic de l'Hb étant très large, la CAT est coéluee dans ce pic. Dans ces conditions, la CAT représente 4 % de l'étalon d'Hb ce qui est négligeable car cela n'est significativement pas différent des incertitudes de mesures et la concentration utilisée en CAT est deux fois plus élevée que la valeur physiologique.



**Figure 52 : Chromatogrammes représentant l'analyse de la CAT par colonne d'échange d'anions associée à une détection VISIBLE à 415 nm et une détection ICPMS à <sup>56</sup>Fe en comparaison avec l'étalon d'Hb et un blanc.**

Ces essais mettent en évidence l'absence d'interférents (CAT ou CA I) significatifs dans l'analyse de l'Hb dans de l'hémolysat par HPLC-ICPMS.

## 2.6. Quantification en HPLC-ICPMS et HPLC-VISIBLE

Afin de **quantifier la teneur en Hb** dans nos échantillons, différentes méthodes ont été utilisées : **l'étalonnage externe, les ajouts dosés et la dilution isotopique (en mode non-spécifique et spécifique)**. Ces méthodes sont effectuées en couplant une HPLC avec une détection ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ) et VISIBLE (415 nm).

### 2.6.1. Quantification par étalonnage externe

L'étalonnage consiste à préparer, à partir d'une solution étalon dont la pureté est connue, une gamme d'étalonnage qui va couvrir la plage de travail. Les dilutions des solutions sont réalisées par volumétrie ou par gravimétrie. Dans cette étude, la gravimétrie, considérée comme une méthode primaire, est utilisée. Ainsi la balance doit être contrôlée régulièrement afin de garantir la justesse des pesées. L'étalonnage externe est testé avec les deux séparations optimisées précédemment (échange de cations et échange d'anions).

#### 2.6.1.1. Préparation des échantillons

La gamme d'étalonnage en étalon d'Hb est comprise entre 0,05 et 0,5 g.L<sup>-1</sup> Hb.

Le CRM utilisé est le JCCRM 912-1 de niveau bas (L). Sa teneur étant très élevée (80,7 g.L<sup>-1</sup> Hb) pour une analyse directe, des dilutions sont nécessaires afin de couvrir la gamme de l'étalonnage. Deux dilutions successives dans un tampon (10 mM Tris, pH 7,5-8,0) sont réalisées pour obtenir une teneur finale comprise entre 0,05 et 0,25 g.L<sup>-1</sup> Hb.

#### 2.6.1.2. Calcul des incertitudes

Afin d'assurer la traçabilité des résultats obtenues par étalonnage externe, un budget d'incertitude sur la concentration de l'échantillon mesurée a été calculé en prenant en compte les incertitudes-types relatives à la préparation des solutions étalons, à la linéarité ainsi qu'à la répétabilité analytique.

### Incertitude type relative à la préparation des solutions d'étalonnage

L'incertitude-type absolue sur les concentrations des solutions d'étalonnage est une combinaison des incertitudes-types liées aux masses pesées lorsque la méthode gravimétrique est utilisée pour la préparation des solutions ainsi qu'à la pureté de l'étalon. Le calcul de l'incertitude-type absolue sur les différents paramètres se fait selon la méthode du GUM grâce au logiciel Wincert permettant la propagation des incertitudes-types. Pour chaque paramètre influant est associé son type de variable, son incertitude type et une loi de distribution. Ces données sont entrées dans le logiciel ainsi que les différentes fonctions permettant d'aboutir au résultat final. L'étape suivante, consistant à

la propagation des incertitudes-types, est réalisée par Wincert. La **Figure 53** montre un exemple de calcul d'incertitude-type sur les différentes concentrations des solutions étalons.

**Définition des variables :**

Code	Description	Valeur	Méthode	Incertitude absolue
mvHb	mere vide Etalon Hb	6.54290E+000 g	Personnalisée	9E-005 g
Hb	+ Hb	6.55120E+000 g	Personnalisée	9E-005 g
mpHb	mere plein Etalon Hb	1.130560E+001 g	Personnalisée	9E-005 g
mvHb1	flacon vide Etalon 1 Hb	9.17000E+000 g	Personnalisée	9E-005 g
Hb1	+Hb1	9.19910E+000 g	Personnalisée	9E-005 g
mpHb1	flacon plein Etalon 1 Hb	1.01809E+001 g	Personnalisée	9E-005 g
mvHb2	flacon vide Etalon 2 Hb	9.17620E+000 g	Personnalisée	9E-005 g
Hb2	+Hb2	9.26720E+000 g	Personnalisée	9E-005 g
mpHb2	flacon plein Etalon 2 Hb	1.018840E+001 g	Personnalisée	9E-005 g
mvHb3	flacon vide Etalon 3 Hb	9.17440E+000 g	Personnalisée	9E-005 g
Hb3	+Hb3	9.35310E+000 g	Personnalisée	9E-005 g
mpHb3	flacon plein Etalon 3 Hb	1.018150E+001 g	Personnalisée	9E-005 g
p	pureté Etalon Hb	9.0E-001 g/mL	Tri. Rect. D	2E-002 g/mL

**Incertitudes sur les fonctions :**

Méthode Numérique

Incertitudes calculées sans les corrélations des variables

Code	Nom	Expression	Valeur	Incertitude élargie U
Cet1	Concentration étalon 1	$(mvHb1-Hb1)*Cm/(mvHb1-mpHb1)*p$	4.4982E-002 g/L Hb	2.189E-003 g/L Hb (k = 2)
Cet2	Concentration étalon 2	$(mvHb2-Hb2)*Cm/(mvHb2-mpHb2)*p$	1.40485E-001 g/L Hb	6.738E-003 g/L Hb (k = 2)
Cet3	Concentration étalon 3	$(mvHb3-Hb3)*Cm/(mvHb3-mpHb3)*p$	2.77273E-001 g/L Hb	1.3283E-002 g/L Hb (k = 2)
Cm	Concentration mère étalon Hb	$(mvHb-Hb)/(mvHb-mpHb)*1000$	1.74271 E+000 g/L Hb	5.3402E-002 g/L Hb (k = 2)

**Figure 53 : Exemple de calcul d'incertitude-type sous Wincert pour la préparation des étalons.**

**Incertitude type relative à la linéarité**

La régression linéaire est établie par la méthode des moindres carrés. L'incertitude-type sur l'ordonnée à l'origine,  $b_0$ , est calculée avec le logiciel « Forsythe » développé par le LNE. L'incertitude-type relative,  $u_{linéarité}$ , correspond à :

$$u_{linéarité} = \frac{s(b_1)}{b_1} \quad \text{Équation 33}$$

$$\text{Où} \quad b_1 = \frac{\sum(Xi - \bar{X})(Yi - \bar{Y})}{\sum(Xi - \bar{X})^2} \quad s(b_1) = \sqrt{\frac{s(e)^2}{\sum(Xi - \bar{X})^2}}$$

Avec :

- $b_1$  : la pente de la droite d'étalonnage
- $Xi$  : les concentrations des différents étalons utilisés
- $\bar{X}$  : la valeur moyenne des concentrations de la gamme d'étalonnage
- $Yi$  : les aires de pics obtenues pour chaque étalon
- $\bar{Y}$  : la valeur moyenne des aires de pics
- $s(b_1)$  : l'écart type sur la pente de la droite d'étalonnage
- $s(e)$  : l'écart type résiduel

### Incertitude type relative à la répétabilité analytique

Si (n) régressions linéaires sont établies, on considère que les (n) concentrations de l'échantillon sont des variables indépendantes. Alors l'incertitude-type relative de répétabilité analytique,  $u_{\text{répétabilité}}$ , est donnée par l'équation suivante :

$$u_{\text{répétabilité}} = \frac{s_{(Y_i)}}{\sqrt{n}} \quad \text{Équation 34}$$

Avec :

- $s_{(Y_i)}$  : l'écart-type de répétabilité des mesures du CRM
- $n$  : le nombre de résultats de  $Y_i$  obtenu avec chaque réplicat indépendant de la méthode

### Estimation de l'incertitude composée

Ainsi l'incertitude-type relative à la concentration mesurée du CRM se calcule de la manière suivante :

$$u_{(C_{\text{échantillon}})} = \sqrt{(u_{\text{étalon}}^2 + u_{\text{linéarité}}^2 + u_{\text{répétabilité}}^2)} \quad \text{Équation 35}$$

Avec :

- $u_{\text{étalon}}$  : l'incertitude-type relative à la préparation des solutions étalons
- $u_{\text{linéarité}}$  : l'incertitude-type relative à la linéarité
- $u_{\text{répétabilité}}$  : l'incertitude-type relative à la répétabilité analytique

Enfin l'expression du résultat final est accompagnée par l'incertitude élargie. Cette valeur représente un intervalle dont il est attendu qu'il comprenne une fraction élevée de la distribution des valeurs qui pourraient être raisonnablement attribuées au mesurande (définition du GUM) [15].

$$U = k \cdot u_{(C_{\text{échantillon}})} \quad \text{Équation 36}$$

Avec :

- $U$  : l'incertitude élargie
- $k$  : le facteur d'élargissement ; généralement  $k = 2$  pour un intervalle de confiance proche de 95 % si le mesurande tend vers une loi de distribution normale
- $u_{(C_{\text{échantillon}})}$  : l'incertitude-type relative à la concentration mesurée du CRM

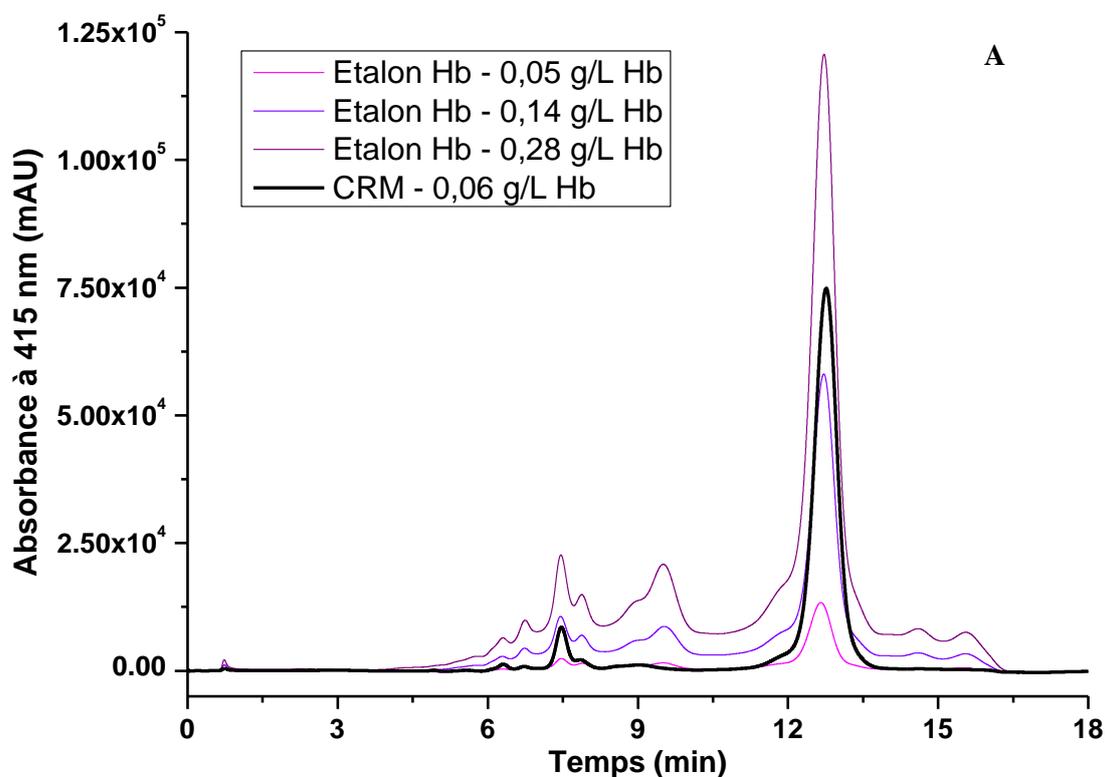
La contribution de la dilution des échantillons et ainsi que celle de la densité étant très faibles, elles ne sont pas prises en compte pour le calcul de l'incertitude finale.

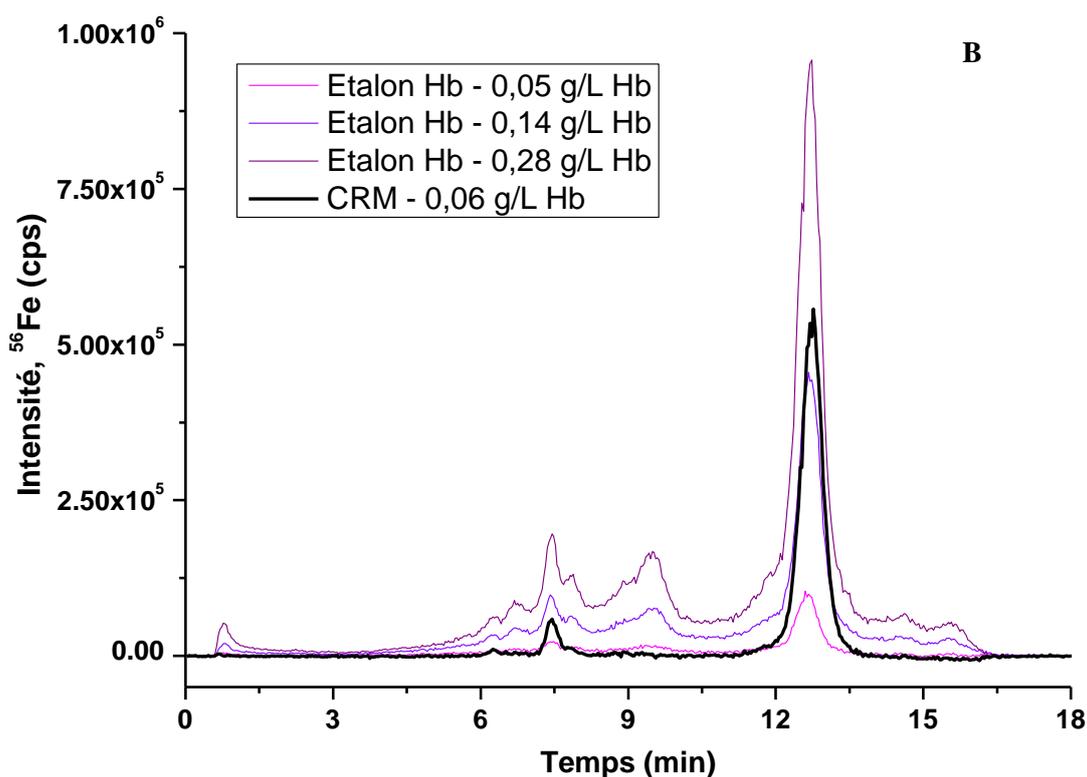
### 2.6.1.3. Résultats

Pour l'étalonnage externe, 3 réplicats en 3 points étalons sur 3 jours différents ont été réalisés. La validité de la méthode est obtenue par l'analyse du CRM JCCRM 912-1L, certifié en Hb totale ( $80,7 \pm 1,0 \text{ g.L}^{-1}$  Hb, valeur de référence). Les séquences d'analyse sont effectuées en alternant échantillon-blanc ou étalon-blanc.

#### 2.6.1.3.1. Etalonnage externe pour la méthode de séparation par colonne d'échange de cations

La **Figure 54** montre les chromatogrammes d'une gamme d'étalonnage en Hb totale (3 niveaux de concentration) et du CRM JCCRM 912-1 à une concentration de  $0,06 \text{ g.L}^{-1}$  Hb (courbe noire) obtenus par spectrophotométrie visible à 415 nm (A) et par détection ICP MS pour le  $^{56}\text{Fe}$  (B). Pour les deux modes de détection, le profil chromatographique du CRM se situe au milieu de la gamme d'étalonnage. De plus, les étalons étant injectés trois fois durant la même séquence d'analyse, la précision des analyses peut être évaluée. Le coefficient de variation (RSD) obtenus sur l'aire des pics par essai est inférieur à 6 % tandis que le RSD relatif au temps de rétention d'environ 12,6 min est inférieur à 1 % pour les deux types de détection.





**Figure 54 : Chromatogrammes (éch. cations) du CRM JCCRM 912-1L et d'une gamme d'étalonnage en Hb totale par absorption visible à 415 nm (Figure A) et par détection ICP MS pour le  $^{56}\text{Fe}$  (Figure B).**

Les valeurs moyennes obtenues pour le CRM JCCRM 912-1L pour chaque gamme d'étalonnage par détection ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ) et VISIBLE (415nm) sont représentées dans le **Tableau 48**.

**Tableau 48 : Résultats obtenus pour le CRM JCCM 912-1L sur 3 jours distincts par étalonnage externe avec la colonne par échange de cations par HPLC-ICPMS et par détection ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ) et VISIBLE (415 nm).**

	ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ) Concentration ( $k=2$ , $\text{g.L}^{-1}$ Hb)	VISIBLE (415 nm) Concentration ( $k=2$ , $\text{g.L}^{-1}$ Hb)
Essai 1 (n=3)	$170,7 \pm 28,8$	$184,2 \pm 32,0$
Essai 2 (n=3)	$123,4 \pm 27,8$	$137,0 \pm 32,7$
Essai 3 (n=3)	$109,3 \pm 30,9$	$125,7 \pm 38,3$
<b>Moyenne (n×p=9)</b>	<b><math>134,5 \pm 30,9</math></b>	<b><math>149,0 \pm 38,3</math></b>
<b>Valeur de référence</b>	<b><math>80,7 \pm 1,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ Hb (} k=2 \text{)}</math></b>	

La concentration moyenne sur ces trois jours par détection ICPMS est de  $134,5 \pm 30,9 \text{ g.L}^{-1} \text{ Hb}$  ce qui représente une erreur relative de 67 % par rapport à la valeur indiquée dans le certificat. Cette valeur est plus élevée pour la détection à 415 nm avec une concentration de  $149,0 \pm 38,3 \text{ g.L}^{-1} \text{ Hb}$  donc une erreur relative de 85 %. L'écart type inter essais est similaire pour les deux modes de détection, égal à  $32 \text{ g.L}^{-1} \text{ Hb}$  sur un total de 9 mesures, ce qui implique que le coefficient de variation (RSD)

moyen est de 23 % soit une dispersion des valeurs assez élevée. L'écart type intra essai est de 22 g.L<sup>-1</sup> Hb par ICPMS et 25 g.L<sup>-1</sup> Hb par VISIBLE ainsi le RSD est légèrement plus faible ( $\approx 18\%$ ).

La précision des mesures et des profils chromatographiques est similaire quel que soit le mode de détection, cependant l'erreur relative sur le résultat de mesure est plus faible par détection ICPMS. Enfin, ces concentrations élevées d'Hb pourrait être due à la teneur initiale en Fe de la phase mobile en dépit de l'étape de filtration et aux écarts types élevés obtenus lors des mesures.

Enfin, l'incertitude globale représente 25 % du résultat final pour les deux modes de détection. Le **Tableau 49** montre la valeur moyenne des différentes contributions sur l'incertitude finale. Parmi les trois contributions de l'incertitude, la préparation des solutions d'étalonnage, la linéarité et la répétabilité analytique, celle qui a le plus de poids est la répétabilité analytique avec 65 % donc la dispersion des mesures. La linéarité représente 23 % de l'incertitude finale et la préparation des solutions d'étalonnage représente 12 %. Les valeurs des contributions sont similaires en détection ICPMS et VISIBLE.

**Tableau 49 : Récapitulatif des valeurs des différentes contributions de l'incertitude sur l'étalonnage externe par colonne d'échange de cations.**

	ICPMS ( <sup>56</sup> Fe)	VISIBLE (415 nm)
<i>u</i> <sub>étalon</sub> (%)	2,0	
<i>u</i> <sub>linéarité</sub> (%)	3,3	3,8
<i>u</i> <sub>répétabilité</sub> (%)	10,4	12,4
<i>u</i> <sub>échantillon</sub> (%)	<b>11,3</b>	<b>11,7</b>
<b>Résultats (<i>k</i>=2, g.L<sup>-1</sup> Hb)</b>	<b>134,5 ± 30,9</b>	<b>149,0 ± 38,3</b>

### 2.6.1.3.2. Etalonnage externe pour la méthode de séparation par colonne d'échange d'anions

La **Figure 55** montre les chromatogrammes d'une gamme d'étalonnage en Hb totale et du CRM JCCRM 912-1 à une concentration de 0,09 g.L<sup>-1</sup> Hb (courbe noire) obtenus par spectrophotométrie visible à 415 nm (A) et par détection ICP MS pour le <sup>56</sup>Fe (B). Pour les deux modes de détection, le pic d'intérêt du CRM se situe au milieu de la gamme d'étalonnage. De plus, les étalons étant injectés trois fois durant la même séquence d'analyse, la précision des analyses peut être évaluée. Le RSD obtenus sur l'aire des pics par essai est inférieur à 1 % tandis que le RSD relatif au temps de rétention d'environ 5,3 min est inférieur à 1 % pour les deux types de détection.

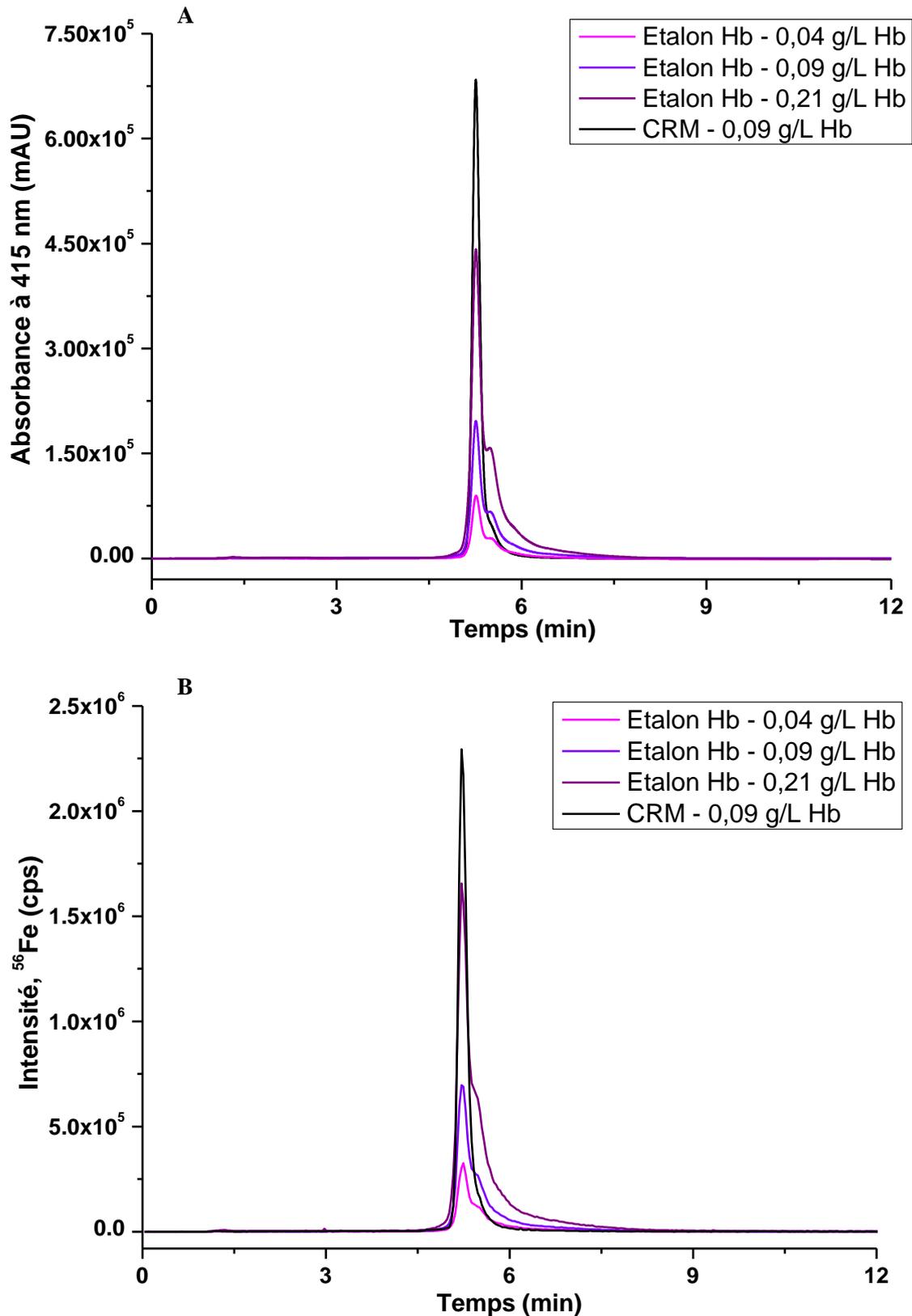
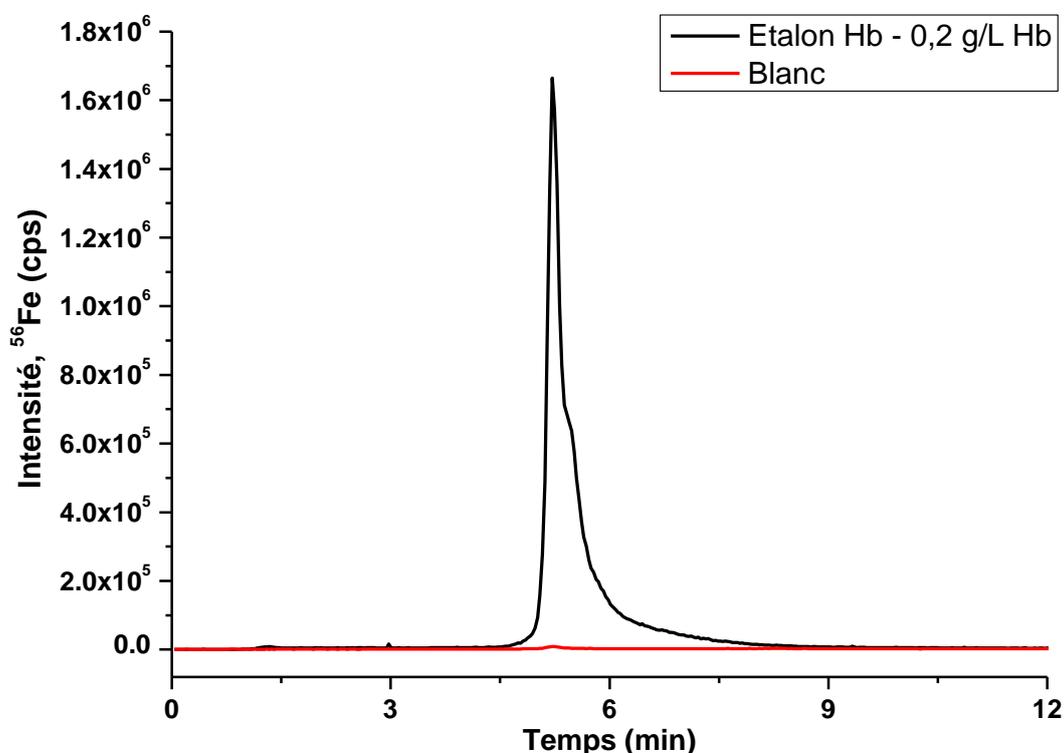


Figure 55 : Chromatogrammes (éch. d'anions) du CRM JCCRM 912-1L et d'une gamme d'étalonnage en Hb totale par absorption visible à 415 nm (Figure A) et par détection ICP MS pour le <sup>56</sup>Fe (Figure B).

Les séquences d'analyse utilisées par HPLC-ICPMS alternent un blanc entre chaque échantillon ou étalon afin de s'assurer que rien ne reste retenu sur la colonne. La **Figure 56** montre un blanc associée à un étalon d'Hb de  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  Hb avec une détection par ICPMS.



**Figure 56 : Chromatogrammes d'un blanc et d'un échantillon d'étalon d'Hb analysés par HPLC-ICPMS avec colonne par échange d'anions et une détection par ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ).**

La teneur en Hb du blanc par détection ICPMS ou VISIBLE représente environ 1 % de l'échantillon ce qui donne une teneur approximative de  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  Hb. Cette valeur est négligeable par rapport aux teneurs étudiées.

Les valeurs moyennes obtenues pour le CRM JCCRM 912-1L pour chaque gamme d'étalonnage par détection ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ) et VISIBLE (415 nm) sont présentées dans le **Tableau 50**. La concentration moyenne sur ces trois jours par détection ICPMS est de  $117,7 \pm 16,0 \text{ g.L}^{-1}$  Hb ce qui représente une erreur relative de 46 % par rapport à la valeur indiquée dans le certificat. Cette valeur est plus élevée pour la détection à 415 nm avec une concentration de  $134,4 \pm 14,3 \text{ g.L}^{-1}$  Hb donc une erreur relative de 67 %. L'écart type inter essais est similaire pour les deux modes de détection, égal à  $19 \text{ g.L}^{-1}$  Hb sur un total de 9 mesures, ce qui implique que le coefficient de variation (RSD) moyen est de 15 % soit une dispersion des valeurs plus faible que celle obtenue avec la colonne par échange de cations. L'écart type intra essai est de  $3 \text{ g.L}^{-1}$  Hb par ICPMS et  $6 \text{ g.L}^{-1}$  Hb par VISIBLE ainsi le RSD intra essai ( $\approx 3 \%$ ) est plus faible que celui inter essais.

**Tableau 50: Résultats obtenus pour le CRM JCCM 912-1L sur 3 jours distincts par étalonnage externe avec la colonne par échange d'anions par HPLC-ICPMS et par détection ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ) et VISIBLE (415 nm).**

	ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ) Concentration ( $k=2$ , $\text{g.L}^{-1}$ Hb)	VISIBLE (415 nm) Concentration ( $k=2$ , $\text{g.L}^{-1}$ Hb)
Essai 1 (n=3)	125,0 $\pm$ 16,0	146,2 $\pm$ 14,3
Essai 2 (n=3)	97,3 $\pm$ 9,8	112,7 $\pm$ 12,4
Essai 3 (n=3)	130,7 $\pm$ 8,7	144,3 $\pm$ 10,5
<b>Moyenne (n=9)</b>	<b>117,7 <math>\pm</math> 16,0</b>	<b>134,4 <math>\pm</math> 14,3</b>
<b>Valeur de référence</b>	<b>80,7 <math>\pm</math> 1,0 <math>\text{g.L}^{-1}</math> Hb (<math>k=2</math>)</b>	

La précision des mesures et des profils chromatographiques est similaire quel que soit le mode de détection, cependant l'erreur relative sur le résultat de mesure est plus faible par détection ICPMS comme pour la chromatographie par échange de cations.

L'incertitude globale représente 12 % du résultat final pour les deux modes de détection. Le **Tableau 51** montre la valeur moyenne des différentes contributions sur l'incertitude finale. Parmi les trois contributions de l'incertitude, la répétabilité analytique avec un poids de 50 % ainsi que la linéarité avec un poids de 40 % représentent les contributions majeures sur l'incertitude finale. La proportion entre ces deux contributions est plus homogène qu'avec la chromatographie d'échange de cations. Quant à la contribution de la préparation des solutions d'étalonnage, elle est de 10 %. Les valeurs des contributions sont similaires en détection ICPMS et VISIBLE.

**Tableau 51 : Récapitulatif des valeurs des différentes contributions de l'incertitude sur l'étalonnage externe par colonne d'échange d'anions.**

	ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ )	VISIBLE (415 nm)
$u_{\text{étalon}}$ (%)	2,5	
$u_{\text{linéarité}}$ (%)	3,1	2,3
$u_{\text{répétabilité}}$ (%)	1,9	2,9
$u_{\text{échantillon}}$ (%)	<b>4,9</b>	<b>4,7</b>
<b>Résultats (<math>k=2</math>, <math>\text{g.L}^{-1}</math> Hb)</b>	<b>117,7 <math>\pm</math> 16,0</b>	<b>134,4 <math>\pm</math> 14,3</b>

#### 2.6.1.4. Conclusion de l'étalonnage externe

Un bilan des résultats sur la quantification du CRM JCCRM 912-1L par étalonnage externe en HPLC-ICPMS par échange de cations et échange d'anions peut être effectué. La comparaison entre les deux types de détection (ICPMS et VISIBLE) met en évidence que l'erreur relative obtenue sur le résultat final est 20 % plus élevée pour la détection à 415 nm. Les autres paramètres sont identiques quel que soit le type de détection. De manière générale, les résultats obtenus avec la colonne d'échange d'anions sont plus satisfaisants que ceux obtenus avec la colonne d'échange de cations. Le récapitulatif des résultats est indiqué dans le **Tableau 52**. En effet, l'erreur relative obtenue sur

l'analyse du CRM est de 46 % au lieu de 67 % pour la colonne Mono S. Une diminution du RSD (24 % à 17 %) ainsi qu'une diminution de l'incertitude (23 % à 13 %) sont aussi observées. De plus, les profils chromatographiques sont différents puisque plusieurs pics sont séparés en échange de cation contre un seul pic en échange d'anions. **La méthode développée par colonne échangeuse d'anions est donc plus prometteuse.** Cependant l'écart par rapport à la valeur certifiée est encore trop élevé ce qui peut peut-être s'expliquer par la différence de matrice entre les étalons et le CRM.

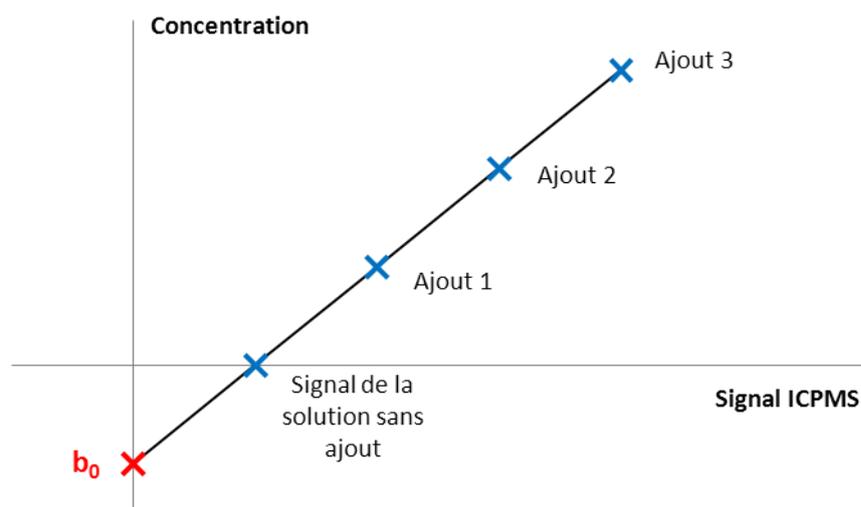
**Tableau 52 : Récapitulatif des résultats obtenus par étalonnage externe de l'analyse du JCCRM 912-1L par détection ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ) et par colonne d'échange d'anions et de cations.**

	Échange de cations	Échange d'anions
<b>Valeur moyenne CRM</b>	134,5 ± 30,9 g.L <sup>-1</sup> Hb	117,7 ± 16,0 g.L <sup>-1</sup> Hb
<b>Erreur relative</b>	67 %	46 %
<b>Incertitude relative</b>	23 %	13 %
<b>Précision intra essai (n=3)</b>		
- SD	22 g.L <sup>-1</sup> Hb	3 g.L <sup>-1</sup> Hb
- RSD	18 %	3 %
<b>Précision inter essai (n=9)</b>		
- SD	32 g.L <sup>-1</sup> Hb	19 g.L <sup>-1</sup> Hb
- RSD	23 %	15 %
<b>Précision séparation</b>		
- Temps de rétention	< 1 %	< 1 %
- Aire des pics	< 6 %	< 1 %

La méthode des ajouts dosés est donc mise en place pour essayer de compenser cette différence. Etant donné que les performances analytiques obtenues en échange d'anions sont meilleures que celles obtenues en échange de cations, **la quantification par ajouts dosés sera effectuée seulement en échange d'anions.**

### 2.6.2. Ajouts dosés par colonne d'échange d'anions

Cette méthode est utilisée lorsque les effets de matrice sont importants et dans le cas où la substance d'intérêt peut difficilement être extraite de la matrice. Dans ce cas, la matrice va être analysée seule puis avec des ajouts connus en substance à doser. La droite de la concentration en fonction de la réponse du détecteur est représentée sur la **Figure 57**.



**Figure 57 : Principe général de la méthode des ajouts dosés.**

Par extrapolation, l'ordonnée à l'origine,  $b_0$ , correspond à la concentration de la solution sans ajout. Ainsi la concentration de l'élément dans l'échantillon est exprimée par la formule suivante :

$$C_{\text{échantillon}} = |\overline{b_0}| \quad \text{Équation 37}$$

Où  $|\overline{b_0}|$  correspond à la moyenne des ordonnées à l'origine obtenues pour  $n$  réplicats.

#### 2.6.2.1. Préparation des échantillons

La gamme des ajouts est comprise entre 0,025 et 0,110 g.L<sup>-1</sup> Hb. La solution mère d'Hb préparée à une concentration comprise entre 0,5 et 1 g.L<sup>-1</sup> Hb. Les ajouts sont réalisés en suivant la **Figure 57**. Le premier ajout correspond à une demi-fois la concentration de l'élément d'intérêt estimée par étalonnage externe. Le deuxième ajout correspond à une fois la concentration et le troisième ajout correspond à deux fois la concentration de l'élément d'intérêt estimée.

Le CRM JCCRM 912-1L est dilué dans la solution tampon à deux reprises afin d'obtenir une teneur finale de 0,05 g.L<sup>-1</sup> Hb. Une quantité suffisante de solution est réalisée, environ 5 mL, afin de pouvoir effectuer les ajouts dosés sur plusieurs gammes de concentration.

### 2.6.2.2. Calcul des incertitudes

Un budget d'incertitude a été calculé pour assurer la traçabilité des résultats obtenus par ajouts dosés.

Trois composantes de l'incertitude finale ont été identifiées :

- L'incertitude-type relative à la préparation des solutions d'ajouts,  $u_{ajout}$
- L'incertitude-type relative à la détermination de l'ordonnée à l'origine,  $u_{linéarité}$
- L'incertitude-type relative à la fidélité de la méthode après (n) réplicats,  $u_{répétabilité}$

#### Incertitude-type sur les ajouts, $u_{ajout}$

La concentration d'un ajout de la solution étalon dans la solution de l'échantillon s'exprime :

$$C_{ajout} = \frac{m_{ajout} \cdot C_{étalon}}{m_{échantillon}} \quad \text{Équation 38}$$

Avec :

- $C_{ajout}$  : la concentration d'un ajout de solution étalon
- $m_{ajout}$  : la masse de la solution étalon ajoutée
- $C_{étalon}$  : la concentration de la solution étalon
- $m_{échantillon}$  : la masse de l'échantillon

Les masses de la solution étalon et de l'échantillon sont calculées par différence de masses de pesées.

L'incertitude type,  $u_{ajout}$ , est établie à partir de la loi de propagation des incertitudes.

#### Incertitude-type relative à la détermination de l'ordonnée à l'origine, $u_{ordon}$

La régression linéaire est établie par la méthode des moindres carrés. L'incertitude-type sur l'ordonnée à l'origine,  $b_0$ , est calculée avec le logiciel « Forsythe » développé par le LNE.

L'incertitude-type relative,  $u_{linéarité}$ , correspond à :

$$u_{linéarité} = \frac{s(b_0)}{b_0} \quad \text{Équation 39}$$

Où  $b_0 = \bar{Y} - b_1 \times \bar{X}$   $s(b_0) = \sqrt{\frac{s(e)^2}{p + \bar{X}^2 / \sum (X_i - \bar{X})^2}}$

Avec :

- $b_1$  : la pente de la droite d'étalonnage
- $b_0$  : l'ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage
- $X_i$  : les concentrations des différents étalons utilisés
- $\bar{X}$  : la valeur moyenne des concentrations de la gamme d'étalonnage
- $\bar{Y}$  : la valeur moyenne des aires de pics

- $p$  : le nombre de mesures effectuées
- $s(b_0)$  : l'écart type sur l'ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage
- $s(e)$  : l'écart type résiduel

### Incertitude type relative à la répétabilité analytique

L'incertitude-type relative à la fidélité de la méthode,  $u_{\text{répétabilité}}$ , se calcule de la même façon que pour l'étalonnage externe (voir 2.6.1.2).

### Estimation de l'incertitude composée

Ainsi l'incertitude-type relative à la concentration mesurée du CRM se calcule de la manière suivante :

$$u_{(C_{\text{échantillon}})} = \sqrt{(u_{\text{ajout}}^2 + u_{\text{linéarité}}^2 + u_{\text{répétabilité}}^2)} \quad \text{Équation 40}$$

L'incertitude globale élargie est calculée de la même manière que pour l'étalonnage externe (voir 2.6.1.2) en prenant en compte un facteur d'élargissement,  $k$ , égal à 2. La contribution de la dilution des échantillons ainsi que de la densité étant très faible, elles ne sont pas prises en compte pour le calcul de l'incertitude finale.

#### **2.6.2.3. Résultats**

Pour les ajouts dosés, 3 réplicats en 3 points étalons sur 3 jours différents ont été réalisés. La validité de la méthode est donc estimée par l'analyse du CRM JCCRM 912-1L, certifié en Hb totale.

La **Figure 58** montre les chromatogrammes d'une gamme d'ajouts dosés en Hb totale et du CRM JCCRM 912-1 à une concentration de  $0,05 \text{ g.L}^{-1}$  Hb (courbe noire) obtenus par spectrophotométrie visible à 415 nm (A) et par détection ICP MS pour le  $^{56}\text{Fe}$  (B). Pour les deux modes de détection, les ajouts sont espacés proportionnellement. Les ajouts étant injectés trois fois durant la même séquence d'analyse, la précision des analyses peut être évaluée. Le coefficient de variation obtenu sur l'aire des pics par essai est inférieur à 4 % tandis que le RSD relatif au temps de rétention d'environ 5,5 min est inférieur à 0,4 % pour les deux modes de détection.

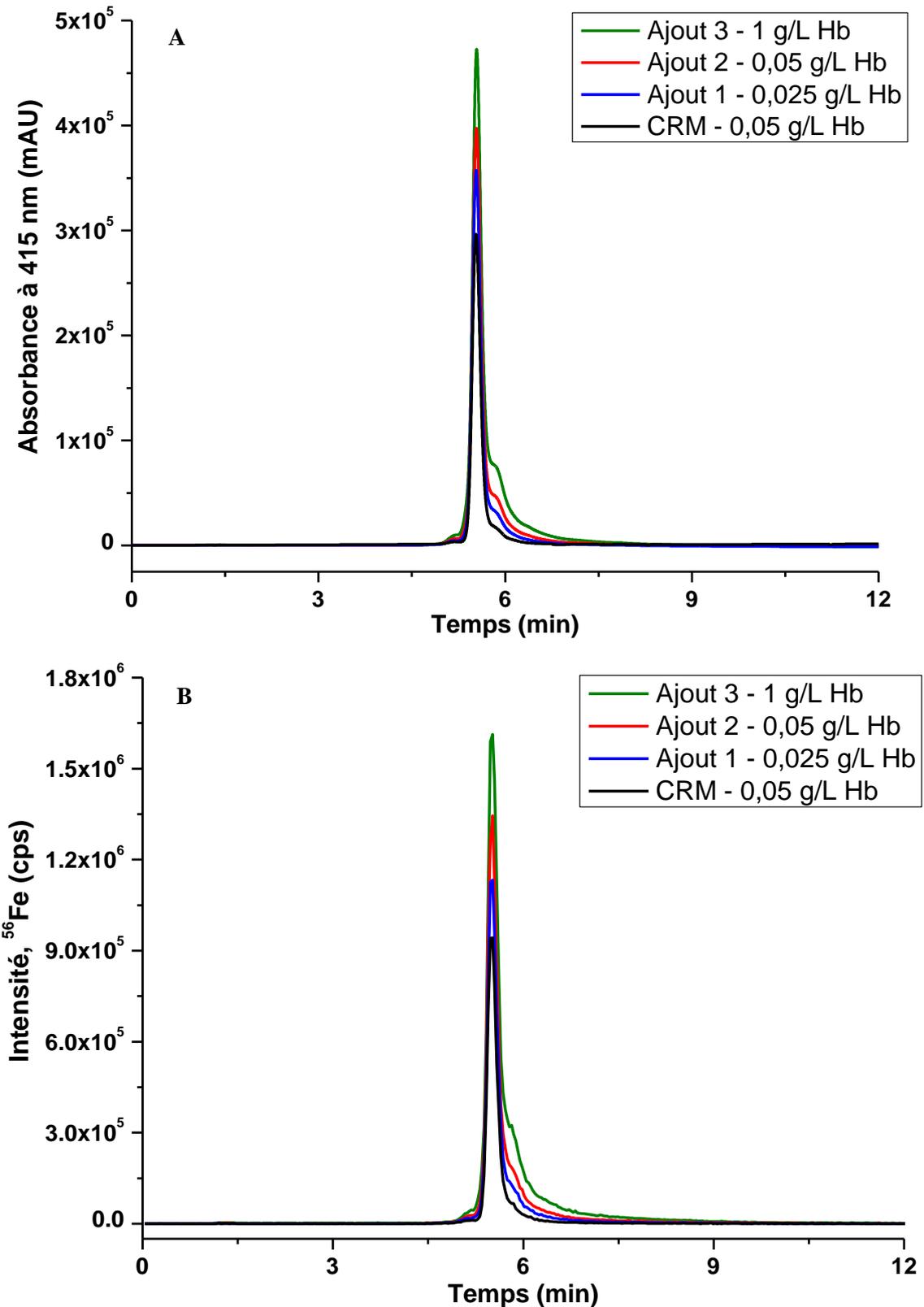


Figure 58 : Chromatogrammes par colonne SOURCE 15Q du CRM JCCRM 912-1L et de la gamme d'ajouts dosés en Hb totale par absorption visible à 415 nm (Figure A) et par détection ICPMS pour le  $^{56}\text{Fe}$  (Figure B).

Les valeurs moyennes obtenues pour le CRM JCCRM 912-1L pour chaque gamme d'étalonnage par détection ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ) et VISIBLE (415 nm) sont présentées dans le **Tableau 53**. La concentration moyenne sur ces trois jours par détection ICPMS est de  $93,7 \pm 12,6 \text{ g.L}^{-1} \text{ Hb}$  ce qui représente une erreur relative de 16 % par rapport à la valeur indiquée dans le certificat. Cette valeur est plus élevée pour la détection à 415 nm avec une concentration de  $106,6 \pm 9,1 \text{ g.L}^{-1} \text{ Hb}$  donc une erreur relative de 32 %. L'écart type inter essais est similaire pour les deux modes de détection, égal à  $10 \text{ g.L}^{-1} \text{ Hb}$  sur un total de 9 mesures, ce qui implique que le coefficient de variation (RSD) moyen est de 10 % soit une dispersion des valeurs plus faible que celle obtenue avec l'étalonnage externe. L'écart type intra essai est de  $3 \text{ g.L}^{-1} \text{ Hb}$  par ICPMS et par VISIBLE ainsi le RSD intra essai ( $\approx 2,5 \%$ ) est plus faible que celui inter essais.

**Tableau 53 : Résultats obtenus pour le CRM JCCM 912-1L sur 3 jours distincts par ajouts dosés avec la colonne d'échange d'anions par HPLC-ICPMS et par détection ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ) et VISIBLE (415 nm).**

	ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ) Concentration ( $k=2$ , $\text{g.L}^{-1} \text{ Hb}$ )	VISIBLE (415 nm) Concentration ( $k=2$ , $\text{g.L}^{-1} \text{ Hb}$ )
Essai 1 (n=3)	$96,2 \pm 11,9$	$115,8 \pm 8,1$
Essai 2 (n=3)	$87,7 \pm 12,8$	$107,3 \pm 9,1$
Essai 3 (n=3)	$97,3 \pm 5,5$	$96,8 \pm 5,3$
<b>Moyenne (n=9)</b>	<b><math>93,7 \pm 12,8</math></b>	<b><math>106,6 \pm 9,1</math></b>
<b>Valeur de référence</b>	<b><math>80,7 \pm 1,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ Hb}</math> (<math>k=2</math>)</b>	

La précision des mesures et des profils chromatographiques est similaire quel que soit le mode de détection, cependant l'erreur relative sur le résultat de mesure est plus faible par détection ICPMS. De plus, cette erreur relative a été améliorée avec l'utilisation des ajouts dosés puisqu'elle a diminué à 18 % au lieu de 41 %.

L'incertitude globale représente 11 % du résultat final pour les deux modes de détection. Le **Tableau 54** montre la valeur moyenne des différentes contributions sur l'incertitude finale. Parmi les trois contributions de l'incertitude, celle qui a le plus de poids est la linéarité avec un impact de 50 %. La répétabilité analytique représente 30 % de l'incertitude finale et la préparation des solutions d'étalonnage représente 20 %. Les valeurs des contributions sont similaires en détection ICPMS et VISIBLE.

**Tableau 54 : Récapitulatif des valeurs des différentes contributions de l'incertitude sur les ajouts dosés par colonne d'échange d'anions.**

	ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ )	VISIBLE (415 nm)
$U_{\text{étalon}}$ (%)	1,8	
$U_{\text{linéarité}}$ (%)	4,9	2,4
$U_{\text{répétabilité}}$ (%)	1,5	1,6
$U_{\text{échantillon}}$ (%)	<b>5,5</b>	<b>3,5</b>
<b>Résultats (<math>k=2</math>, g.L<math>^{-1}</math> Hb)</b>	<b>93,7 ± 12,8</b>	<b>106,6 ± 9,1</b>

#### 2.6.2.4. Conclusion pour les ajouts dosés

La comparaison entre les deux types de détection (ICPMS et VISIBLE) met aussi en évidence que l'erreur relative obtenue sur le résultat final est 15 % plus élevée pour la détection à 415 nm. Les autres paramètres sont identiques quel que soit le type de détection. Les résultats sur la quantification du CRM JCCRM 912-1L par ajouts dosés en HPLC-ICPMS en échange d'anions sont satisfaisants par rapport à ceux obtenus par étalonnage externe. Le **Tableau 55** récapitule les résultats obtenus par étalonnage externe et par ajouts dosés en échange d'anions. En effet, **l'erreur relative obtenue sur l'analyse du CRM est de 16 % au lieu de 46 % en étalonnage externe**. Une amélioration du RSD est observée diminuant de 15 % à 10 %. Enfin les incertitudes finales pour l'étalonnage externe et pour les ajouts dosés sont identiques. Cependant les écarts par rapport à la valeur certifiée sont encore élevés.

**Tableau 55 : Récapitulatif des résultats obtenus sur l'analyse du JCCRM 912-1L par étalonnage externe et par ajouts dosés en utilisant une séparation par colonne d'échange d'anions et une détection par ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ).**

	Étalonnage externe	Ajouts dosés
<b>Valeur moyenne CRM</b>	117,7 ± 16,0 g.L $^{-1}$ Hb	93,7 ± 12,8 g.L $^{-1}$ Hb
<b>Erreur relative</b>	46 %	16 %
<b>Incertitude relative</b>	13 %	13 %
<b>Précision intra essai (n=3)</b>		
- SD	3 g.L $^{-1}$ Hb	3 g.L $^{-1}$ Hb
- RSD	3 %	3 %
<b>Précision inter essai (n=9)</b>		
- SD	19 g.L $^{-1}$ Hb	10 g.L $^{-1}$ Hb
- RSD	15 %	10 %
<b>Précision séparation</b>		
- Temps de rétention	< 1 %	< 1 %
- Aire des pics	< 1 %	< 4 %

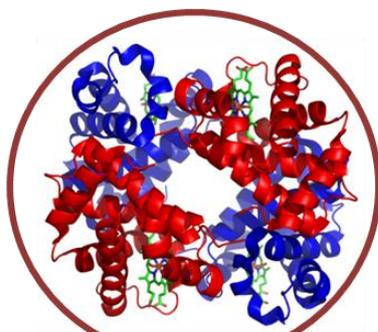
### 2.6.3. La dilution isotopique en spéciation élémentaire

Les méthodes de quantification présentées antérieurement donnent des résultats peu satisfaisants pour l'étalonnage externe et corrects pour les ajouts dosés ce qui montre un effet de matrice important. Cependant, ces méthodes n'étant pas considérées comme des méthodes primaires, l'ID a été envisagée grâce à ses caractéristiques précédemment évoquées dans le Chapitre 1 (paragraphe 3.1.3.3.2) comme la compensation des suppressions d'analyte par la matrice de l'échantillon.

L'analyse par ID en spéciation élémentaire a acquis une grande spécificité au cours des dernières années permettant de quantifier précisément les métalloprotéines endogènes dans des échantillons biologiques. A cet effet, plusieurs travaux ont rapporté la synthèse de métalloprotéines isotopiquement enrichies visant à développer des approches de l'ID en mode *spécifique*. Toutefois, plusieurs éléments doivent être soigneusement examinés pour de telles applications, puisque contrairement à l'espèce organométallique le métal est lié de manière non covalente à la protéine. Selon les travaux publiés à ce jour sur le sujet, toutes les stratégies adoptées quantifient le métal contenu dans la protéine [186-191]. En outre, il y a plusieurs points importants que l'on doit prendre en compte avant de développer de nouvelles applications:

1. Il est nécessaire de connaître la stœchiométrie de la métalloprotéine (par exemple : 4 atomes de Fe par molécule d'Hb) afin de convertir la fraction massique du métal en fraction massique de la protéine.
2. Il est nécessaire de s'assurer que le métal ajouté est lié à la protéine.
3. Les métaux sont normalement liés à des protéines par des liaisons de coordination qui peuvent être instables sous certaines conditions expérimentales (pH, ...). La dissociation du métal doit être évaluée.
4. Les protéines sont plus susceptibles de se lier de manière irréversible au matériau de la colonne chromatographique ce qui peut entraver la précision des méthodes par ID en mode *post-colonne*. Dans ce cas, l'ID en mode spécifique devrait être libre de ces erreurs.
5. Il est nécessaire d'étudier la stabilité des métalloprotéines isotopiquement enrichies utilisées pour l'ID en mode *spécifique* en présence des espèces non enrichies [185].

L'objectif de cette partie est de développer **des stratégies d'ID en spéciation élémentaire (ID-HPLC-ICPMS) pour l'analyse de l'Hb totale dans de l'hémolysat**. La molécule d'Hb ayant une stœchiométrie connue depuis de nombreuses années, il est possible de mettre en place les deux modes d'analyse par ID : le mode *post-colonne* (non-spécifique) et le mode spécifique. La **Figure 59** présente ces deux approches de quantification. Ainsi le mode non-spécifique utilise un étalon marqué inorganique applicable à n'importe quel type de molécule alors que le mode spécifique utilise un étalon marqué spécifique à la molécule d'Hb.



## ID-HPLC-ICPMS

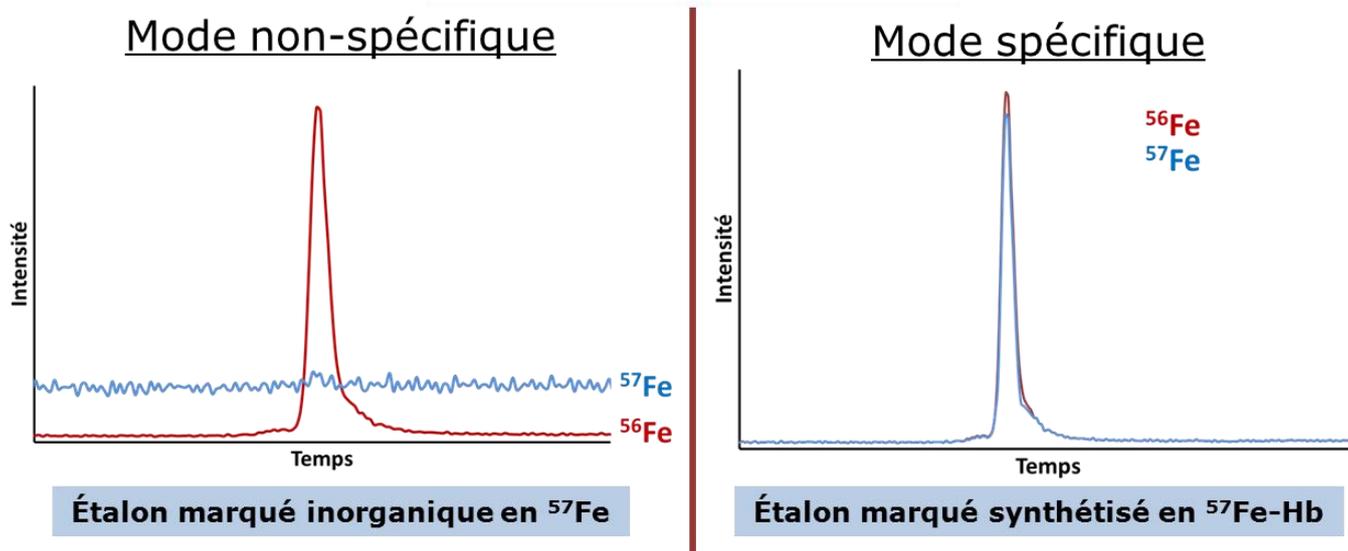


Figure 59 : Application de l'ID en spéciation élémentaire pour l'analyse de l'Hb totale dans de l'hémolysat.

### 2.6.3.1. Mode non-spécifique

Tout d'abord, l'ID en mode *post-colonne* est développée. La méthode consiste à ajouter un étalon marqué à la sortie de la séparation chromatographique dans une forme chimique inorganique qui peut être différente de celle présente dans l'échantillon.

#### 2.6.3.1.1. Mise en place de la méthode d'ID en mode *post-colonne*

L'application de l'ID en mode *post-colonne* nécessite une adaptation de l'équation initiale de la simple ID (**Equation 9**, Chapitre 1), représentée ci-dessous, puisque l'apport de l'élément dans l'échantillon change en fonction du temps à cause de la séparation chromatographique. De plus, comme l'apport de l'étalon marqué est constant dans le temps, le rapport isotopique mesuré ( $R_m$ ) dans le mélange dépendra uniquement de l'apport de l'élément dans l'échantillon.

$$N_s = N_{sp} \cdot \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \cdot \left( \frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \right) \quad \text{Équation 41}$$

Après la séparation chromatographique, l'éluat de la colonne qui contient  $N_s$  moles d'élément par gramme de dissolution avec une masse volumique,  $\rho_s$  (g.mL<sup>-1</sup>), et un débit,  $f_s$  (mL.min<sup>-1</sup>), sont mélangés avec un flux additionnel,  $f_{sp}$  (mL.min<sup>-1</sup>), qui contient  $N_{sp}$  moles d'élément par gramme de dissolution et une masse volumique,  $\rho_{sp}$  (g.mL<sup>-1</sup>).

Le débit massique total (mol.min<sup>-1</sup>) dans le mélange peut s'exprimer selon l'équation ci-dessous :

$$N_m \rho_m f_m = N_s \rho_s f_s + N_{sp} \rho_{sp} f_{sp} \quad \text{Équation 42}$$

Avec :

- $N_m$  : nombre de moles du mélange par gramme de dissolution (g.mol<sup>-1</sup>)
- $\rho_m$  : masse volumique du mélange (g.mL<sup>-1</sup>)
- $f_m$  : débit du mélange (mL.min<sup>-1</sup>)

En suivant la même procédure mathématique qui permet d'obtenir l'**équation 9** du Chapitre 1, on peut obtenir l'équation suivante :

$$N_s \rho_s f_s = N_{sp} \rho_{sp} f_{sp} \cdot \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \cdot \left( \frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \right) \quad \text{Équation 43}$$

Par ailleurs, les nombres de moles  $N_s$  et  $N_{sp}$  peuvent s'exprimer comme  $N_s = \frac{W_s}{M_s}$  et  $N_{sp} = \frac{W_{sp}}{M_{sp}}$  où  $M_s$  et  $M_{sp}$  correspondent aux masses atomiques (g.mol<sup>-1</sup>) de l'échantillon et de l'étalon marqué,

respectivement et  $W_s$  et  $W_{sp}$  représentent les fractions massiques ( $\text{g.g}^{-1}$ ) pour l'échantillon et l'étalon marqué, respectivement.

On obtient alors l'équation 44 en remplaçant les nombres de moles dans l'équation 43 :

$$W_s \rho_s f_s = W_{sp} \rho_{sp} f_{sp} \cdot \frac{M_s}{M_{sp}} \cdot \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \cdot \left( \frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \right) \quad \text{Équation 44}$$

L'expression  $W_s \rho_s f_s$  (exprimé en  $\text{ng.min}^{-1}$ ) correspond au débit massique de l'élément élué,  $MF_s$ . Ainsi le débit massique peut être calculé selon l'équation suivante en prenant en compte le biais en masse ( $k$ ) :

$$MF_s = W_{sp} \rho_{sp} f_{sp} \cdot \frac{M_s}{M_{sp}} \cdot \left( \frac{k A_{sp}^b R_m - A_s^a}{A_s^a - R_m k A_s^b} \right) \quad \text{Équation 45}$$

La séparation chromatographique est effectuée avec la colonne d'échange d'anions (Source™ 15Q 4.6/100 PE) (conditions analytiques **Tableau 46**). La détection de l'Hb est réalisée par spectrophotométrie VISIBLE à 415 nm et par ICP MS en mesurant les isotopes 54, 56 et 57 du Fe. Les conditions analytiques de l'ICPMS sont identiques à celles présentées dans le paragraphe 2.4.

La configuration instrumentale utilisée pour mettre en place l'ID en mode *post-colonne* pour la quantification de l'Hb totale est schématisée dans la **Figure 60**. Ainsi, cette configuration nécessite l'optimisation de plusieurs paramètres en dehors de la séparation chromatographique (développée dans le paragraphe 2.5.2) pour s'assurer de la traçabilité des résultats.

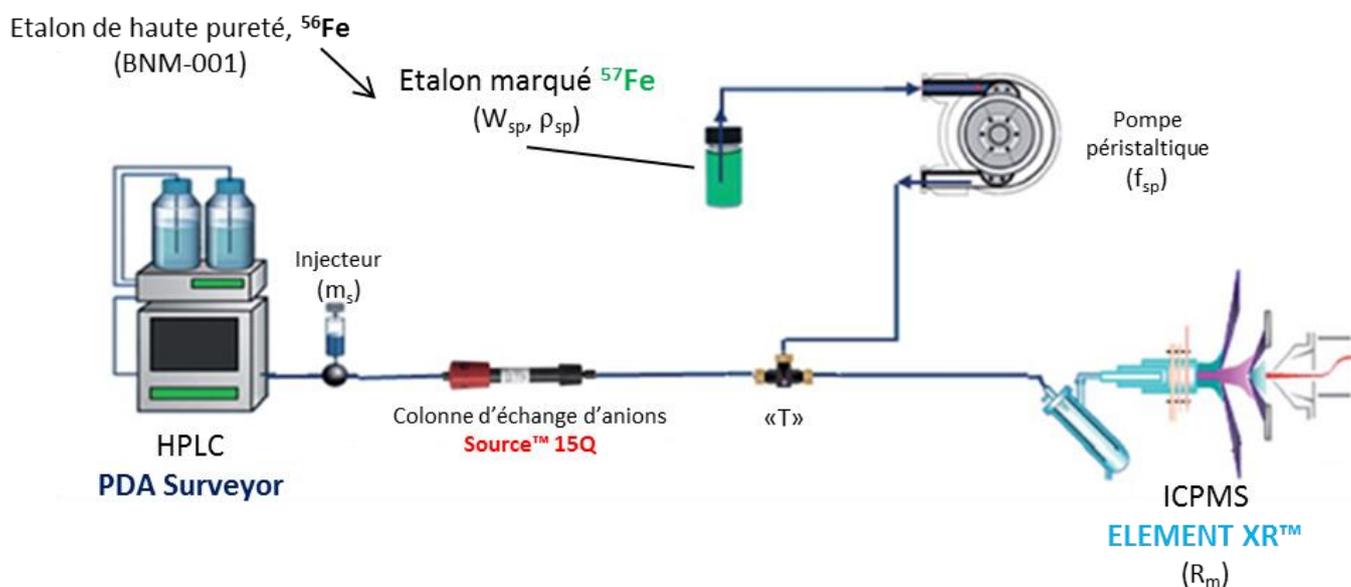


Figure 60 : Configuration instrumentale pour la quantification de l'Hb par ID en mode *post-colonne* [212].

Les différents paramètres évalués et déterminés concernent :

- la préparation de l'échantillon en optimisant la concentration injectée ( $W_s$ ).
- la masse exacte injectée par gravimétrie ( $m_{inj}$ ).
- la pompe péristaltique en optimisant le choix de la pompe et en mesurant le débit par gravimétrie pour chaque essai ( $f_{sp}$ ).
- la solution d'étalon marqué inorganique en Fe où l'optimisation de l'isotope, de la préparation de la solution et de la concentration est effectuée. Cette solution est caractérisée par ID inverse – ICPMS en Fe ( $W_{sp}$ ,  $\rho_{sp}$ ).
- le biais en masse est évalué en choisissant la solution la plus appropriée ( $k$ ).

Pour la préparation de l'échantillon, il est nécessaire d'optimiser la **concentration de l'échantillon** ( $W_s$ ) afin d'avoir une sensibilité suffisante, de ne pas saturer la colonne chromatographique et de ne pas passer en mode « analogue » pour la détection ICPMS mais de rester en mode « comptage d'ions » (limite autour d'1 millions de coups). La teneur optimale pour l'analyse du JCCRM 912 est comprise entre 40 et 60 mg.kg<sup>-1</sup> Hb (150 – 200 µg.kg<sup>-1</sup> Fe).

Afin de déterminer avec exactitude la **masse injectée** ( $m_{inj}$ ) avec la boucle d'injection de 50µL de l'HPLC, différentes injections de l'échantillon sont effectuées sur deux jours différents et la masse injectée moyenne est obtenue par pesée des échantillons avant et après injection (balance d = 0,1 mg). Le **Tableau 56** regroupe les résultats obtenus pour la détermination de la masse injectée. Ainsi, pour une boucle d'injection de 50 µL, la masse moyenne injectée est de 0,0498 ± 0,0008 g.

**Tableau 56 : Détermination de la masse injectée avec une boucle d'injection de 50 µL par gravimétrie.**

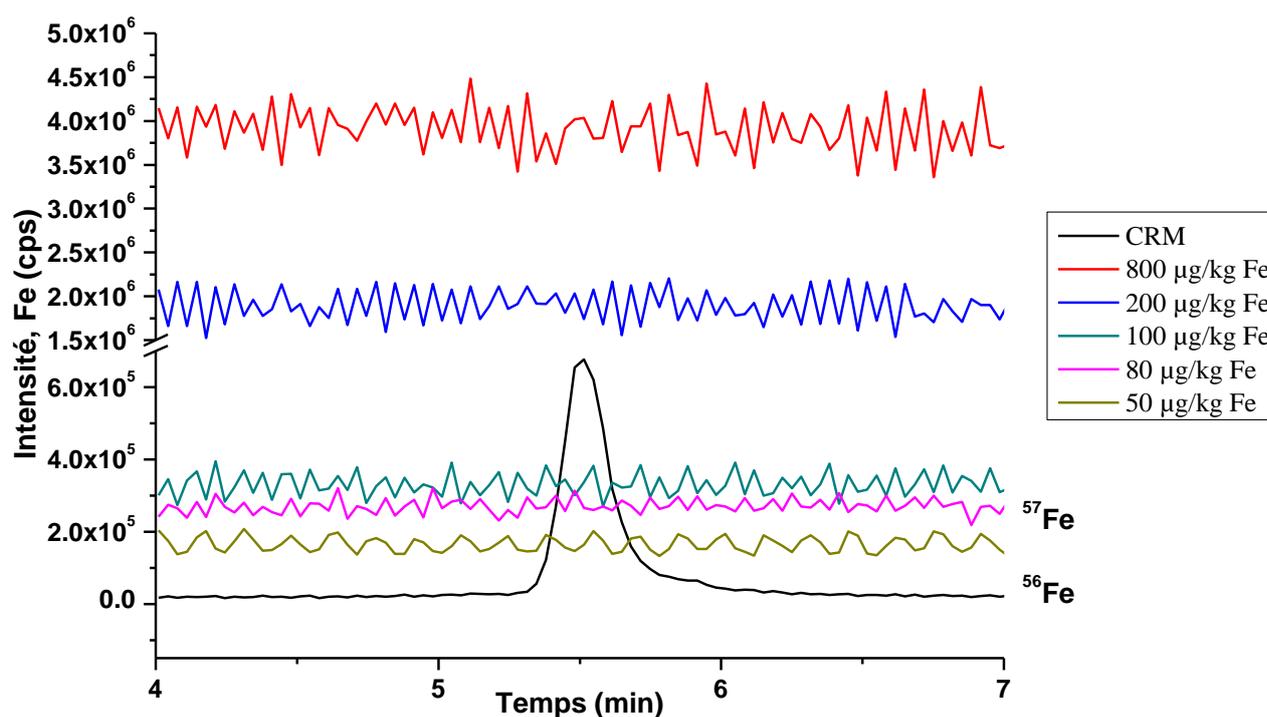
	Masse injectée, $m_{inj}$
Essai 1 (n=6)	0,0502 ± 0,0008 g ; RSD 1,7 %
Essai 2 (n=9)	0,0495 ± 0,0006 g ; RSD 1,3 %
<b>Moyenne (n=15)</b>	<b>0,0498 ± 0,0008 g ; RSD 1,5 %</b>

Ensuite, le **débit continu d'étalon marqué** ( $f_{sp}$ ) est fixé par la pompe péristaltique. Cette pompe est choisie afin d'obtenir un signal stable et continu. Le choix entre deux pompes péristaltiques s'est imposé et celle qui a été retenue est la pompe de chez Gilson. En effet, le signal obtenu avec l'autre pompe n'était pas stable et diminuait au cours du temps. De plus, il est nécessaire d'évaluer le débit exact fourni avec la pompe péristaltique. Pour cela, avant et après chaque séquence d'analyse, des volumes sont collectés et pesés sur des durées différentes (par exemple : 3, 5, 7 et 10 min) avec la pompe péristaltique réglée pour un débit autour de 0,1 mL.min<sup>-1</sup>. Sur tous les essais effectués, une valeur moyenne de 0,1044 ± 0,0016 g.min<sup>-1</sup> est obtenue. Le coefficient de variation du débit sur un essai est de l'ordre de 1 %.

Un autre paramètre concerne la nature de la **solution d'étalon marqué** injectée en continu. Tout d'abord, étant donné que nous avons à notre disposition plusieurs matériaux enrichis en Fe, un choix a été effectué pour l'isotope majoritaire de l'étalon marqué : soit  $^{57}\text{Fe}$  soit  $^{54}\text{Fe}$ . Après avoir réalisé quatre répliquats d'analyse avec un étalon marqué en  $^{54}\text{Fe}$  et quatre autres répliquats d'analyse avec un **étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$** , une différence de biais d'environ 10 % est observée entre ces deux essais. L'utilisation de l'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  donnant le biais le moins élevé a donc été choisi.

Différents milieux de dilution de l'étalon marqué ont également été évalués. Les dilutions des solutions mères d'étalon marqué effectuées dans un tampon **citrate de sodium à 25 mM à pH 4,0** plutôt que dans une solution d'eau acidifiée à 2 % d' $\text{HNO}_3$ , donnent un signal plus stable au cours du temps. Dans ce cas la masse volumique de l'étalon marqué est environ égale à 1.

Enfin, la **concentration de la solution de l'étalon marqué ( $W_{\text{sp}}$ )** a été déterminée afin que le rapport isotopique  $R_m$  soit d'environ 1. La **Figure 61** montre les différents signaux obtenus suivant la concentration de l'étalon marqué injectée comprise entre 800 et 50  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  Fe. La concentration de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  Fe pour la solution de l'étalon marqué est retenue ( $R_m \approx 1$  **Figure 63**).



**Figure 61 : Chromatogrammes représentant les intensités obtenues suivant les différentes concentrations de l'étalon marqué injectées en comparaison avec le CRM à 50  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  Hb.**

Pour finir, une **correction du biais en masse (k)** est effectuée afin de corriger les éventuelles dérives de l'appareil tout au long des analyses. Pour cela, une comparaison entre une solution de  $^{56}\text{Fe}$  de haute pureté (BNM-001) et une solution d'étalon d'Hb d'abondance isotopique naturelle, est effectuée. La solution de  $^{56}\text{Fe}$  est choisie car les rapports isotopiques  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$  sont plus stables et cela

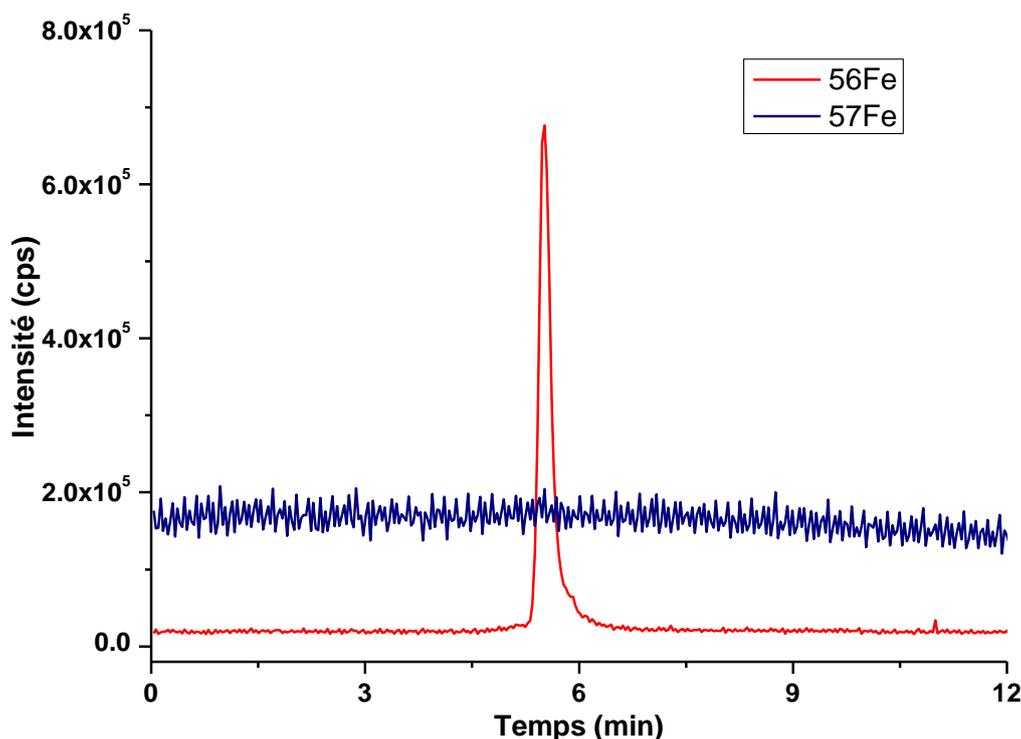
permet d'éviter de contaminer la colonne d'échange d'anions par Hb. La valeur moyenne obtenue pour  $k$  sur une journée est de  $1,039 \pm 0,039$ .

Les conditions de la méthode développée par ID en mode *post-colonne* pour l'analyse de l'Hb totale dans l'hémolysat sont les suivantes : une solution d'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  ( $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  Fe dans 25 mM citrate de sodium/acide citrique, pH 4,0) est ajoutée en continu (débit  $0,1 \text{ mL.min}^{-1}$ ) avec une pompe péristaltique après la séparation chromatographique, afin d'obtenir un signal stable (voir **Tableau 57**). Pour la quantification de la solution d'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$ , une ID inverse est effectuée en utilisant un étalon de haute pureté en Fe naturel (BNM-001) comme expliqué dans le Chapitre 2 (paragraphe 1.4).

**Tableau 57 : Récapitulatif des différents paramètres utilisés pour la mise en place de l'ID en mode *post-colonne* pour l'analyse de l'Hb totale.**

Paramètre de détection	$^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$
<b>Injection directe</b>	Dilution de l'échantillon dans tampon Tris (10 mM Tris, pH 7,5 – 8,0) Concentration injectée $40 - 60 \text{ mg.kg}^{-1}$ Hb ( $150 - 200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ Fe)
<b>Boucle d'injection</b>	$50 \mu\text{L}$ ( $0,0498 \pm 0,0008 \text{ g}$ )
<b>Pompe péristaltique</b>	Pompe Multipuls Débit $0,10 \text{ mL.min}^{-1}$ Caractérisation pour chaque essai Moyenne de ( $0,1044 \pm 0,0016$ ) $\text{mL.min}^{-1}$ , RSD 1%
<b>Etalon marqué inorganique</b>	Solution en $^{57}\text{Fe}$ préparée dans un tampon (25 mM citrate de sodium, pH 4,0) Concentration $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ Fe (caractérisée par ID inverse – ICPMS) $W_{\text{moyenne}} = (49,6 \pm 2,7) \mu\text{g.kg}^{-1}$ Fe
<b>Biais en masse</b>	Solution de $^{56}\text{Fe}$ à $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ Fe (BNM-001)

Par ailleurs, il est nécessaire d'effectuer un traitement des données afin d'arriver à déterminer la concentration finale de l'échantillon en appliquant l'ID en mode *post-colonne*. Par exemple, la **Figure 62** représente le chromatogramme correspondant à la séparation de l'Hb totale dans de l'hémolysat humain (JCCRM 912-1L). Le pic apparaît pour un rapport  $m/z$  de 56 correspondant au Fe lié à l'Hb séparée en échange d'anions et le rapport  $m/z$  de 57 correspond au signal de la solution de Fe enrichie en  $^{57}\text{Fe}$  ajoutée en continu à la sortie de la colonne chromatographique.



**Figure 62** : Chromatogramme d'intensités du JCCRM 912-1L à 50 mg.kg<sup>-1</sup> Hb par analyse *post-colonne* ID-HPLC-ICP-MS.

Comme nous l'avons vu à l'aide des **équations 41 à 45**, pour effectuer la quantification du Fe présent dans le pic chromatographique, le chromatogramme d'intensités (en cps) doit être converti en un chromatogramme de débit massique (ng.min<sup>-1</sup>) à travers une série d'opérations appliquée à chaque point du chromatogramme. Expérimentalement, le chromatogramme d'intensités présenté dans la **Figure 62** a été converti, d'abord, en un chromatogramme de rapports isotopiques (**Figure 63**), en utilisant les étapes suivantes:

#### 1/ Correction du temps mort du détecteur

Dans les mesures chromatographiques d'intensités variables, il est possible que les effets du temps mort du détecteur affectent différemment les zones proches de la ligne de base (de faible intensité) par rapport aux zones où le maximum du pic chromatographique est atteint. Il est donc nécessaire de faire une correction mathématique pour tous les points du chromatogramme. Cette correction est réalisée automatiquement par les logiciels des ICPMS (Chapitre 2, paragraphe 1.3.2.1).

#### 2/ Filtrage des données du chromatogramme

Afin de minimiser le bruit de fond du chromatogramme, les données ont été soumises à un filtre de type « moyenne mobile » (valeur moyenne pour n = 5).

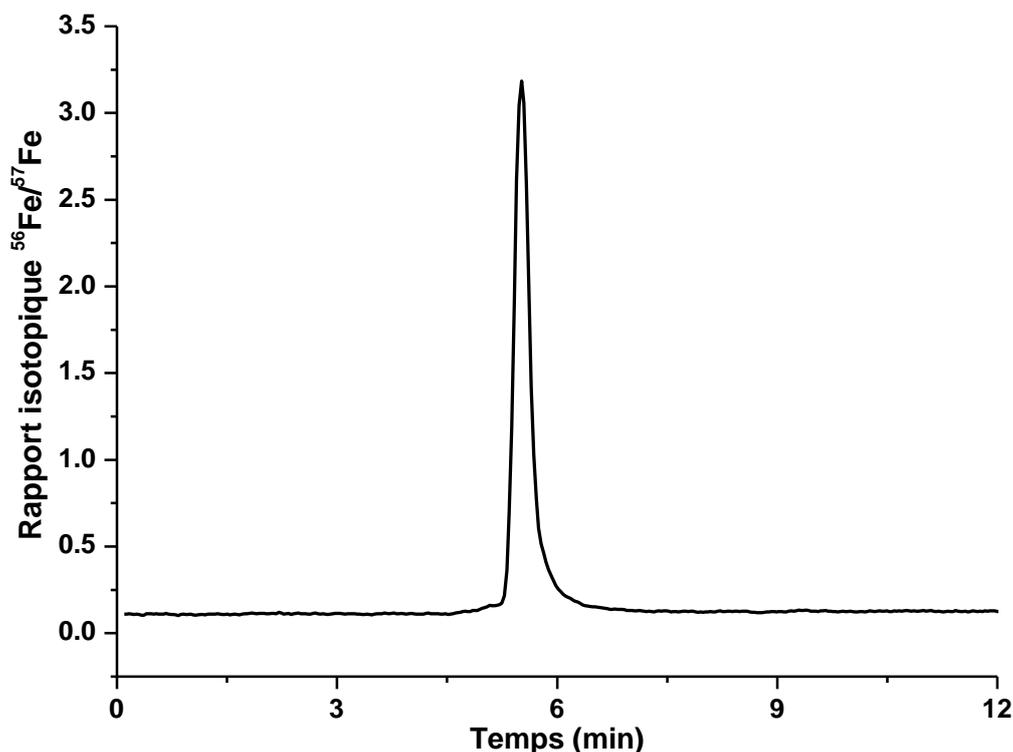
#### 3/ Calcul du rapport isotopique initial

Pour appliquer l'équation de l'ID (**Equation 45**), nous calculons à chaque point du chromatogramme le rapport  $R_m$  (<sup>56</sup>Fe/<sup>57</sup>Fe).

#### 4/ Correction du biais en masse

Cette étape consiste à corriger le rapport isotopique  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ , en tenant compte du biais en masse à chaque point du chromatogramme. La moyenne du biais en masse obtenue est de  $(1,039 \pm 0,039)$  par unité de masse (pour une durée de 8h d'analyse) en utilisant un étalon de Fe naturel.

Ainsi, le « chromatogramme de rapport isotopique » obtenu à l'issue de cette série d'opérations mathématiques appliquées à chaque point du chromatogramme est représenté par la **Figure 63**.



**Figure 63** : Chromatogramme du rapport isotopique  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$  du JCCRM 912-1L à  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  Hb par analyse *post-colonne* ID-HPLC-ICPMS.

Enfin, pour chaque point de ce chromatogramme, est appliquée l'équation de la dilution isotopique (**Equation 45**), pour obtenir le chromatogramme de débit massique (**Figure 64**) dans lequel l'intégration du pic chromatographique permet de quantifier la teneur en Fe dans l'Hb.

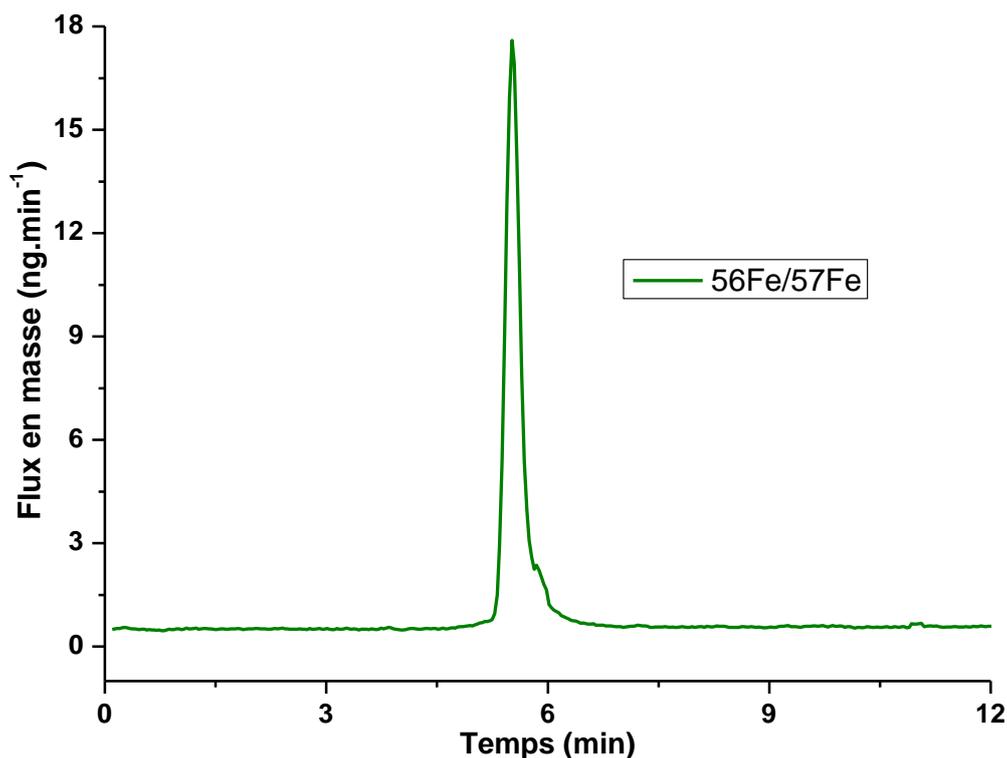


Figure 64 : Chromatogramme de débit massique du JCCRM 912-1L à 50 mg.kg<sup>-1</sup> Hb.

La fraction massique en Fe dans l'échantillon est obtenue par intégration de l'aire du pic, à l'aide du logiciel Origin 7.5 (Microcal Software Inc. Northampton, MA, USA), divisée par la masse injectée dans le système chromatographique ( $m_{inj}$  en g). Finalement, la concentration en Hb ( $C_s$  en g.L<sup>-1</sup> Hb) dans l'échantillon est calculée à partir de l'équation 46 qui prend en compte le facteur de dilution ( $F$ ), la masse volumique ( $\rho_s$  égale à 1,039 g.mL<sup>-1</sup>) ainsi que la stœchiométrie de la molécule d'intérêt ((4Fe)Hb).

$$C_s = \frac{Aire}{m_{inj}} \cdot F \cdot \rho_s \cdot \frac{1 \cdot M_{Hb}}{4 \cdot M_{Fe}} \quad \text{Équation 46}$$

Comme l'aire correspond à l'intégration du pic obtenu pour l'application de l'équation 45 du débit massique, alors l'équation finale en prenant en compte l'équation 46 devient :

$$C_s = \frac{W_{sp} \rho_{sp} f_{sp} \frac{M_s}{M_{sp}} \left( \frac{k A_{sp}^b R_m - A_{sp}^a}{A_s^a - R_m k A_s^b} \right)}{m_{inj}} \cdot F \cdot \rho_s \cdot \frac{1 \cdot M_{Hb}}{4 \cdot M_{Fe}} \quad \text{Équation 47}$$

### 2.6.3.1.2. Evaluation des incertitudes

Comme pour les autres méthodes de quantification, le calcul de l'incertitude sur les mesures est effectué. La démarche adoptée est similaire à celle réalisée pour la double ID classique, expliquée

dans le Chapitre 2 (paragraphe 1.7). Après avoir défini l'écriture du modèle mathématique correspondant à la détermination de l'Hb totale par ID en mode *post-colonne* (Equation 47) ainsi qu'évaluer les incertitudes-types de chaque grandeur d'entrée, l'incertitude-type composée du résultat,  $u_{CS}$ , est calculée à partir du logiciel Wincert. Le résultat est accompagné de son incertitude élargie,  $U$ , calculée avec un facteur d'élargissement,  $k$ , égal à 2.

### 2.6.3.1.3. Résultat

Les analyses ont été effectuées sur les trois niveaux de concentration d'Hb du matériau d'hémolysat certifié (JCCRM 912-1). Pour chaque niveau 3 déterminations ont été réalisées avec à chaque fois plusieurs réplicats. Les résultats sont répertoriés dans le **Tableau 58**.

**Tableau 58 : Résultats de l'analyse du CRM JCCRM 912-1 par ID-HPLC-ICPMS en mode *post-colonne*.**

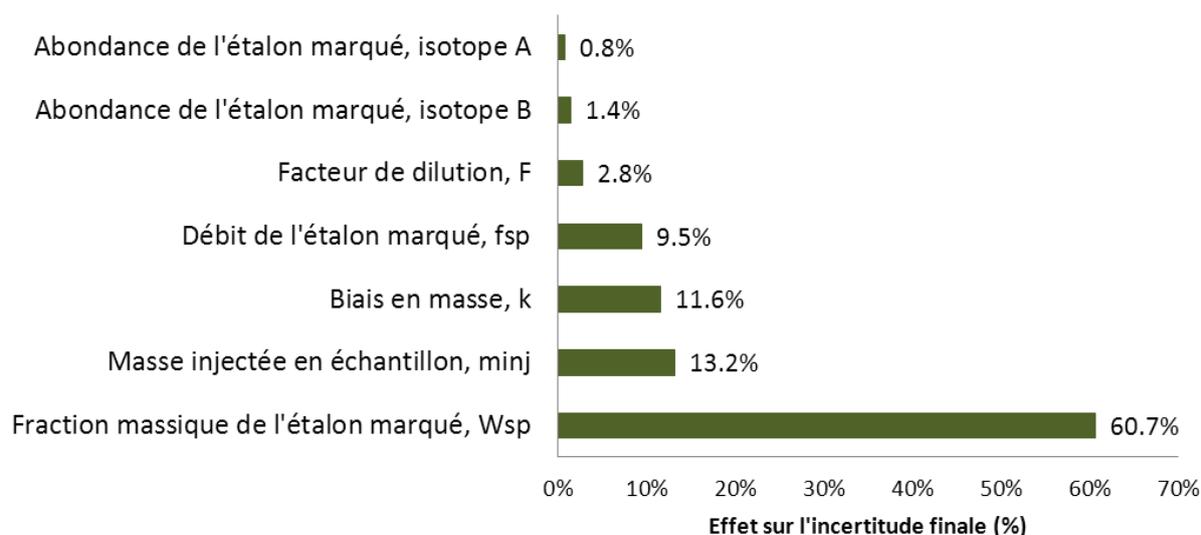
		Fe, mg.L <sup>-1</sup> (k=2)	Hb, g.L <sup>-1</sup> (k=2)	Hb (certifiée) g.L <sup>-1</sup> (k=2)	Erreur relative (%)
<b>JCCRM 912-1L</b>	Essai 1 (n=3)	246,4 ± 30,8	71,1 ± 8,9	<b>80,7 ± 1,0</b>	- 12
	Essai 2 (n=3)	254,7 ± 24,6	73,5 ± 7,1		- 9
	Essai 3 (n=4)	236,3 ± 24,3	68,2 ± 6,0		- 16
	<b>Moyenne (n=10)</b>	<b>245,8 ± 30,8</b>	<b>70,9 ± 8,9</b>		<b>- 12 ± 4</b>
<b>JCCRM 912-1M</b>	Essai 1 (n=3)	432,5 ± 58,6	124,8 ± 16,9	<b>136,7 ± 1,6</b>	- 9
	Essai 2 (n=4)	396,8 ± 26,7	114,5 ± 7,7		- 16
	Essai 3 (n=3)	391,9 ± 48,2	113,1 ± 13,9		- 17
	<b>Moyenne (n=10)</b>	<b>406,2 ± 58,6</b>	<b>117,2 ± 16,9</b>		<b>- 14 ± 5</b>
<b>JCCRM 912-1H</b>	Essai 1 (n=4)	536,8 ± 48,5	154,9 ± 14,0	<b>185,7 ± 2,2</b>	- 17
	Essai 2 (n=4)	559,7 ± 13,6	161,5 ± 14,9		- 13
	Essai 3 (n=4)	591,6 ± 39,9	170,7 ± 11,5		- 8
	<b>Moyenne (n=12)</b>	<b>564,5 ± 51,6</b>	<b>162,3 ± 14,9</b>		<b>- 13 ± 4</b>

Une erreur relative négative moyenne de 13 % est observée ce qui est acceptable. La présence d'une erreur relative négative peut s'expliquer par un recouvrement incomplet de la molécule ((4Fe)Hb). La précision des mesures est satisfaisante. En effet, le RSD inter essai est égale à 5 % et le RSD intra essai est de 2 % quel que soit le niveau de concentration. Le **Tableau 59** récapitule les résultats sur la précision des mesures en prenant en compte les paramètres inter et intra essais.

**Tableau 59 : Précisions inter et intra essais des mesures effectuées par ID en mode *post-colonne* sur le CRM JCCRM 912-1.**

	JCCRM 912-1L	JCCRM 912-1M	JCCRM 912-1H	Moyenne
<b>Précision intra essai (n=3-4)</b>				
- SD	1,1 g.L <sup>-1</sup> Hb	1,6 g.L <sup>-1</sup> Hb	3,1 g.L <sup>-1</sup> Hb	<b>1,9 g.L<sup>-1</sup> Hb</b>
- RSD	2 %	1 %	2 %	<b>2 %</b>
<b>Précision inter essai (n=10-12)</b>				
- SD	2,7 g.L <sup>-1</sup> Hb	5,5 g.L <sup>-1</sup> Hb	7,5 g.L <sup>-1</sup> Hb	<b>5,2 g.L<sup>-1</sup> Hb</b>
- RSD	4 %	5 %	5 %	<b>5 %</b>

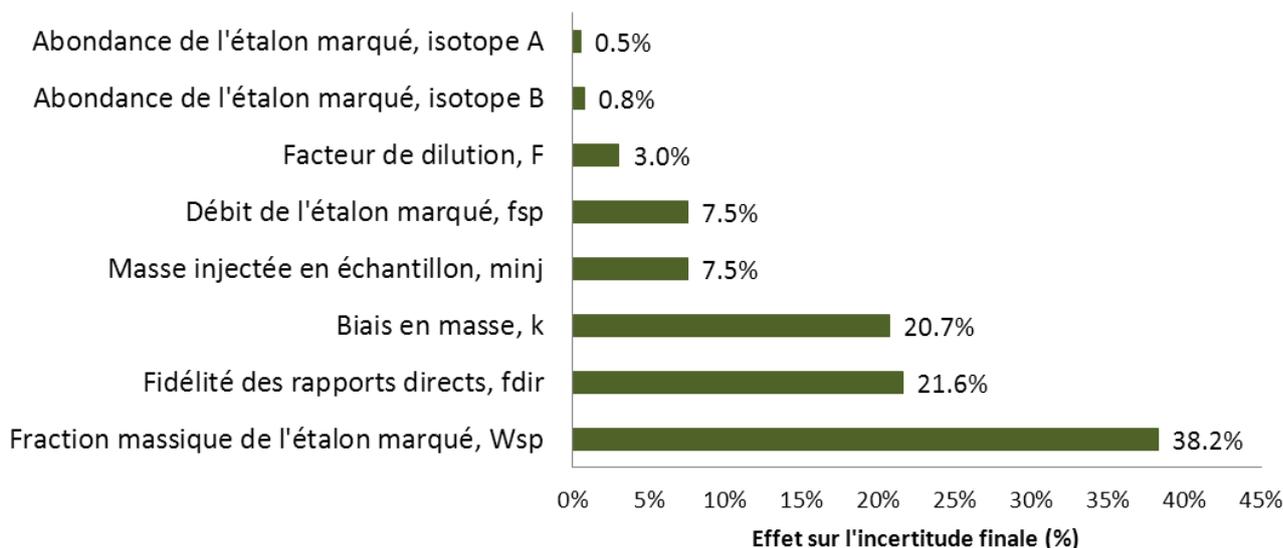
L'incertitude finale obtenue pour la détermination de l'Hb par ID en mode *post-colonne* dans le CRM JCCRM 912-1 représente 12 % du résultat final, ce qui est convenable au vu des nombreux paramètres impliqués pour ce type de mesure. La **Figure 65** représente la répartition des différentes composantes utilisées dans le calcul de l'incertitude sur une mesure. La contribution la plus importante sur l'incertitude ( $\approx 61\%$ ) correspond à la fraction massique de l'étalon marqué. En effet, cette concentration est déterminée en amont par ID inverse d'où une incertitude liée à ce résultat qui est ajoutée à celle du résultat final.

**Figure 65 : Répartition du poids des différents paramètres de l'incertitude finale sur une détermination.**

Cependant, lorsque la valeur finale est calculée sur la base de plusieurs réplicats (ici n=4), la fidélité ( $f_{dir}$ ) doit être prise en compte. Ainsi cette variable est prise en compte dans le calcul de la concentration finale. L'**équation 48** est donc une adaptation de l'**équation 47**.

$$C_s = \frac{W_{sp} \rho_{sp} f_{sp} \frac{M_s}{M_{sp}} \left( \frac{k A_{sp}^b R_m - A_{sp}^a}{A_s^a - R_m k A_s^b} \right)}{m_{inj}} \cdot F \cdot \rho_s \cdot \frac{1 \cdot M_{Hb}}{4 \cdot M_{Fe}} + f_{dir} \quad \text{Équation 48}$$

La **Figure 66** représente la répartition des différentes contributions sur l'incertitude finale lors de plusieurs déterminations. Dans ce cas, la contribution la plus importante sur l'incertitude correspond aussi à la fraction massique de l'étalon marqué mais de l'ordre de 38 %. La fidélité des mesures du rapport isotopique  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$  ainsi que le biais en masse sont des facteurs aussi influents sur l'incertitude finale avec un poids d'environ 20 % chacun.



**Figure 66 : Répartition du poids des différents paramètres de l'incertitude finale sur plusieurs déterminations.**

#### 2.6.3.1.4. Conclusion

Les résultats sur la quantification du CRM JCCRM 912-1 par ID en mode *post-colonne* ICPMS par colonne d'échange d'anions effectués sont améliorés par rapport à ceux obtenus par ajouts dosés. Le **Tableau 60** récapitule les résultats obtenus par ajouts dosés et par ID pour l'échantillon JCCRM 912-1L. En effet, **l'erreur relative obtenue sur l'analyse du CRM est de - 12 % au lieu de + 16 % par ajouts dosés**. Une amélioration du RSD inter essai est observée diminuant de 10 % à 4 %. Enfin les incertitudes finales par ID en mode *post-colonne* et par ajouts dosés sont comparables.

**Tableau 60 : Récapitulatif des résultats obtenus sur l'analyse du JCCRM 912-1L par ajouts dosés et par ID en mode post-colonne en utilisant une séparation par échange d'anions et une détection par ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{57}\text{Fe}$ ).**

	<b>Ajouts dosés</b>	<b>Post-colonne</b>
<b>Valeur moyenne CRM</b>	<b>93,7 ± 12,6 g.L<sup>-1</sup> Hb</b>	<b>70,9 ± 8,9 g.L<sup>-1</sup> Hb</b>
<b>Erreur relative</b>	+ 16 %	- 12 %
<b>Incertitude</b>	13 %	13 %
<b>Précision intra essai (n=3-4)</b>		
- SD	3 g.L <sup>-1</sup> Hb	1 g.L <sup>-1</sup> Hb
- RSD	3 %	2 %
<b>Précision inter essai (n=9-12)</b>		
- SD	10 g.L <sup>-1</sup> Hb	3 g.L <sup>-1</sup> Hb
- RSD	10 %	4 %

Ces résultats mettent en avant **la nécessité de développer une méthode de dilution isotopique spécifique en HPLC-ICPMS** permettant de compenser et de corriger les pertes ou transformations durant la séparation chromatographique.

### 2.6.3.2. Mode spécifique

Cette méthode consiste à quantifier l'Hb en utilisant un étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  d'Hb. Etant la méthode ayant potentiellement les plus hautes performances métrologiques, elle est la seule à répondre à la définition de méthode primaire. Cependant, plusieurs conditions doivent être réunies afin d'assurer la traçabilité des résultats :

- Utilisation d'un étalon marqué de l'analyte d'intérêt, caractérisé en isotopie et en fraction massique
- Utilisation d'un étalon naturel (considéré comme étalon primaire), pour quantifier l'étalon marqué, parfaitement caractérisé en pureté (**Figure 67A**).

Or, il n'existe pas d'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  d'Hb. Il est donc nécessaire de le synthétiser et de le caractériser en abondance isotopique, en concentration et en stabilité (**Figure 67B**). En plus, l'étalon marqué synthétisé doit être quantifié en utilisant un étalon de la même espèce (Fe-Hb). Si dans la double ID classique on utilise des métaux de haute pureté comme étalon primaire (par exemple : Fe BNM-001), dans l'ID en mode spécifique, on doit utiliser des étalons « spécifiques » de l'espèce à doser (l'Hb).

<p><b>A</b> Étalon en Hb : H7379 (Sigma Aldrich)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>→ Détermination de la fraction massique d'eau</li> <li>→ Détermination de la concentration en Hb totale</li> <li>→ Caractérisation en teneur de Fe</li> </ul>	<p><b>B</b> Étalon enrichi en <math>^{57}\text{Fe}</math> d'Hb : Synthétisé</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>→ Caractérisation en abondance isotopique</li> <li>→ Détermination des impuretés</li> <li>→ Evaluation de la stabilité</li> </ul>
---	--

**Figure 67 : Caractérisations de l'étalon et étalon marqué d'Hb utilisé pour l'application de l'ID en mode spécifique.**

#### 2.6.3.2.1. Caractérisation de l'étalon d'Hb

Dans un premier temps il est nécessaire de caractériser l'étalon d'Hb qui sera utilisé pour la synthèse de l'étalon marqué et la mise en place de l'ID en mode spécifique. Afin de synthétiser le composé le plus spécifique possible, il est donc nécessaire de connaître la pureté de l'étalon utilisé avec précision. Ainsi différentes caractérisation sont effectuées :

- Détermination de la fraction massique d'eau
- Détermination de la concentration en Hb par spectrophotométrie en utilisant la méthode AHD et par double (Fe)-ID-ICPMS en s'intéressant à la teneur en Fe de l'étalon
- Détermination de la présence d'espèces autre que l'Hb par LC-MS/MS et par HPLC-ICPMS

### Détermination de la fraction massique d'eau

La détermination de l'eau dans l'échantillon est effectuée par titrage coulométrique par le système Karl Fisher à différentes températures ou par séchage au dessiccateur par  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Les protocoles utilisés sont donnés en Annexe 4.

En ce qui concerne le titrage coulométrique, deux répliquats indépendants ont été analysés dont les résultats sont présentés dans le **Tableau 61**. Les fractions massiques sont comparables pour les 3 températures évaluées. La teneur moyenne d'eau dans notre étalon est de  $(0,080 \pm 0,002) \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ . Ainsi la pureté de notre étalon en prenant en compte la fraction massique d'eau est de  $(92,00 \pm 0,20) \%$  ( $k=1$ ).

**Tableau 61 : Résultats de la fraction massique d'eau contenue dans l'étalon d'Hb (H7379) par un titrage coulométrique.**

Températures	Fraction massique en eau, $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ ( $k=1$ )	Valeur moyenne en eau, $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ ( $k=1$ )	Teneur en Hb, %	Valeur moyenne, %
100°C	$0,082 \pm 0,001$		$91,79 \pm 0,01$	
120°C	$0,081 \pm 0,001$	<b><math>0,080 \pm 0,002</math></b>	$91,95 \pm 0,14$	<b><math>92,00 \pm 0,20</math></b>
150°C	$0,077 \pm 0,003$		$92,27 \pm 0,26$	

Dans un second temps, la fraction massique d'eau est calculée par séchage de l'échantillon solide au dessiccateur avec  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Les résultats obtenus avec différentes prises d'essais de l'étalon d'Hb (H7379) sont présentés dans le **Tableau 62**. La teneur moyenne de masse sèche d'Hb est de  $(92,26 \pm 0,17) \%$ . Cette valeur est comparable avec celle obtenue par titrage coulométrique. Le RSD obtenu étant égal à 1,8 %, il n'y a pas de différence significative entre chaque prise d'essais. De plus, ces essais ont été réalisés sur une période de 6 mois ainsi ces résultats montrent que la teneur en eau dans l'étalon est stable sur plusieurs mois.

**Tableau 62 : Résultats de la fraction massique d'eau contenue dans l'étalon d'Hb (H7379) par séchage au dessiccateur ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ).**

Prises d'essai	Teneur en Hb, %	Incertitudes type, %	Valeur moyenne, %
19 mg	93,40	0,26	
25 mg	91,12	0,01	
19 mg	90,61	0,07	<b><math>92,26 \pm 0,17</math></b>
20 mg	93,93	0,21	

La valeur moyenne de fraction sèche d'étalon d'Hb obtenue avec les deux méthodes est de  $(92,1 \pm 0,2) \%$  ( $k=1$ ), ce qui signifie qu'il y a 8 % d'eau dans cet étalon. La teneur en eau indiquée dans le certificat d'analyse de l'étalon fourni par Sigma indique une teneur inférieure à 15 % en eau dans l'échantillon. Nos résultats sont donc cohérents avec ce certificat.

### **Détermination de la concentration en Hb par spectrophotométrie et par (Fe)-ID-ICPMS**

Cette partie sert à évaluer la concentration en Hb de l'étalon par deux méthodes différentes : la méthode AHD par spectrophotométrie et la méthode développée précédemment par analyse de la teneur en Fe par ID-ICPMS de l'échantillon en prenant en compte la stœchiométrie de la molécule d'intérêt (4Fe)Hb (méthode développée dans le paragraphe 1).

#### - Détermination de l'Hb totale par spectrophotométrie

##### ***Protocole***

Le spectromètre utilisé est le Lambda 25, UV/VIS *Spectrometer* (Perkin Elmer, Etats-Unis). Cette méthode AHD est une alternative à la méthode de référence HiCN. En effet, le réactif AHD permet de convertir les espèces d'Hb en hématine alcaline (AH). La détection de l'absorbance se fait à 574 nm et la concentration en Hb est calculée à partir de l'équation ci-dessous :

$$C_{Hb} = \frac{A_{AHD}^{574} \cdot M \cdot F}{\epsilon_{AHD}^{574} \cdot l \cdot 1000} \quad \text{Équation 49}$$

Avec :

- $C_{Hb}$  représente la concentration en Hb de l'échantillon en g.L<sup>-1</sup>
- $A_{AHD}^{574}$  est l'absorbance mesurée de la solution à 574 nm
- $M$  correspond à la masse moléculaire relative d'un monomère d'Hb (64458/4=16114,5)
- $F$  est le facteur de dilution utilisé
- $\epsilon_{AHD}^{574}$  correspond au coefficient d'extinction molaire qui est égal à 6,945 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>
- $l$  correspond à la longueur du trajet lumineux en cm (1cm)
- 1000 facteur de conversion de mg à g [147]

La méthode AHD a été mise en place. Le spectromètre est étalonné avec deux points de contrôle correspondant à une valeur en Hb de 60 g.L<sup>-1</sup> Hb et de 150 g.L<sup>-1</sup> Hb (Kit Haemodirect®). Pour cela, 10 µL de solution de point de contrôle sont mélangés à 1,5 mL de réactif AHD pendant 1 minute et la lecture UV est réalisée immédiatement à 574 nm. Chaque point de contrôle est analysé trois fois. Une erreur de 6 % est tolérée pour chaque point de contrôle.

Un CRM en Hb totale est également analysé afin de vérifier le biais de la méthode. Le CRM JCCRM 912-1 de niveau moyen (136,7 g.L<sup>-1</sup> Hb) est utilisé avec un protocole identique à celui utilisé pour les points de contrôle. Quatre répliqués sont effectués.

Enfin, la solution étalon d'Hb est analysée en trois répliqués (n=3). Deux solutions étalons d'Hb différentes ont été étudiées :

- 1 mg.L<sup>-1</sup> Hb : 25 mg d'Hb dans 25 mL de tampon (10 mM Tris, pH 7,5-8,0)

- 1 mg.L<sup>-1</sup> Hb : 50 mg d'Hb dans 50 mL de tampon (10 mM Tris, pH 7,5-8,0)

Ces solutions ayant une concentration plus faible que les points de contrôle, la préparation d'échantillon pour l'analyse est adaptée (240 µL de solution pour 600 µL de réactif).

### Résultats

Le **Tableau 63** montre la valeur moyenne obtenue pour l'analyse du CRM.

**Tableau 63 : Résultat de l'analyse de l'échantillon JCCRM 912-1M par spectrophotométrie avec la méthode AHD.**

Absorbance	Concentration (g.L <sup>-1</sup> Hb)	Valeur certifiée (g.L <sup>-1</sup> Hb)	Erreur relative
0,352 ± 0,005	123,2 ± 1,6	136,7 ± 1,6	-10%

Ces analyses mettent en évidence qu'il y a une erreur de 10 % due à la méthode. Ensuite différentes solutions étalons d'Hb à 1 mg.g<sup>-1</sup> Hb sont analysées, où, deux réplicats (n=2) sont effectués pour chaque solution. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 64**.

**Tableau 64 : Résultats des analyses de solutions étalons d'Hb par spectrophotométrie - AHD.**

Échantillons	Absorbance	Fraction massique (mg.g <sup>-1</sup> Hb)	Fraction massique (µg Fe / g Hb)	Fraction massique théorique (µg Fe / g Hb)	Erreur relative (%)
Réplicat 1	0,117 ± 0,001	0,679 ± 0,009	2226 ± 30	3466	- 36
Réplicat 2	0,121 ± 0,001	0,708 ± 0,009	2406 ± 31		- 31
<b>Moyenne</b>	<b>0,119 ± 0,002</b>	<b>0,694 ± 0,015</b>	<b>2316 ± 90</b>		<b>- 33 ± 3</b>

Une valeur moyenne de (2316 ± 90) µg Fe / g Hb (k=1) est évaluée ce qui représente une erreur relative négative de 33% par rapport à la valeur calculée par gravimétrie.

#### - Détermination de l'Hb totale par double (Fe)-ID-ICPMS

L'objectif de cette détermination est de s'assurer que la correspondance entre la teneur en Fe et la concentration en Hb est respectée dans cet étalon d'Hb.

### Protocole

Afin de déterminer la teneur en Hb dans l'étalon à partir de sa teneur en Fe, la méthode développée par double (Fe)-ID-ICPMS dans le paragraphe 1 de ce chapitre est utilisée. Différentes solutions d'étalon d'Hb sont préparées à partir de plusieurs prises d'essai d'étalon d'Hb diluées dans une solution tampon (10 mM Tris, pH 7,5-8,0) afin d'obtenir une concentration comprise entre 0,5 et 1 g.kg<sup>-1</sup> Hb (1,5 – 3,5 mg.kg<sup>-1</sup> Fe). L'application de l'ID met en œuvre la préparation des mélanges « échantillon (représenté par l'étalon d'Hb)-étalon marqué <sup>57</sup>Fe » et « étalon Fe-étalon marqué <sup>57</sup>Fe ». Les mélanges « échantillon-étalon marqué » subissent une digestion acide sous champ micro-ondes. Ces différents mélanges sont analysés par détection ICPMS aux isotopes 56 et 57 du Fe dont les

conditions instrumentales sont présentées dans le Chapitre 2 (**Tableau 19**). La mise en œuvre de la méthode est effectuée sur au moins quatre réplicats ( $n=4$ ) sur une ou plusieurs journées ( $p$ ) différentes d'analyses ( $p$  compris entre 1 et 5).

Par ailleurs, pour déterminer la présence d'espèces contenant du Fe inférieure à 3 kDa dans l'étalon d'Hb, une ultrafiltration est réalisée sur une solution d'Hb à  $1 \text{ g.kg}^{-1}$  Hb préparée avec une prise d'essai de 50 mg d'étalon d'Hb dissous dans 50 mL de solution tampon (10 mM Tris, pH 7,5-8,0). La procédure d'ultrafiltration est identique à celle décrite dans le paragraphe 1.3.2 et utilise les centrifugeuses : Centrifugate Eppendorf 5418 (Eppendorf) et l'Ultracentrifugate Sigma 2-16 PK (Fisher Bioblock). Les différentes fractions sont analysées par (Fe)-ID-ICPMS comme expliqué précédemment.

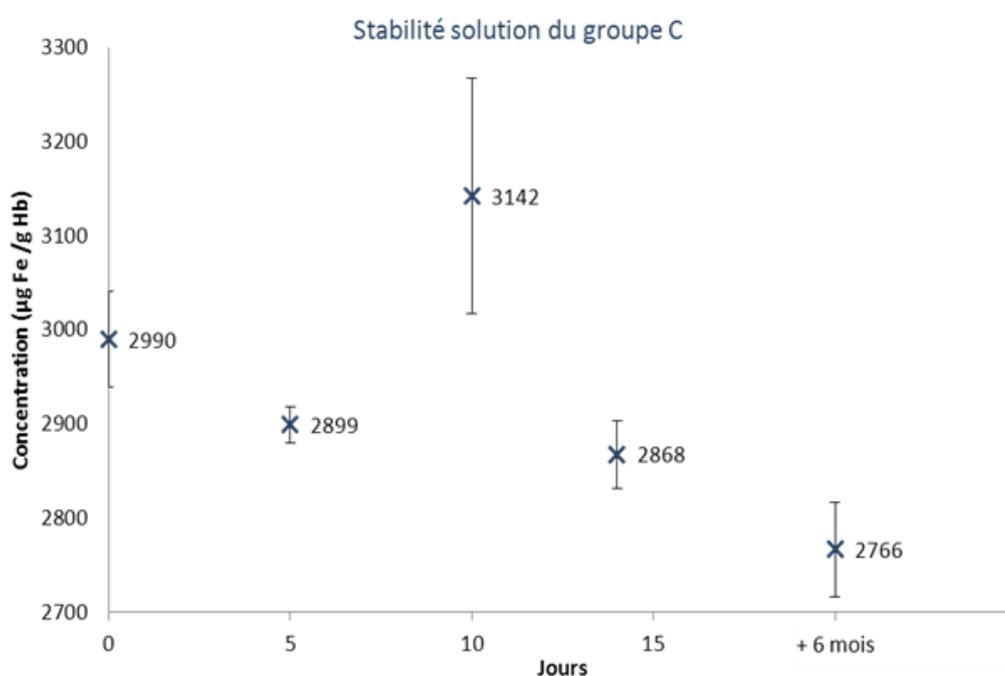
### **Résultats**

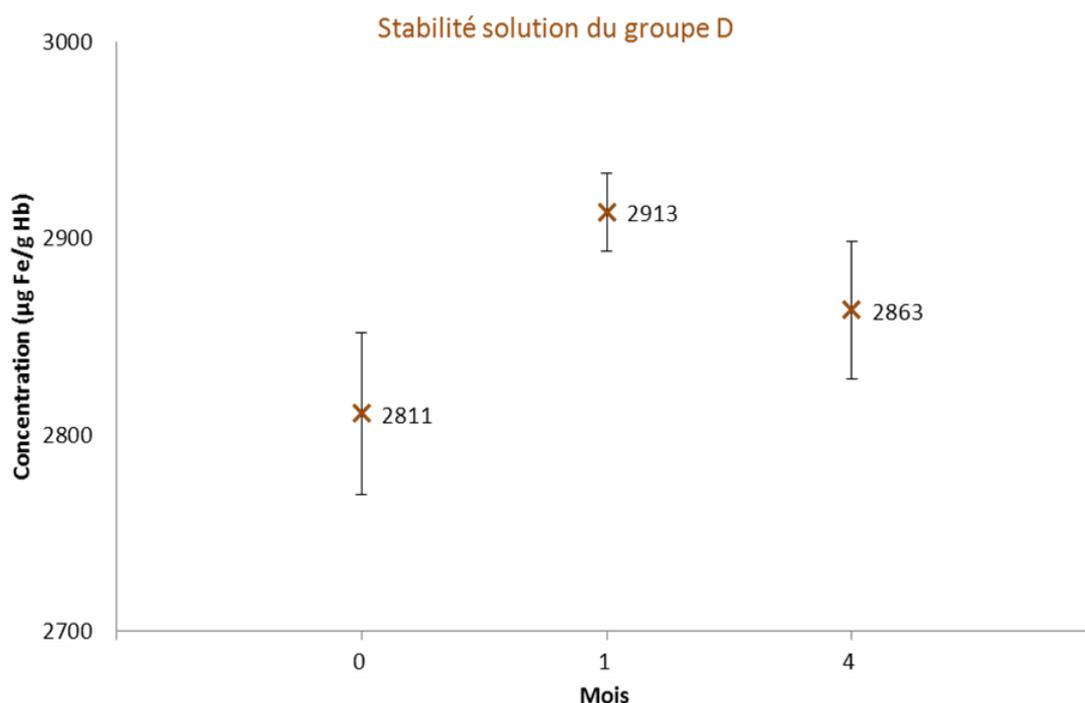
Les résultats sont regroupés dans le **Tableau 65**. Afin de normaliser et de comparer les différentes valeurs puisque les concentrations et les prises d'essais de l'échantillon sont diverses, les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g Fe} / \text{g Hb}$ . Les résultats sont divisés en quatre groupes distincts (A, B, C et D) en prenant en compte le critère de la prise d'essai d'étalon d'Hb. Le groupe A correspond aux résultats de l'analyse de solutions d'étalon d'Hb préparées en utilisant une prise d'essai d'1 mg d'Hb. La valeur moyenne obtenue pour ce groupe est de  $(3493 \pm 82) \mu\text{g Fe} / \text{g Hb}$ . Une dispersion des résultats très importante est observée avec un RSD de 12 % cela peut s'expliquer par la faible teneur de la prise d'essai. Le groupe B correspond à des analyses effectuées sans mise en solution au préalable. L'ID est réalisée directement sur la poudre d'étalon d'Hb. La valeur moyenne obtenue est plus faible, elle est de  $(2956 \pm 85) \mu\text{g Fe} / \text{g Hb}$ . Les deux autres groupes restants (C et D) correspondent à l'analyse d'une solution d'Hb préparée avec une prise d'essai plus importante (25 mg pour le groupe C et 50 mg pour le groupe D) et un volume aussi plus important (25 ml pour le groupe C et 50 mL pour le groupe D). Les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur que celle obtenue pour le groupe B. De plus, la dispersion des résultats est beaucoup plus satisfaisante ( $\text{RSD} \leq 5\%$ ) par rapport au groupe A où la prise d'essai était plus faible. Ainsi la valeur moyenne obtenue pour tous ces essais est de  $(3061 \pm 86) \mu\text{g Fe} / \text{g Hb}$  avec un RSD de 7 %. Or théoriquement, la valeur en Fe pour 1 g d'Hb est de 3466  $\mu\text{g}$  de Fe. **Une erreur relative de – 12 % est donc observée entre la valeur obtenue par analyse (Fe)-ID-ICPMS et la valeur théorique.**

**Tableau 65 : Résultats de l'analyse de la solution étalon d'Hb par (Fe)-ID-ICPMS selon différentes préparations d'échantillons.**

Préparation de la solution étalon d'Hb			Analyse par (Fe)-ID-ICPMS		
Groupe	Prise d'essai	Fraction massique de la solution	Nombre de mesures	Valeur moyenne ( $\mu\text{g Fe / g Hb}$ , $k=2$ )	RSD inter essai
A	1 mg Hb	1 g.kg <sup>-1</sup> Hb	(n×p = 12)	3493 ± 82	12 %
B	20 mg / 50 mg sans mise en solution	0,5 g.kg <sup>-1</sup> Hb	(n×p = 4)	2956 ± 85	-
C	25 mg Hb	1 g.kg <sup>-1</sup> Hb	(n×p = 20)	2933 ± 112	5 %
D	50 mg Hb	1 g.kg <sup>-1</sup> Hb	(n×p = 12)	2862 ± 64	2 %
<b>Moyenne</b>				<b>3061 ± 86</b>	<b>7 %</b>

Une **étude de stabilité** a été réalisée sur les solutions des groupes C et D. Les solutions réalisées ont été stockées sous différents aliquots à -20°C et analysées sur une durée de 6 mois. La **Figure 68** regroupe les résultats obtenus pour les stabilités des solutions des deux groupes. On constate qu'il y a peu de dispersion entre les différents essais même après plusieurs mois. Cependant, une tendance légèrement à la baisse est observée sur la valeur obtenue au bout de 6 mois pour la solution du groupe C.





**Figure 68 : Stabilité de solutions d'étalon d'Hb à 1 mg.g<sup>-1</sup> Hb utilisés pour les analyses par (Fe)-ID-ICPMS des groupes C et D sur une durée de 6 mois.**

Enfin, la détermination de la **présence d'espèces contenant du Fe inférieure à 3 kDa** est effectuée en réalisant un traitement par ultrafiltration à 3 kDa sur une solution étalon d'Hb à 1 g.kg<sup>-1</sup> Hb. Les différentes fractions obtenues en étalon d'Hb sont analysées par la méthode (Fe)-ID-ICPMS. Dans le **Tableau 66** est résumé les concentrations massiques de Fe obtenues pour la solution d'Hb non traitée et pour les différentes fractions.

**Tableau 66 : Détermination du Fe dans l'étalon d'Hb par (Fe)-ID-ICPMS avec traitement par ultrafiltration à 3 kDa.**

<b>Etalon Hb H7379</b>	<b>Concentration (µg Fe / g Hb (<i>k=2</i>))</b>
Non traitée	3009 ± 109
Fraction > 3kDa	3032 ± 89
Fraction < 3kDa	75

Les résultats montrent que la concentration en Fe déterminée dans la solution étalon d'Hb non traitée (3009 ± 109 µg Fe / g Hb) est comparable à la valeur obtenue pour la fraction > 3kDa (3032 ± 89 µg Fe / g Hb). De plus, la teneur en Fe dans la fraction inférieure à 3 kDa est négligeable par rapport à l'incertitude de mesure obtenue sur la fraction supérieure à 3 kDa.

**Ces analyses montrent que les solutions préparées avec l'étalon d'Hb diluées dans une solution tampon sont stables sur 6 mois en stockant les solutions à -20°C. De plus, la dispersion des résultats est plus faible pour des solutions préparées avec des prises d'essai supérieures à 20**

mg d'Hb. Enfin, l'erreur relative obtenue en analysant les solutions étalon d'Hb avec la méthode (Fe)-ID-ICPMS est de -12 % par rapport à la valeur attendue théorique. Par ailleurs, l'absence d'espèces contenant du Fe inférieures à 3 kDa dans la solution étalon d'Hb est prouvée.

### Détermination de la présence d'espèces autre que l'Hb

Afin de déterminer la présence d'autres espèces dans l'étalon d'Hb, deux caractérisations différentes ont été réalisées : une analyse protéique par LC-MS/MS et une analyse par colonne d'exclusion stérique afin d'évaluer la présence éventuelle d'autres protéines.

#### - Identification d'autres protéines par LC-MS/MS

##### *Protocole*

Les analyses pour l'identification des protéines dans l'étalon d'Hb ont été effectuées en collaboration avec l'Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles (ESPCI).

Dans un premier temps une analyse d'une solution étalon d'Hb par nano ESI FTMS de la protéine entière est effectuée. La solution d'Hb à 1 mg.g<sup>-1</sup> Hb est diluée 10 fois dans un mélange de solvants H<sub>2</sub>O/ACN, 1 % d'AF. Un volume de 10 µL est injecté à partir d'une aiguille d'infusion. L'Hb est un hétérotétramère composé de deux sous unités alpha et deux sous unités bêta. Chaque globine de l'Hb contient un hème b, de formule brute C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>FeN<sub>4</sub>O<sub>4</sub> et de masse monoisotopique 616,177 Da.

La chaîne bêta [59] a pour séquence :

10	20	30	40	50
MVHLTPEEKS	AVTALWGKVN	VDEVGGEALG	RLLVVYPWTQ	RFFESFGDLS
60	70	80	90	100
TPDAVMGNPK	VKAHGKKVLG	AFSDGLAHL	NLKGTFTLS	ELHCDKLHVD
110	120	130	140	
PENFRLLGNV	LVCVLAHHFG	KEFTPPVQAA	YQKVVAGVAN	ALAHKYH

ce qui donne une masse monoisotopique de 15857,25 Da et une masse moyenne de 15867,02 Da après excision de la méthionine d'initiation. L'isotope le plus abondant est à 15866,25 Da.

La chaîne alpha [213] a pour séquence :

10	20	30	40	50
MVLSPADKTN	VKAAWGKVG	HAGEYGAEAL	ERMFLSFPTT	KTYFPHFDLS
60	70	80	90	100
HGSAQVKGHG	KKVADALNA	VAHVDDMPNA	LSALSDLHAH	KLRVDPVNFK
110	120	130	140	
LLSHCLLVTL	AAHLPAEFTP	AVHASLTKFL	ASVSTVLTSK	YR

ce qui donne une masse monoisotopique de 15116,88 Da et une masse moyenne de 15126,17 Da après excision de la méthionine d'initiation. L'isotope le plus abondant est à 15125,88 Da.

Dans un second temps, l'analyse de l'étalon d'Hb après digestion est réalisée par nano LC-MS/MS. Pour cette analyse, une digestion en solution par la trypsine est effectuée pour la caractérisation protéique de l'étalon d'Hb. Le protocole est présenté dans le **Tableau 67**.

**Tableau 67 : Protocole de la digestion en solution de l'étalon d'Hb.**

<b>50 µL de solution étalon d'Hb à 1 mg.g<sup>-1</sup> Hb + 50 µL de bicarbonate d'ammonium</b>	
+ 100 µL de DTT	→ Mettre sous agitation pendant 30 min à 56 °C
+ 20 µL d'IAA	→ Laisser reposer pendant 20 min dans l'obscurité
+ 10 µL de trypsine	→ Mettre à 37 °C sous agitation pendant 16h

L'ajout de DTT permet de réduire les ponts disulfures des protéines qui pourraient être présents dans l'échantillon et de prévenir la formation de ponts disulfures intramoléculaires et intermoléculaires. Puis l'ajout d'IAA permet d'obtenir une alkylation des cystéines et la digestion est effectuée avec l'ajout de la trypsine. Le mélange peptidique est analysé directement en solution. La séparation est réalisée sur une colonne C18 (15cm × 75µm id) avec une chaîne nano-chromatographique Ultimate 3000 (Thermo scientific / Dionex). La détection est effectuée à l'aide d'un spectromètre de masse Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Allemagne). Les acquisitions se font en mode automatique dynamique avec une alternance de cycles comprenant une acquisition en mode MS *Full scan survey* et en mode 10 HCD MS/MS pour le séquençage à haute sensibilité. L'acquisition se fait sur une gamme m/z de 400 à 2000. Les recherches de protéines ont été réalisées comme suit:

-Seuil de significativité : 0.01%

-Score d'ion : 10

-Aire : calculée 3 aires maximums

-Fiabilité d'identification des protéines : calculé par Mascot (emPAI)

Le mode d'identification a été réalisé avec des critères de stringence élevés. Deux modes de quantification relative ont été réalisés afin de donner une idée grossière de l'abondance des protéines contaminants dans l'échantillon.

### **Résultats**

Dans un premier temps, l'analyse de la protéine d'Hb intacte par nano ESI FTMS donne le spectre de la **Figure 69**. Le pic rouge correspond au groupement hème avec un pic de base à 616.178 Da. Des espèces monochargées non peptidiques a priori sont détectées à 683,5, 711,6, 739,6, 866,4, 946,4, 974,5, 1231,3 et 1277,3 Da. La distinction nette de plusieurs séries d'ions multichargés dont les deux plus intenses correspondent au sous unité de l'Hb est présentée dans la **Figure 70**. Ces séries d'ions multichargés peuvent être déconvoluées ce qui permet d'obtenir le spectre déconvolué de la **Figure 71** qui montre la présence de deux espèces majeures dont les masses correspondent aux deux chaînes de globines alpha (espèce A) et bêta (espèce B). De plus, ce spectre déconvolué souligne aussi que d'autres formes protéiques coexistent dans cette gamme de masse à 15,2 kDa et à 15,9 kDa.

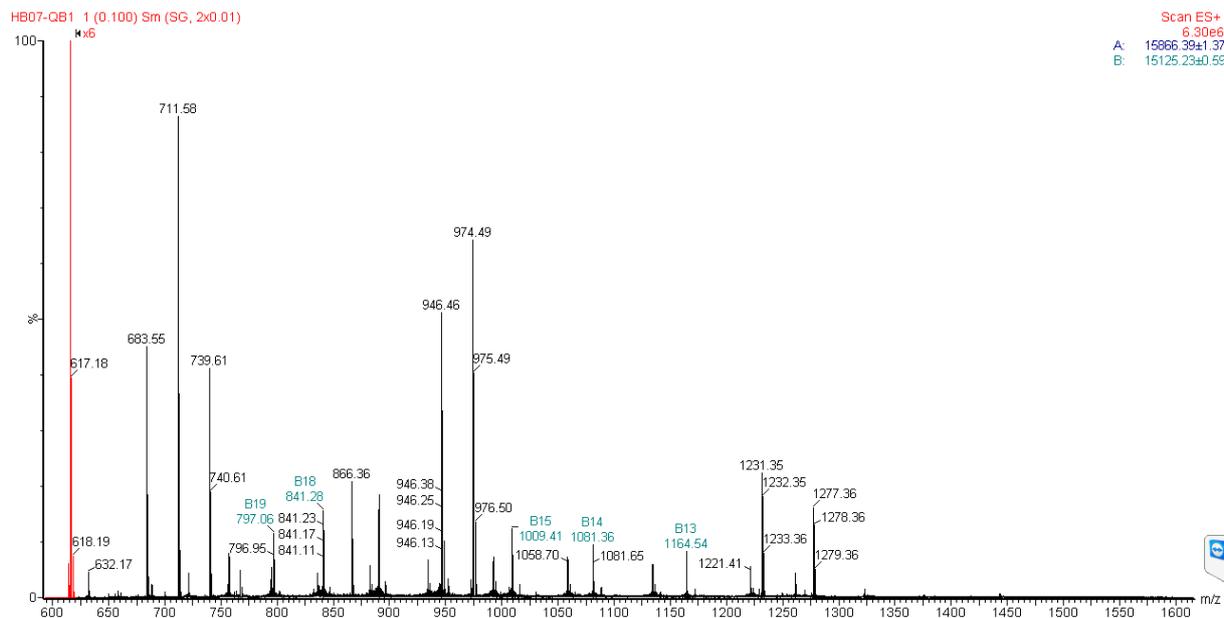


Figure 69 : Spectre nano ESI FTMS de la solution étalon d'Hb sur la protéine intacte.

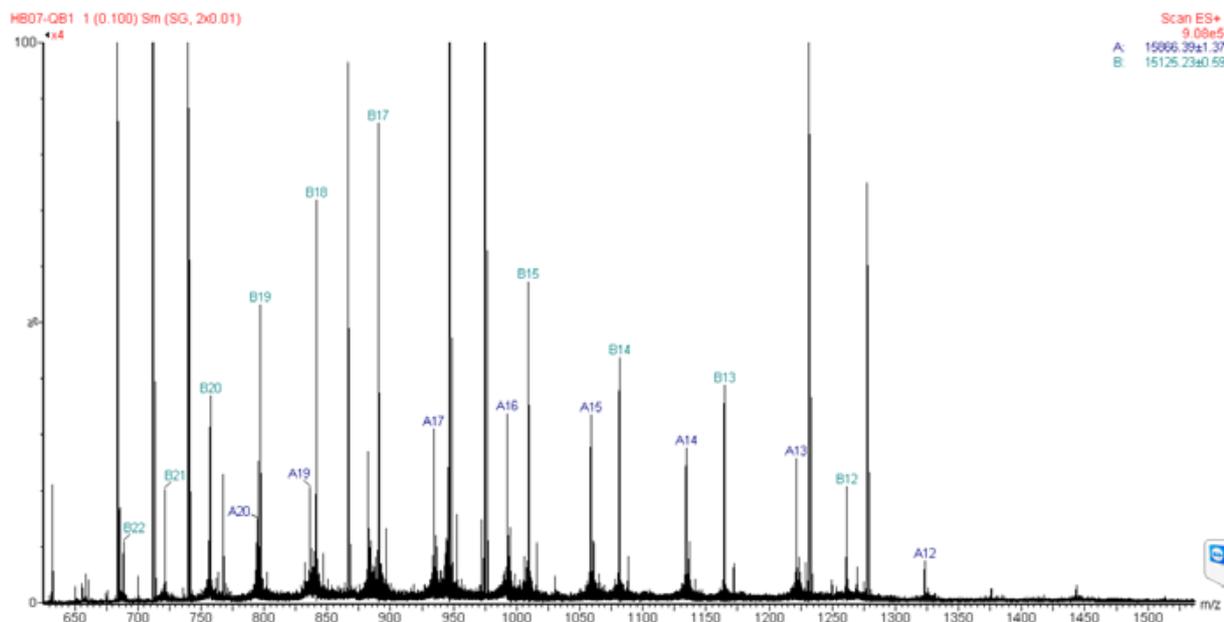
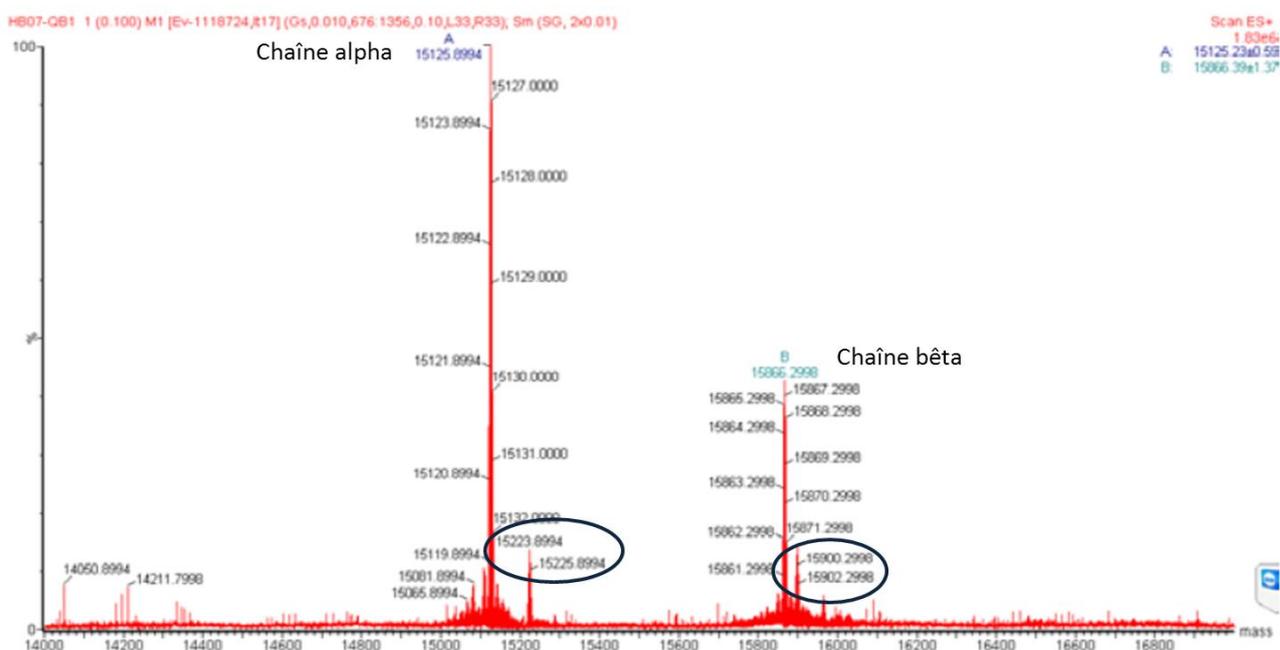


Figure 70 : Identification de la série de pics multichargés correspondant aux deux globines alpha (espèce A) et bêta (espèce B).



**Figure 71 : Spectre nano ESI FTMS déconvolué des espèces protéiques détectées sur la gamme 14 kDa - 17 kDa.**

Dans un second temps, l'analyse de la solution étalon d'Hb après digestion par trypsine par nano LC-MS/MS a permis de faire une caractérisation protéique. Le **Tableau 68** montre une estimation des pourcentages des différentes espèces protéiques déterminées par LC-MS/MS.

**Tableau 68 : Résultats de la caractérisation protéique de l'étalon d'Hb après une digestion par trypsine et analyse par LC-MS/MS.**

Protéines	Aire (%)	Moyenne en %
<b>Chaîne de globine <math>\alpha</math> (Hb)</b>	34,20	<b>98,5</b>
<b>Chaîne de globine <math>\beta</math> (Hb)</b>	64,29	
Anhydrase carbonique I (CAI)	0,98	<b>1,50</b>
Anhydrase carbonique II (CAII)	0,23	
Peroxyrédoxine-2	0,10	
Aspergillus	0,08	
Peroxyrédoxine-6	0,05	
NADPH	0,05	

La CA I est présente à 1 %, ce qui est l'impureté protéique majoritaire. **Ces différentes impuretés représentent environ 2 % de l'échantillon**, l'étalon d'Hb est donc contaminé de façon mineure par des protéines d'origine humaine.

- Identification par séparation chromatographique par HPLC-ICPMS

**Protocole**

La présence d'anhydrase carbonique (CA I) et de catalase (CAT) a été évaluée par couplage en associant la chaîne chromatographique Dionex™ ICS 5000<sup>+</sup> avec l'ICPMS. La détection ICPMS est effectuée en mesurant l'isotope 56 du Fe (**Tableau 42**) et la détection VISIBLE est réalisée à la longueur d'onde de 280 nm, caractéristique pour la détection des protéines. La méthode par chromatographie d'exclusion stérique (Sephacrose 6, avec une limite d'exclusion en masse de  $4 \times 10^7$  Da, 10  $\times$ 300 à 310 mm, GE Healthcare) utilise une phase mobile contenant 10 mmol.L<sup>-1</sup> Tris. Le gradient utilisé est de 60 min. Le **Tableau 69** récapitule les conditions analytiques.

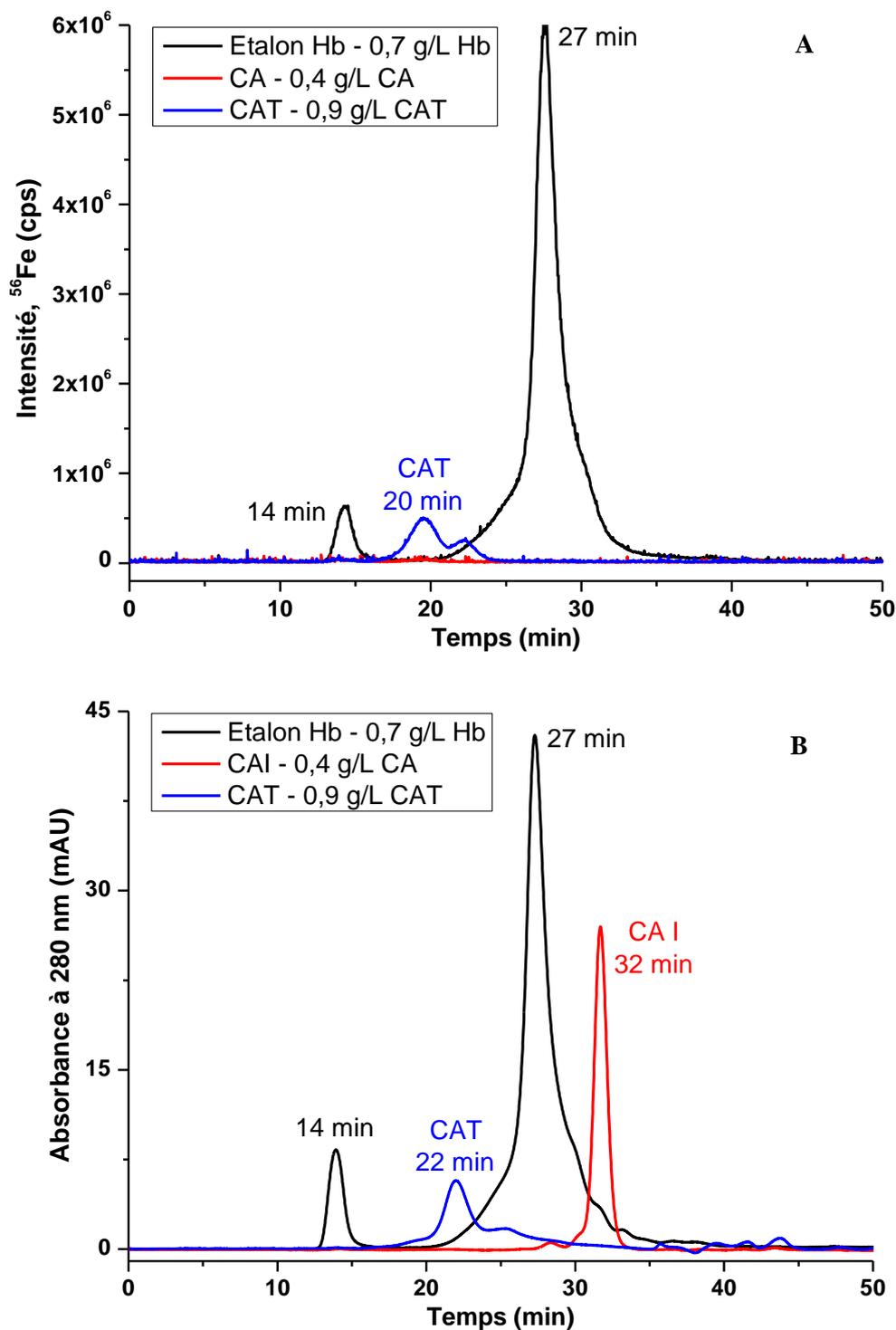
**Tableau 69 : Conditions analytiques de la séparation chromatographique avec la colonne d'exclusion stérique (Sephacrose 6).**

<b>Phases mobiles</b>	10 mM Tris, 0,2 g/L NaN <sub>3</sub> , pH 8,0 (pH ajusté avec NH <sub>3</sub> )
<b>Débit</b>	0,5 mL.min <sup>-1</sup>
<b>Gradient</b>	60 min
<b>Détection VISIBLE</b>	280 nm, 210 nm, 540 nm et 254 nm
<b>Détection ICPMS</b>	<sup>56</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe

La préparation des échantillons est différente selon la nature de l'échantillon mais toutes les étapes sont effectuées par gravimétrie. La solution d'étalon d'Hb ainsi que celle de la CA I sont préparées dans une solution tampon (10 mM Tris, pH 7,5-8,0) à une concentration comprise entre 0,5 et 1 g.L<sup>-1</sup> de protéines. La préparation de la CAT est effectuée dans un tampon de 50 mM de phosphate de potassium afin d'obtenir une concentration autour d'1 g.L<sup>-1</sup> CAT.

**Résultats**

La **Figure 72** montre les chromatogrammes obtenus pour l'analyse d'une solution étalon d'Hb à 0,7 g.L<sup>-1</sup> Hb ainsi qu'une solution de CAT et de CA I par détection ICPMS (<sup>56</sup>Fe) et VISIBLE (280 nm).



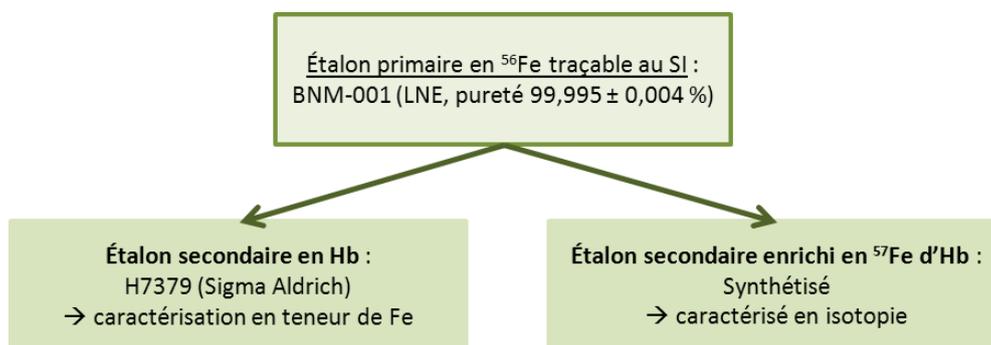
**Figure 72 :** Chromatogrammes de l'étalon d'Hb, la catalase ainsi que l'anhydrase carbonique par colonne d'exclusion stérique et détection VISIBLE à 280 nm et ICPMS à  $^{56}\text{Fe}$ .

Ces analyses mettent en évidence que l'étalon d'Hb ne contient ni de CA, ni de CAT, en quantité suffisante pour être prises en compte. Cependant la présence d'une molécule contenant du Fe de masse moléculaire supérieure à 240 kDa est observée avec un temps de rétention de 14 min dans l'étalon d'Hb. Cette impureté représente environ 1 % de l'Hb totale.

## Conclusion

En conclusion, l'étalon d'Hb (H7379) présente 8 % d'eau et 2 % d'autres protéines, ce qui implique une impureté globale de 10 %. L'absence d'espèces ferriques inférieure à 3 kDa est vérifiée. Cette teneur en impureté est appuyée par l'analyse de l'Hb totale par la méthode (Fe)-ID-ICPMS par laquelle une erreur relative de - 12 % avait été déterminée correspondant à 10 % d'erreur liée à l'impureté et 2 % dus à l'erreur de la méthode analytique. En ce qui concerne l'analyse de l'étalon par spectrophotométrie, l'erreur relative obtenue est plus élevée (- 33%). Si on admet 10 % liés aux impuretés, le biais restant de - 23 % est également dû à la méthode spectrophotométrique. Ainsi **l'étalon d'Hb présente une pureté de (90 ± 2) %**.

Afin d'assurer la traçabilité des résultats au SI, l'étalon d'Hb, considéré dans un premier temps comme notre étalon primaire, sera utilisé comme étalon secondaire pour la mise en place de l'ID en mode spécifique. Il sera caractérisé à partir de sa teneur en Fe par la méthode (Fe)-ID-ICPMS avant chaque analyse en utilisant un étalon primaire en Fe de haute pureté (BNM-001). De plus, l'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  d'Hb sera caractérisé en isotopie à travers l'utilisation de ce même étalon primaire en Fe. La **Figure 73** présente la traçabilité des étalons.



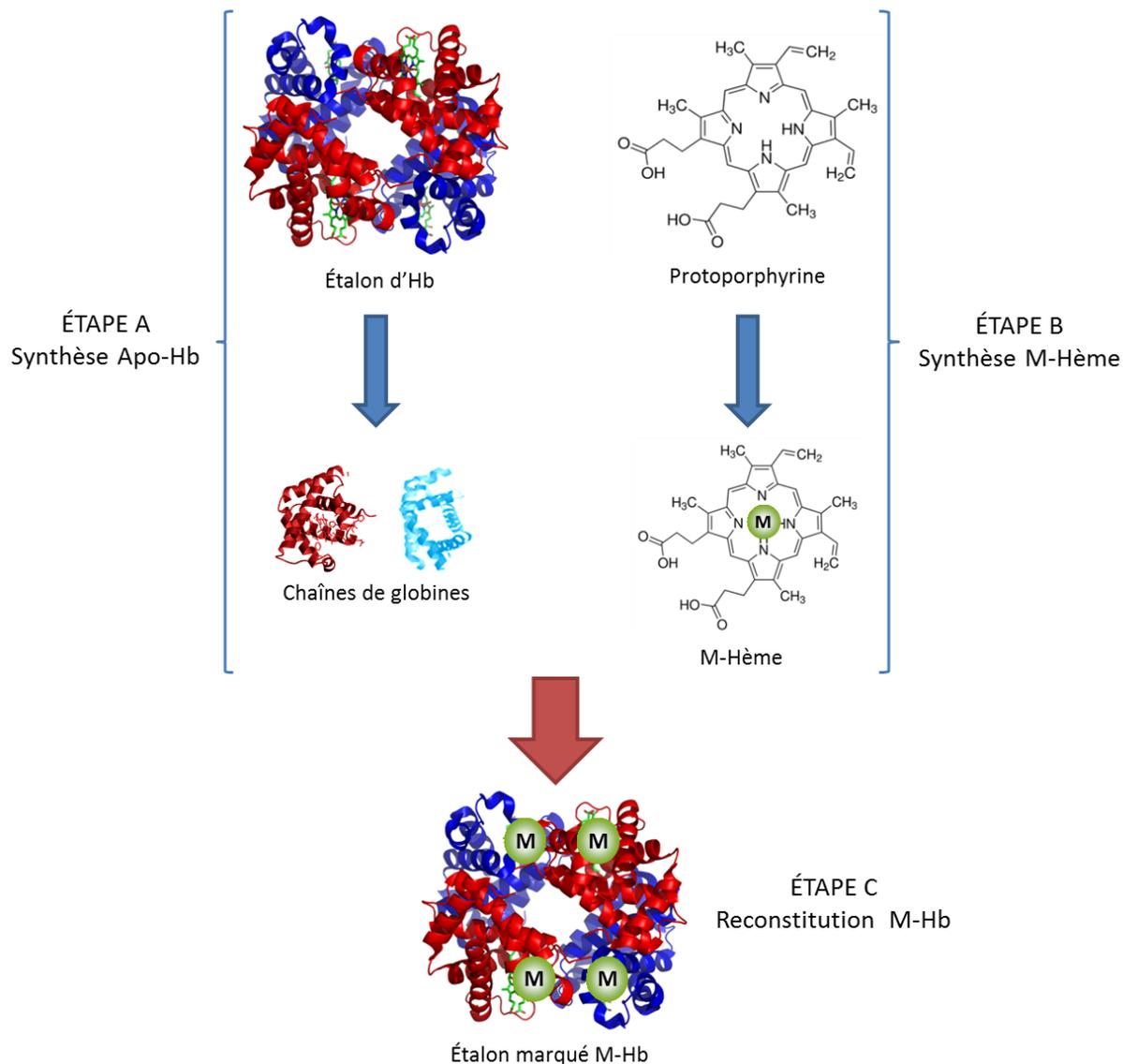
**Figure 73 : Traçabilité des différents étalons**

### 2.6.3.2.2. Synthèse de l'étalon marqué d'Hb

L'étalon d'Hb (H7379) préalablement caractérisé, ainsi que l'étalon sous forme inorganique marqué en  $^{57}\text{Fe}$  (Eurisotop) sont utilisés pour effectuer la synthèse de l'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  d'Hb.

## État de l'art

Le principe général de la synthèse est décrit par la **Figure 74** et se compose de trois étapes. La première étape (Étape A : synthèse de l'Apo-Hb) consiste à éliminer les groupes hèmes de l'Hb afin de conserver les chaînes de globines. La deuxième étape (Étape B : synthèse du groupe M-hème) permet d'enrichir une molécule de protoporphyrine avec un métal (M) afin de former un groupe M-hème. La dernière étape (Étape C : reconstitution de l'Hb) permet de reconstituer la molécule d'Hb.



**Figure 74 : Principe général de la synthèse d'Hb enrichie avec un métal.**

Le protocole pour la précipitation des chaînes de globines utilise un mélange d'acétone et d'HCl ( $6 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> d'HCl). Pour un volume de solution d'Hb (de concentration comprise entre 10 et 25 g.L<sup>-1</sup> Hb), une quantité comprise entre 10 et 30 volumes de mélange acétone-HCl à -20 °C sont ajoutés sous agitation. La solution est ensuite laissée au repos pendant 20 à 30 minutes. Le surnageant, contenant le groupe hème, est éliminé par centrifugation. Le précipité est alors redilué pour réitérer l'ajout du mélange acétone-HCl. Cette étape peut être répétée entre une et trois fois. Puis, une fois tous les groupes hèmes éliminés, la solution de chaînes de globines subit plusieurs dialyses avec de l'eau et différents tampons (bicarbonate de sodium, phosphate de sodium). Suivant les protocoles, entre 60 et 90 % de la protéine initiale sont récupérés [214-217].

La synthèse d'un groupe hème enrichi avec un métal a été effectuée en insérant le métal dans une molécule de protoporphyrine (par exemple : Indium-Protoporphyrine [215]). Le protocole consiste

à chauffer à reflux entre 4,5 et 6,5 h, un mélange composé de protoporphyrine IX, de chlorure d'indium, d'acétate de sodium dissous dans de l'acide acétique (entre 10 et 160 mL). Une étape d'évaporation est ensuite réalisée, suivie de l'ajout goutte à goutte d'eau froide, jusqu'à la formation d'un précipité rouge. Ce précipité est ensuite rincé avec de l'eau et séché [215, 218].

Pour la reconstitution de la molécule d'Hb avec un groupe modifié de protoporphyrine, Marshall et *al.* proposent de dissoudre le composé In-protoporphyrine dans de l'hydroxyde de sodium à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  puis dans plusieurs volumes de tampon phosphate afin d'obtenir un pH final de 11,5. Cette solution, qui doit être en excès, est ajoutée à la solution d'Apo-Hb sous agitation et à  $0^\circ\text{C}$ . Ce mélange est laissé toute la nuit au repos et le léger précipité formé est éliminé par centrifugation [214, 215].

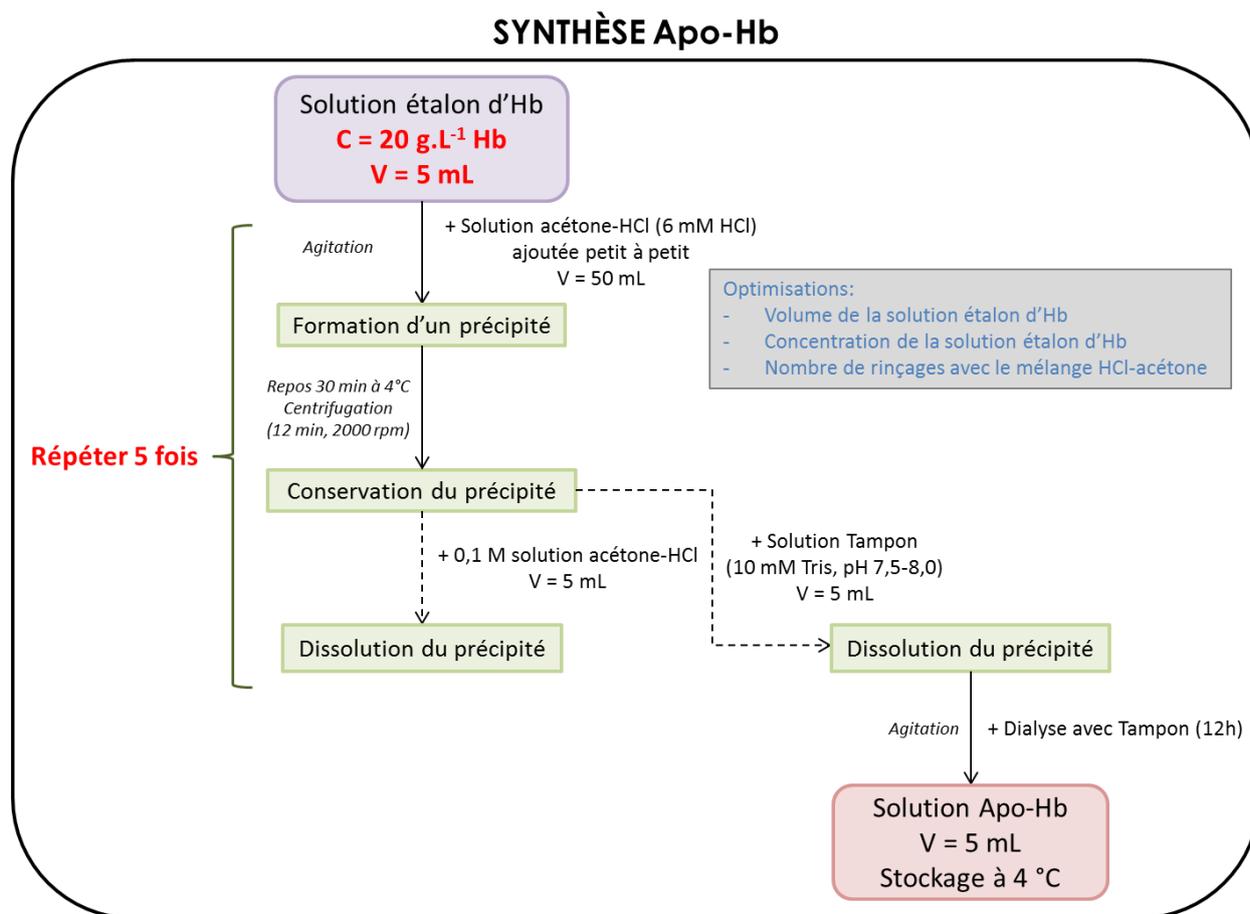
### **Protocole**

Le protocole de synthèse que nous avons développé sur la base de cette étude bibliographique se décompose donc en 3 étapes :

- Étape A : Synthèse de l'Apo-Hb consistant à éliminer les groupes hèmes (contenant du  $^{56}\text{Fe}$ ) présents dans l'étalon d'Hb afin de conserver les chaînes de globines.
- Étape B : Synthèse du groupe hème enrichi en  $^{57}\text{Fe}$  à partir d'une molécule de protoporphyrine.
- Étape C : Synthèse de l'étalon marqué enrichie en  $^{57}\text{Fe}$  d'Hb en additionnant les deux composés synthétisés lors des étapes A et B.

- **Synthèse de l'Apo-Hb (étape A)**

Dans un milieu très acide ( $\text{pH} < 2$ ), le groupe hème se dissocie des chaînes de globines de l'Hb. Après cette dissociation, les chaînes de globines précipitent en présence d'acétone. Ainsi l'utilisation d'un mélange HCl – acétone permet d'obtenir les groupes hèmes en solution et les chaînes de globines sous la forme d'un précipité. Le protocole de synthèse est représenté par la **Figure 75**.



**Figure 75 : Protocole de la synthèse de l'Apo-Hb à partir de l'étalon d'Hb (H7379).**

Une solution de 50 mL contenant un mélange d'HCl et d'acétone est ajoutée, petit à petit, sous agitation à 5 mL de solution étalon d'Hb de 20 g.L<sup>-1</sup> Hb. La proportion d'un volume de solution étalon pour dix volumes de solution HCl-acétone est respectée (1:10). La formation d'un précipité est visible à partir de 7 à 8 volumes de solution HCl-acétone ajoutés. Ensuite, le précipité formé est récupéré après centrifugation et redissous afin d'effectuer de nouveau un rinçage avec la solution HCl-acétone. Cette étape est répétée cinq fois afin d'éliminer la totalité des groupes hèmes. Pour finir, une dialyse de 12h dans un tampon (10 mM Tris, pH 7,5-8,0) est effectuée afin d'éliminer le reste de mélange HCl-acétone dans la solution de chaînes de globines, l'Apo-Hb. Cette solution d'Apo-Hb est conservée à 4°C.

Avant la mise en place de ce protocole, différents essais, regroupés dans le **Tableau 70**, ont été effectués en modifiant la **concentration initiale** (10-20 g.L<sup>-1</sup> Hb) et le **volume initial** (1-5 mL) de la solution d'Hb, le **nombre de rinçage avec le mélange HCl-acétone** (2-5) qui est augmenté au fur et à mesure afin d'éliminer avec efficacité le groupe hème.

**Tableau 70 : Essais d'optimisation des paramètres de la synthèse d'Apo-Hb**

	Solution initiale d'Hb	Volume de solution d'Hb	Nombre de rinçages
Essai 1	10 g.L <sup>-1</sup> Hb	1 mL	2
Essai 2	10 g.L <sup>-1</sup> Hb	1 mL	3
Essai 3	10 g.L <sup>-1</sup> Hb	5 mL	3
Essai 4	20 g.L <sup>-1</sup> Hb	5 mL	4
<b>Essai 5</b>	<b>20 g.L<sup>-1</sup> Hb</b>	<b>5 mL</b>	<b>5</b>

Afin de déterminer si les différents essais permettent d'obtenir une solution d'Apo-Hb, la solution finale est analysée par HPLC avec la colonne Luna C8 (250 × 4,60 mm, Phenomenex). La séparation chromatographique en phase inverse utilise des phases mobiles d'eau et d'acétonitrile contenant 0,1 % de TFA. Le gradient utilisé est de 100 min. Le **Tableau 71** récapitule les conditions analytiques.

**Tableau 71 : Conditions analytiques de la séparation chromatographique par colonne en phase inverse (C8).**

<b>Phases mobiles</b>	Phase A : 0,1 % TFA, eau Phase B : 0,1 % TFA, acétonitrile
<b>Gradient</b>	0 à 1 min : 35 % B 1 à 90 min : 35 % B à 50 % B 90 min : 35 % B 100 min : 90 % B
<b>Détection VISIBLE</b>	210 nm permet d'observer le groupe hème (26 – 27 min) et les chaînes de globines (33,9 – 36,6 min) 415 nm est caractéristique du groupe hème 280 nm est caractéristique pour les protéines

La **Figure 76** montre quelques exemples de chromatogrammes obtenus pour différents essais d'Apo-Hb. D'après la **Figure 76A**, on observe que le volume de la solution d'Hb a eu un impact sur l'intensité des pics correspondant aux chaînes de globines. De plus, sur le chromatogramme B, à la longueur d'onde caractéristique du groupe hème (415 nm), on observe que plus le nombre de rinçages est élevé plus l'intensité du pic hème diminue.

Les conditions finales optimisées correspondent à l'**essai 5** (chromatogramme de couleur bleue sur la **Figure 76**) où une **solution de 5 mL à 50 g.L<sup>-1</sup> Hb** est rincée à **cinq reprises avec le mélange HCl-acétone**.

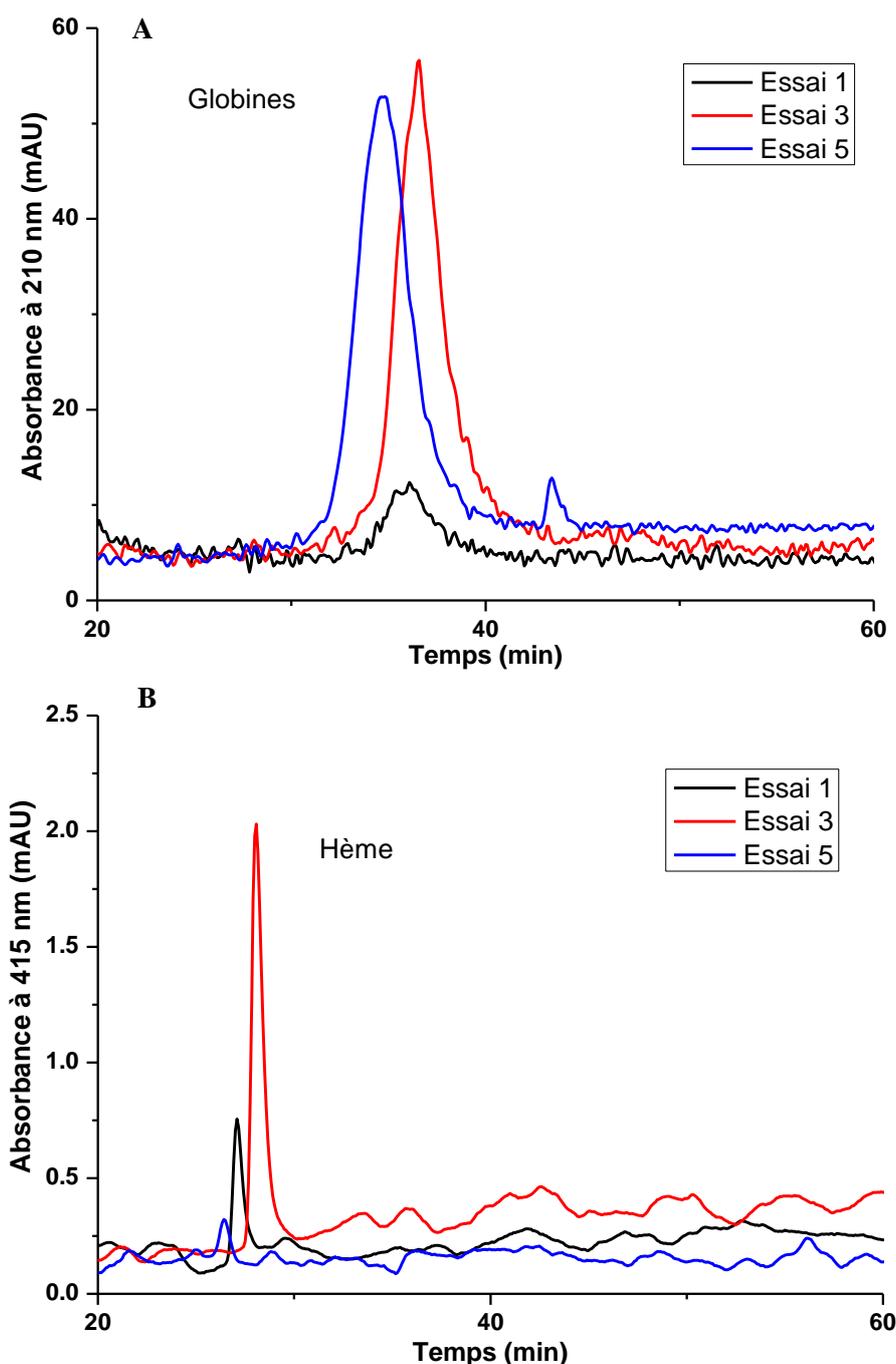


Figure 76 : Chromatogrammes de différentes solutions d'Apo-Hb obtenus par analyse HPLC avec la colonne C8 à 210 nm (A) et 415 nm (B).

- Synthèse du groupe  $^{57}\text{Fe}$ -hème (étape B)

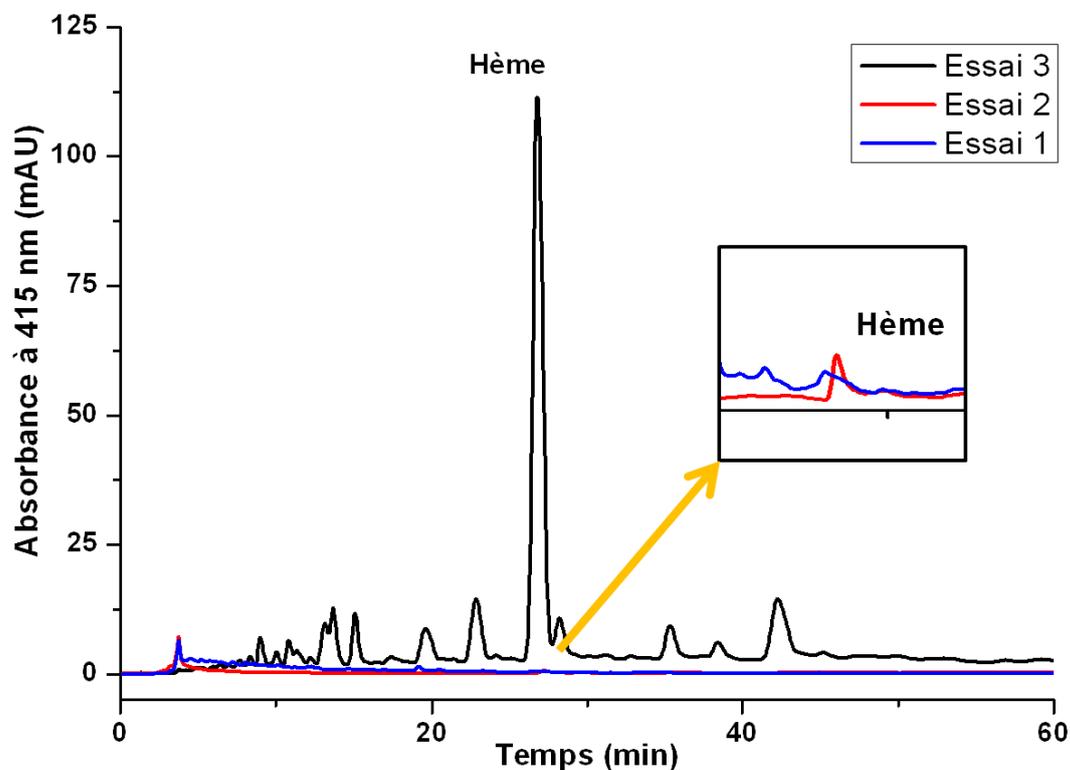
Cette synthèse a été la plus complexe à mettre en œuvre et a nécessité un grand nombre d'essais et d'optimisations. En effet, pour effectuer cette synthèse, la bibliographie montre l'utilisation de chlorure d'indium. Notre objectif est de synthétiser un groupe hème enrichi en isotope 57 du Fe. Pour cela, l'enrichissement d'un noyau de protoporphyrine sera d'abord effectué avec du  $^{56}\text{Fe}$  (solution de Fe de haute pureté, solution de  $\text{FeCl}_3$  ou  $\text{FeCl}_3$  sous forme solide) puis transposé avec du  $^{57}\text{Fe}$ .

Afin de déterminer si les différents essais permettent d'obtenir le composé Fe-Hème, la solution finale est analysée par HPLC avec la colonne C8 dans les conditions analytiques vues plus haut. Le **Tableau 72** récapitule tous les essais effectués afin de trouver le bon réactif pour réussir à former un groupe hème enrichi en  $^{57}\text{Fe}$ . Les essais 1, 3, 4 et 7 ont été réalisés avec du Fe 56 (BNM-001) et les autres essais avec du Fe 57 (Eurisotop).

**Tableau 72 : Essais et résultats de synthèse du  $^{57}\text{Fe}$ -hème (p représente le nombre de jour).**

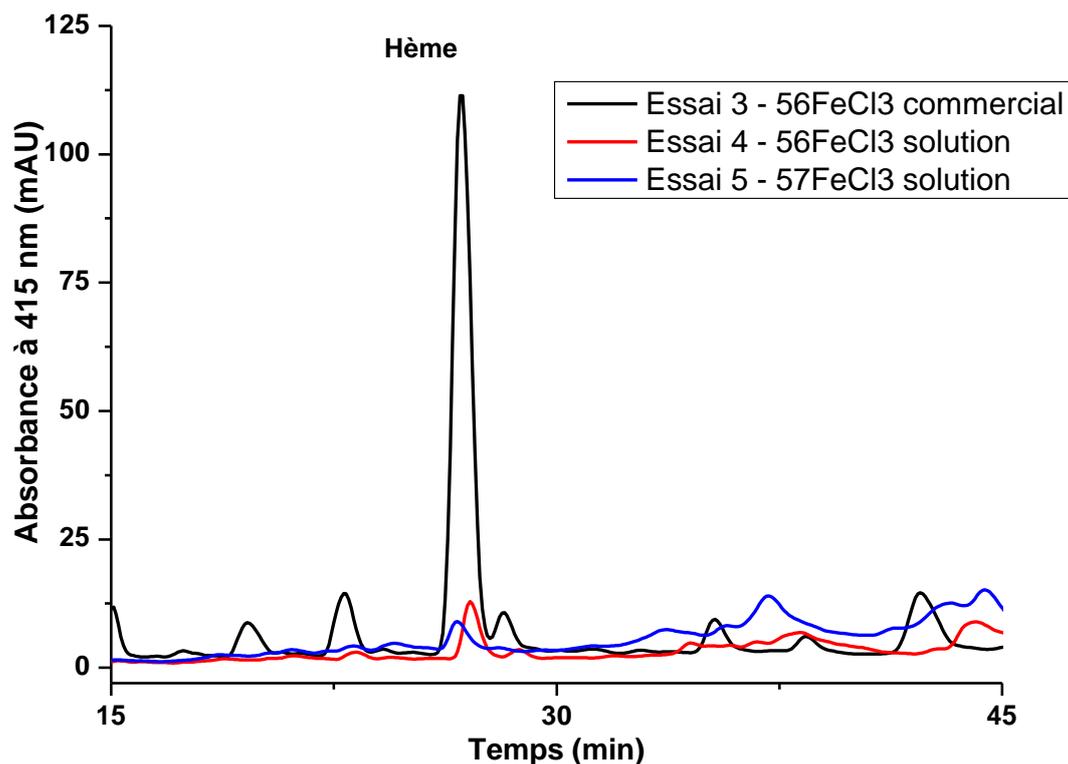
Essais	Volume du mélange	Quantité en Fe	Préparation de la solution en Fe	Résultats
Essai 1 (p=1)	100 mL	Solution de $^{56}\text{Fe}$ à 1500 ppm 20 mL	Minéralisation : 65 mg $^{56}\text{Fe}_s$ + 2 mL $\text{HNO}_3$ + 50 mL $\text{H}_2\text{O}$	Présence d'une infime quantité de groupe hème Synthèse d'une autre molécule Présence d'un résidu de protoporphyrine
Essai 2 (p=3)	10 mL	Solution de $^{57}\text{Fe}$ à 500 ppm 3 – 4 mL	Minéralisation : 50 mg $^{57}\text{Fe}_s$ + 2 mL $\text{HNO}_3$ Solution : 5 mL de $^{57}\text{Fe}$ + 5 mL Tampon acétate de sodium	Synthèse d'une molécule mais pas le groupe hème Quantité de produit très faible (< à 5 mg)
Essai 3 (p=3)	80 – 40 mL	$^{56}\text{FeCl}_3$ commercial (solide) 110 – 55 – 15 mg	-	<b>Formation du groupe hème</b> Quantité du produit entre 100 et 50 mg
Essai 4 (p=2)	40 mL	Solution de $^{56}\text{FeCl}$ à 2500 – 3500 ppm 2 mL	Minéralisation : 20-25 mg $^{56}\text{Fe}_s$ + 1 mL $\text{HCl-H}_2\text{O}_2$ + 6-4 mL Tampon acétate de sodium	Formation du groupe hème mais en très faible teneur Quantité du produit $\approx$ 15 mg
Essai 5 (p=2)	40 mL	Solution de $^{57}\text{FeCl}$ à 4700 ppm 2 – 3 mL	46 mg de $^{57}\text{Fe}$ + 1 mL $\text{HCl}$ + 1 mL $\text{H}_2\text{O}_2$ + 7 mL tampon	Présence du groupe hème en très faible teneur Quantité du produit $\approx$ 15 mg
Essai 6 (p=2)	40 mL	Solution de $^{57}\text{Fe}_2\text{O}_3$ à 1000 ppm 10 – 15 mL	Minéralisation : 50 mg $\text{Fe}_2\text{O}_3$ + 8 mL $\text{HCl}$ – 3 mL $\text{HNO}_3$ + 40 mL $\text{H}_2\text{O}$	Formation du groupe hème mais en faible teneur et présence de protoporphyrine majoritaire Quantité du produit $\approx$ 20 mg
Essai 7 (p=1)	40 mL	$^{56}\text{FeCl}_3$ synthétisé 20 mg	Minéralisation au Hot block : 47 mg $\text{Fe}_{(s)}$ + 2 mL $\text{HCl}$ Evaporation à sec : 20 min à 100°C	<b>Formation du groupe hème</b> en très forte teneur Quantité du produit $\approx$ 20 mg
Essai 8 (p=1)	40 mL	$^{57}\text{FeCl}_3$ synthétisé 20 mg	Minéralisation : 46 mg de $^{57}\text{Fe}$ + 1 mL $\text{HCl}$ + 1 mL $\text{H}_2\text{O}_2$ + 7 mL tampon Evaporation à sec : 30 min à 100°C	<b>Formation du groupe hème</b> en très forte teneur Quantité du produit ( $\approx$ 20 mg)

Dans un premier temps, la synthèse a été effectuée en utilisant une solution en  $^{56}\text{Fe}$  (Essai 1) pour l'enrichissement du noyau de protoporphyrine. Cette synthèse donne la formation du groupe hème en infime quantité en comparaison avec la synthèse réalisée avec du  $^{56}\text{FeCl}_3$  commercial (Essai 3) où la formation du groupe hème est nettement visible sur la **Figure 77**. L'utilisation d'une solution en  $^{57}\text{Fe}$  (Essai 2) engendre le même comportement que celui obtenu avec le  $^{56}\text{Fe}$ .



**Figure 77** : Chromatogrammes des essais de synthèse du Fe-hème utilisant des solutions de Fe en comparaison avec l'utilisation du  $^{56}\text{FeCl}_3$  commercial analysés par HPLC avec la colonne C8 à 415 nm.

Dans un deuxième temps, l'utilisation du  $^{56}\text{FeCl}_3$  en solution (Essai 4) est effectuée pour l'enrichissement, afin de diminuer la consommation en réactif. Cependant, la formation du groupe hème est présente en très faible teneur en comparaison avec l'utilisation du  $^{56}\text{FeCl}_3$  commercial en poudre (voir **Figure 78**). L'utilisation d'une solution en  $^{57}\text{FeCl}_3$  (Essai 5) engendre le même comportement que celui obtenu avec le  $^{56}\text{Fe}$ .



**Figure 78 :** Chromatogrammes des essais de synthèse du Fe-hème utilisant une solution de  $\text{FeCl}_3$  en comparaison avec l'utilisation de  $^{56}\text{FeCl}_3$  commercial analysés par HPLC avec la colonne C8 à 415 nm.

Enfin, la synthèse de  $\text{FeCl}_3$  sous forme solide a été réalisée avec du  $^{56}\text{Fe}$  (Essai 7) et du  $^{57}\text{Fe}$  (Essai 8) puisque les résultats précédents ont montré que la mise en solution impactait sur la quantité de produit formé. La synthèse de  $^{57}\text{FeCl}_3$  est réalisée à partir de l'évaporation à sec d'une solution en  $^{57}\text{Fe}$  de  $4700 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Fe ( $46 \text{ mg de } ^{57}\text{Fe} + 1 \text{ mL HCl} + 1 \text{ mL H}_2\text{O}_2 + 7 \text{ mL tampon}$ ), le résidu étant ensuite séché au dessiccateur pendant 12h. La **Figure 79** présente les différents chromatogrammes obtenus pour les essais effectués avec du  $\text{FeCl}_3$  solide. La formation du groupe hème en forte teneur est réussie pour les deux essais utilisant du  $\text{FeCl}_3$  synthétisé (Essais 7 et 8).

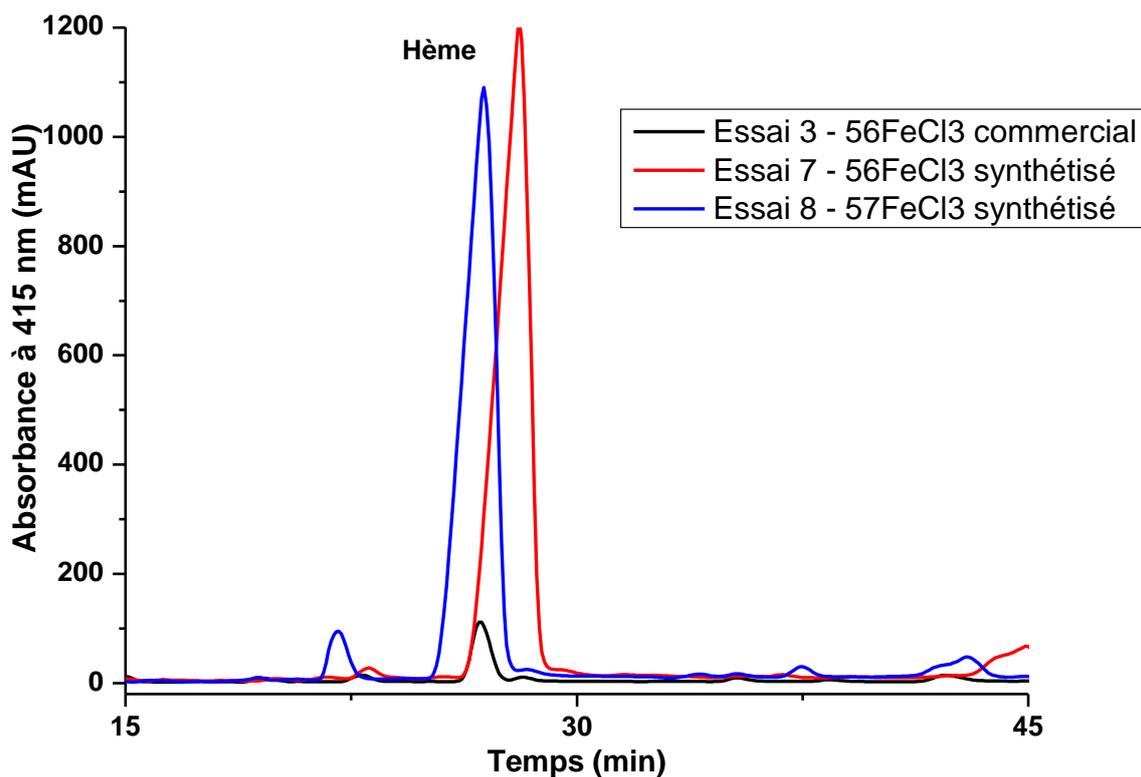


Figure 79 : Chromatogrammes des essais effectués avec le  $\text{FeCl}_3$  aux isotopes 56 et 57. Les analyses sont réalisées par colonne C8-HPLC à 415 nm.

L'essai 8 est donc retenu pour la synthèse du groupe hème enrichi en  $^{57}\text{Fe}$ . Le protocole final est indiqué dans la Figure 80. La synthèse du groupe hème enrichi en  $^{57}\text{Fe}$  est effectuée en chauffant à reflux pendant 4,5 h le mélange réactionnel indiqué dans la Figure 80. Après évaporation d'environ 90 % du solvant, la solution finale est filtrée afin de rincer abondamment à l'eau le résidu obtenu. Le composé  $^{57}\text{Fe}$ -hème est ensuite séché au dessiccateur pendant 12h. Le stockage de cette poudre se fait à  $4^\circ\text{C}$ , comme pour le composé hème commercial.

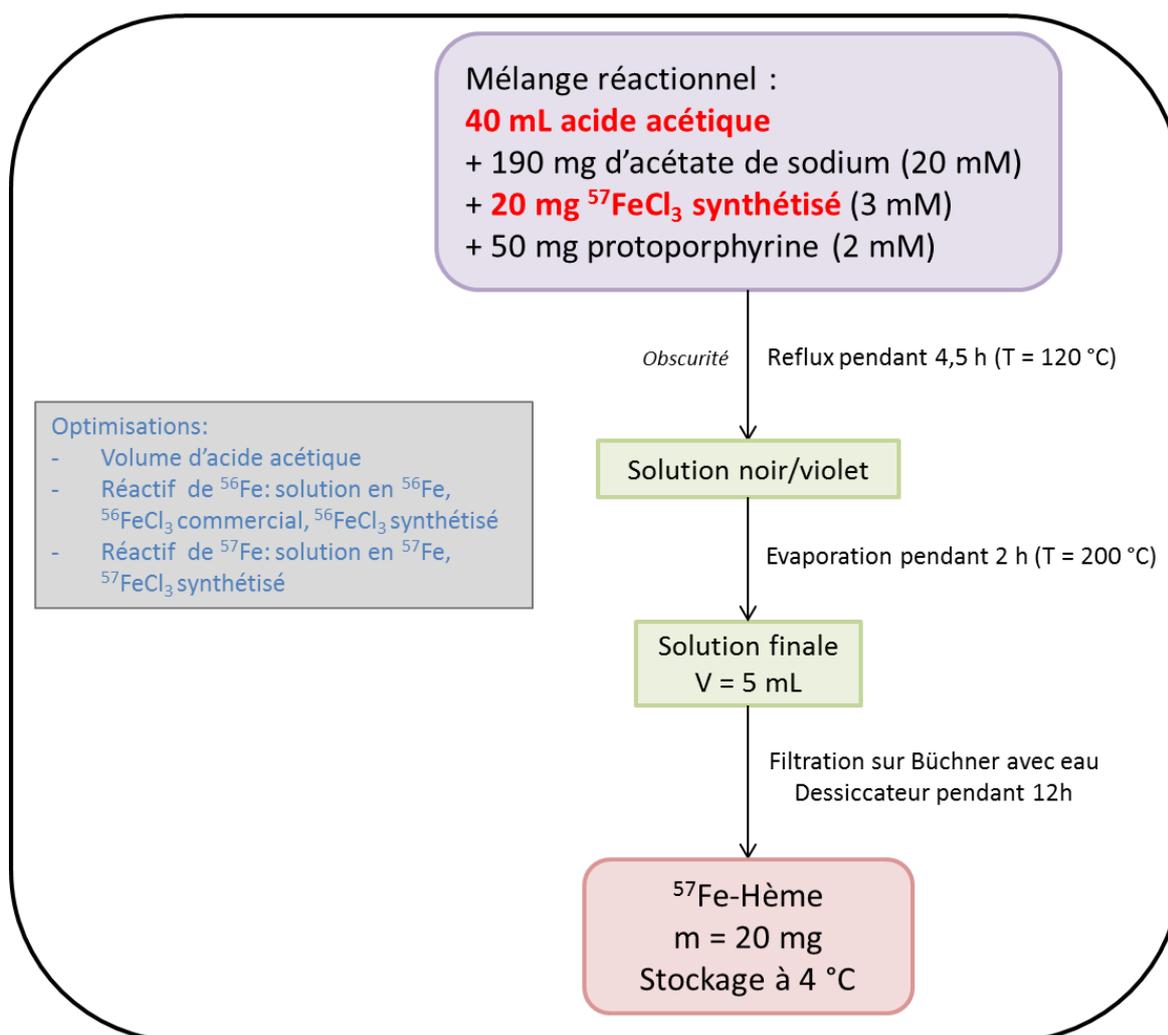
SYNTHÈSE  $^{57}\text{Fe}$ -HÈME

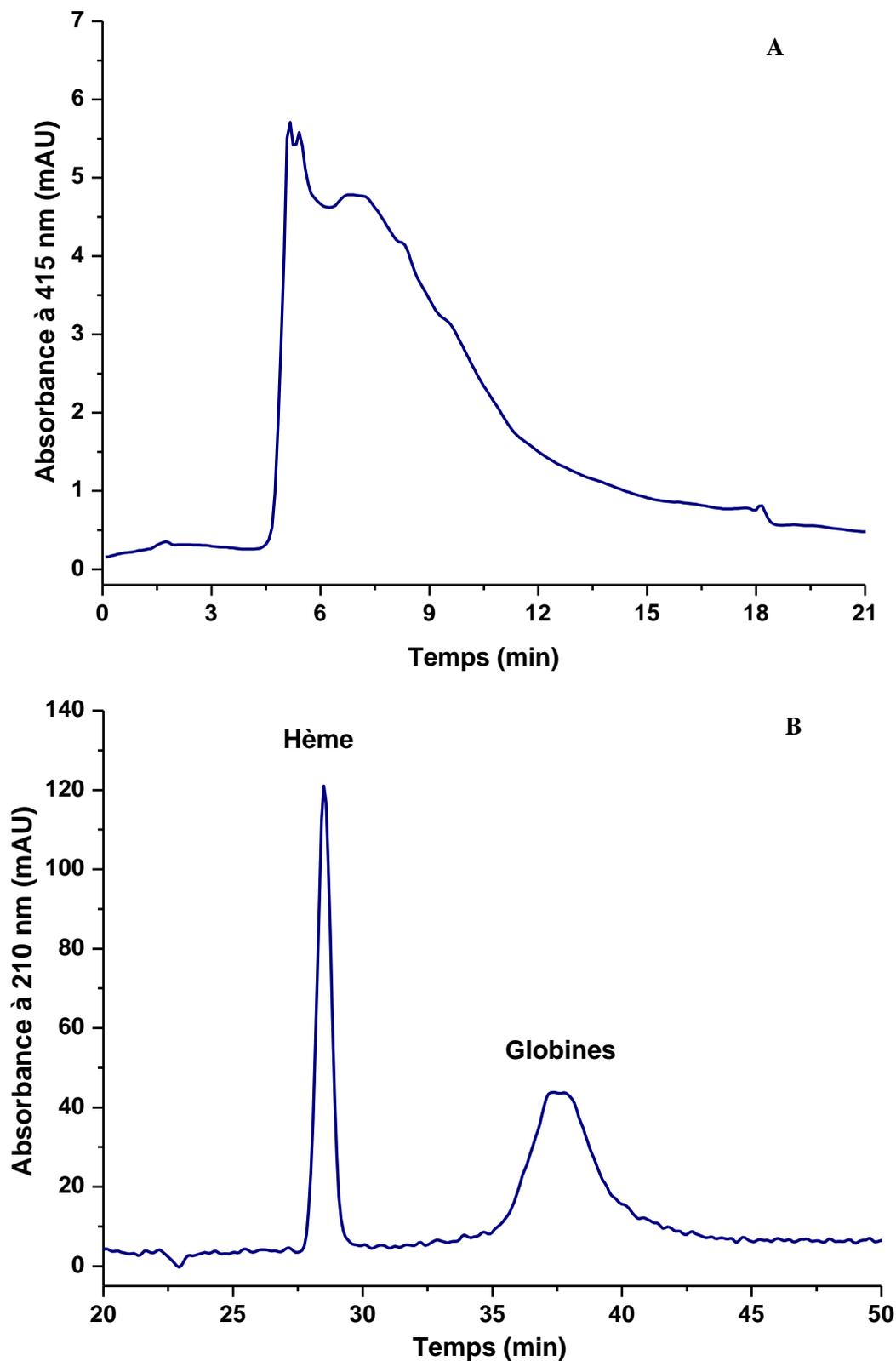
Figure 80 : Protocole pour la synthèse du groupe hème enrichi en  $^{57}\text{Fe}$  à partir d'une molécule de protoporphyrine.

- Synthèse de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb (étape C)

Cette dernière étape a pour objectif de reconstituer la molécule d'Hb à partir des composés synthétisés lors des deux étapes précédentes : le groupe  $^{57}\text{Fe}$ -hème et la solution d'Apo-Hb. Cette étape de reconstitution est réalisée directement après la synthèse de l'Apo-Hb afin d'éviter la dégradation des chaînes de globines. Différentes optimisations ont été effectuées concernant le **volume de solution étalon d'Hb** ainsi que la **concentration de la solution  $^{57}\text{Fe}$ -hème** afin d'obtenir la bonne proportion entre chaque réactif. Afin de déterminer si les différents essais permettent la reconstitution de la molécule d'Hb, la solution finale est analysée par HPLC avec les colonnes C8 (**Tableau 71**) et Source 15Q (**Tableau 46**).

Dans un premier temps, la reconstitution de l'Hb est effectuée en utilisant un groupe hème commercial afin d'appréhender au mieux cette dernière étape de synthèse. Cet essai a été réalisé avec des concentrations variables en groupe hème comprises entre 40 et 100 mg.kg<sup>-1</sup> et une quantité de

solution d'Hb comprise entre 1 et 5 mL. La **Figure 81** présente les chromatogrammes obtenus avec la colonne d'échange d'anions et celle en phase inverse.



**Figure 81 :** Chromatogrammes obtenus pour la reconstitution de l'Hb avec le groupe hème commercial en échange d'anions (A) et en phase inverse (B).

Le pic caractéristique de l'Hb n'est pas observé à 415nm en échange d'anions (**Figure 81A**) alors que les pics du groupe hème et des globines sont observés en phase inverse (210 nm) (**Figure 81B**). La proportion entre le groupe hème et les chaînes de globines est de 42/58. La problématique de la proportion entre le groupe hème et les chaînes de globines pour obtenir une synthèse favorable de l'hémoglobine est donc mise en évidence.

En effet, la **proportion entre le groupe hème et les globines** obtenues après analyse de différentes solutions étalons d'Hb sont :

- **Hème : 1 à 8 %**
- **Globines : 92 à 99 %**

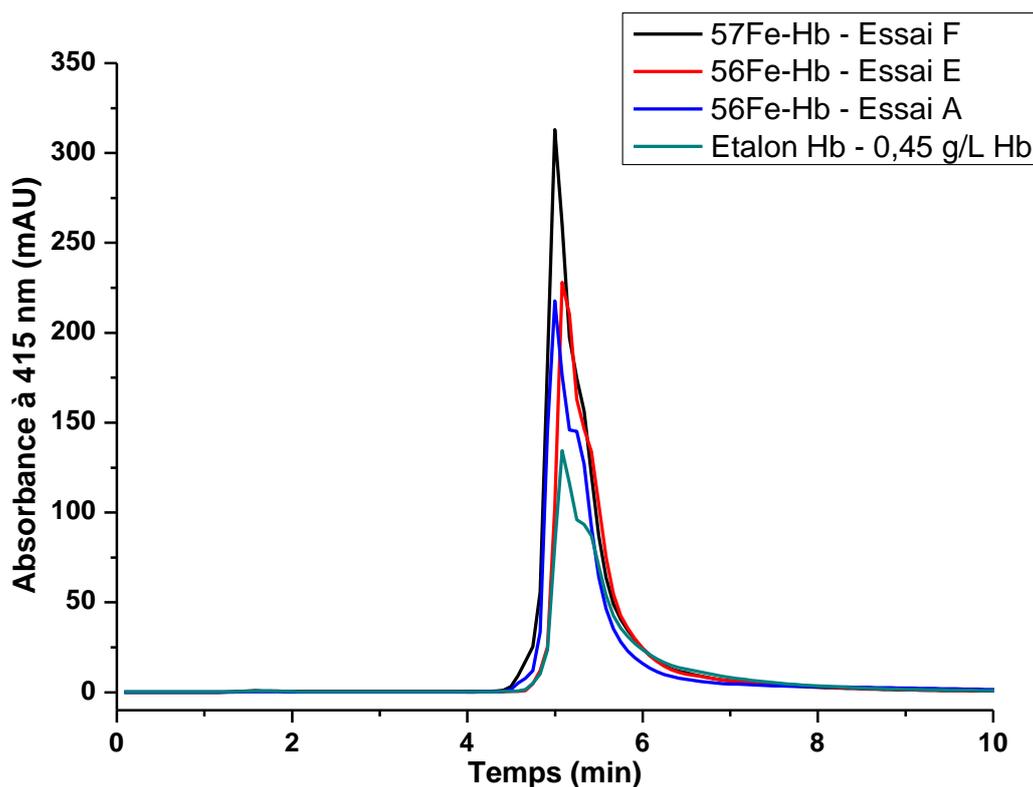
**La synthèse devra être effectuée de telle sorte à conserver cette gamme de proportions pour une reconstitution de l'Hb satisfaisante.**

Différents essais ont donc été effectués avant d'obtenir les conditions permettant la synthèse de l'étalon d'Hb marqué en  $^{57}\text{Fe}$ . Le **Tableau 73** récapitule les essais.

**Tableau 73 : Récapitulatif des différents essais effectués pour reconstituer la molécule d'Hb avec du  $^{56}\text{Fe}$  et du  $^{57}\text{Fe}$  afin de déterminer les conditions idéales.**

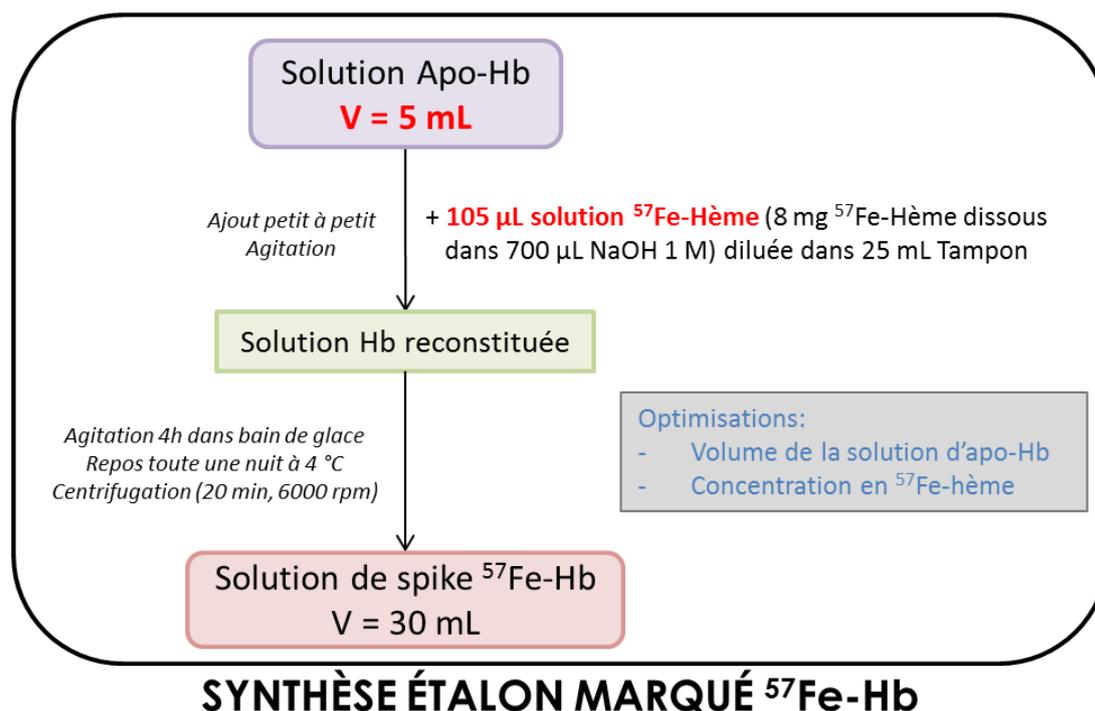
Essais	Caractéristiques du groupe hème	Caractéristiques solution Hb pour synthèse Apo-Hb	Résultat
A (p=1)	Hème reconstitué avec $^{56}\text{FeCl}_3$ commercial (Essai 3 – <b>Tableau 72</b> ) 110 mg.kg <sup>-1</sup>	5 mL 20 g.L <sup>-1</sup> Hb	<b>Reconstitution de l'Hb en <math>^{56}\text{Fe}</math></b>
B (p=3)	Hème reconstitué avec solution de $^{56}\text{FeCl}$ (Essai 4 – <b>Tableau 72</b> ) 110 à 160 mg.kg <sup>-1</sup>	5 mL 10 à 20 g.L <sup>-1</sup> Hb	Reconstitution de l'Hb en $^{56}\text{Fe}$ mais présence d'une autre espèce – Teneurs faibles par rapport aux deux reconstitutions A et B
C (p=1)	Hème reconstitué avec solution de $^{57}\text{FeCl}$ (Essai 5 – <b>Tableau 72</b> ) 200 mg.kg <sup>-1</sup>	5 mL 10 g.L <sup>-1</sup> Hb	Reconstitution de l'Hb en $^{57}\text{Fe}$ mais présence d'une autre espèce majoritaire (éluée après l'Hb et contenant du $^{57}\text{Fe}$ ) – Teneurs très faibles
D (p=1)	Hème reconstitué avec solution de $^{57}\text{Fe}_2\text{O}_3$ (Essai 6 – <b>Tableau 72</b> ) 190 mg.kg <sup>-1</sup>	5 mL 10 g.L <sup>-1</sup> Hb	Pas de présence de l'Hb
E (p=1)	Hème reconstitué avec $^{56}\text{FeCl}_3$ synthétisé (Essai 7 – <b>Tableau 72</b> ) 50 mg.kg <sup>-1</sup>	5 mL 20 g.L <sup>-1</sup> Hb	<b>Reconstitution de l'Hb en <math>^{56}\text{Fe}</math></b>
F (p=3)	<b>Hème reconstitué avec <math>^{57}\text{FeCl}_3</math> synthétisé (Essai 8 – <b>Tableau 72</b>)</b> <b>50 mg.kg<sup>-1</sup></b>	<b>5 mL</b> <b>20 g.L<sup>-1</sup> Hb</b>	<b>Reconstitution de l'Hb en <math>^{57}\text{Fe}</math></b>

Les essais B, C, et D n'ont pas été concluants puisque le groupe hème était présent en trop faible quantité pour respecter les proportions entre l'hème et les globines. Les essais utilisant le groupe hème synthétisé à partir de  $\text{FeCl}_3$  sous forme solide (Essai A :  $^{56}\text{FeCl}_3$  commercial, Essai E ;  $^{56}\text{FeCl}_3$  synthétisé et Essai F :  $^{57}\text{FeCl}_3$  synthétisé) permettent la reconstitution de la molécule d'Hb. La **Figure 82** présente les chromatogrammes des essais pour lesquels la reconstitution de l'Hb a fonctionné à partir d'un groupe hème synthétisé. La molécule d'Hb reconstituée présente un profil chromatographique identique à celui obtenu avec l'étalon d'Hb. Le temps de rétention est d'environ 5 min.



**Figure 82** : Chromatogrammes des différentes solutions d'Hb synthétisées avec du  $^{56}\text{Fe}$  et du  $^{57}\text{Fe}$  comparés à l'étalon d'Hb. Les analyses sont effectuées par colonne échangeuse d'anions (Source Q) par détection VISIBLE à 415 nm.

Les conditions de reconstitution finales retenues correspondent donc à celles de l'essai F. Le protocole pour la reconstitution de l'Hb enrichie en Fe 57 est donc finalisé. La **Figure 83** présente le protocole final pour la reconstitution de l'Hb. Une solution de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  de  $^{57}\text{Fe}$ -hème synthétisé à un pH de 7,5 est ajoutée goutte à goutte dans les 5 mL de la solution d'Apo-Hb synthétisée. La coloration rouge caractéristique de la molécule d'Hb se fait petit à petit. Après une nuit à  $4^\circ\text{C}$ , une centrifugation de la solution est effectuée afin d'éliminer l'excès de chaînes de globines.



**Figure 83 : Protocole pour la reconstitution de la molécule d'Hb enrichie en <sup>57</sup>Fe.**

La **Figure 84** représente le protocole complet de synthèse de l'étalon marqué en <sup>57</sup>Fe d'Hb. Cette synthèse a été répétée afin de réaliser trois étalons marqués indépendants.

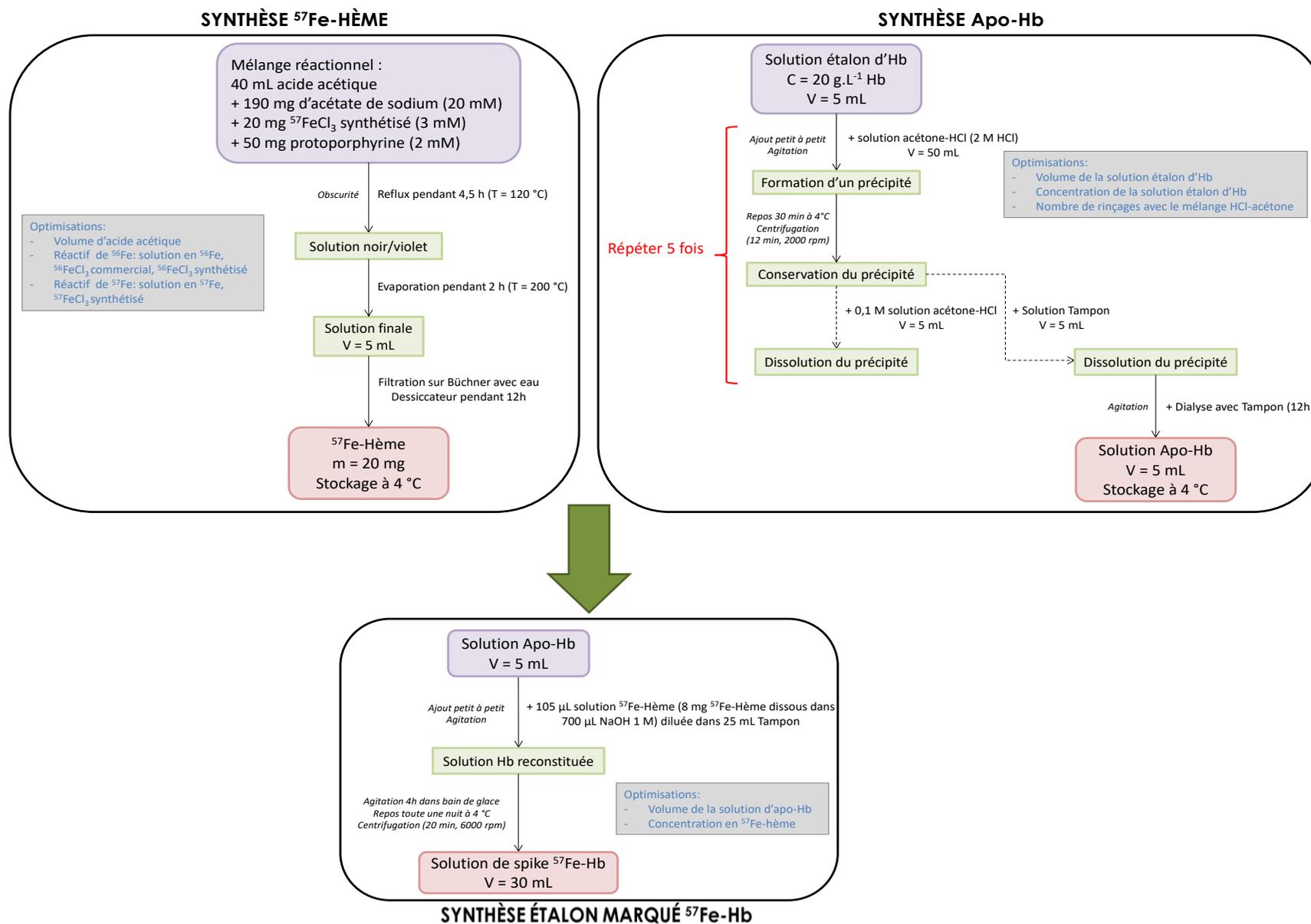


Figure 84 : Protocole final de synthèse de l'étalon marqué <sup>57</sup>Fe-Hb.

### 2.6.3.2.3. Caractérisation de l'étalon marqué $^{57}\text{Fe}$ -Hb

L'objectif de cette partie est de caractériser l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$  d'Hb qui sera utilisé pour la mise en place de l'ID en mode spécifique. Différentes caractérisations vont être effectuées :

- Détermination de l'abondance isotopique
- Détermination de la présence d'espèces autre que l'Hb

#### Détermination de l'abondance isotopique

Afin de mettre en place l'ID en mode spécifique, il est nécessaire de caractériser l'étalon marqué synthétisé de  $^{57}\text{Fe}$ -Hb en isotopie. Il est caractérisé pour les quatre isotopes stables du Fe : 54, 56, 57 et 58. Pour cela, différentes méthodes sont testées afin d'utiliser la plus adaptée et la plus juste. En effet, étant donné que c'est l'isotopie du Fe lié à l'Hb qui nous intéresse, l'échantillon peut subir une minéralisation afin d'éliminer toute la matrice et faciliter l'analyse de l'isotopie. La méthode de minéralisation effectuée est la même que celle présentée dans le paragraphe 1.3.1. La comparaison des résultats avec ou sans minéralisation est effectuée.

De plus, la présence d'espèces ferriques autres que l'Hb ou de Fe libre pouvant modifier l'isotopie réelle de l'étalon marqué, la comparaison avec ou sans ultrafiltration à 30 kDa est réalisée.

Enfin, le biais en masse du MS peut être déterminé par rapport aux mesures isotopiques des rapports isotopiques  $^{54}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ ,  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ ,  $^{58}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$  d'un étalon de haute pureté en Fe (BNM-001) à isotopie naturelle ou d'un étalon d'Hb (H7379). Le **Tableau 74** regroupe les différents tests sur la méthode pour caractériser l'isotopie de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb.

**Tableau 74 : Caractérisation isotopique de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb selon différents modes de préparation de l'échantillon**

Isotopes	Abondances isotopiques (% atomique) Sans minéralisation (n=4)	Abondances isotopiques (% atomique) Avec minéralisation (n=4)	Abondances isotopiques (% atomique) Avec minéralisation Avec ultrafiltration à 30 kDa (n=4)
$^{54}\text{Fe}$	0,28 ± 0,09	0,36 ± 0,03	0,14 ± 0,03
$^{56}\text{Fe}$	5,35 ± 1,46	6,58 ± 0,30	3,17 ± 0,33
$^{57}\text{Fe}$	92,47 ± 1,31	91,44 ± 0,30	94,63 ± 0,42
$^{58}\text{Fe}$	1,90 ± 0,36	1,63 ± 0,03	2,05 ± 0,08

Pour tous les isotopes du Fe, il n'y a pas de différence caractéristique selon les méthodes utilisées. Cependant, la dispersion des résultats est plus importante lorsque l'échantillon n'est pas minéralisé et l'isotopie déterminée avec le traitement d'échantillon utilisant la minéralisation associée à l'ultrafiltration est plus proche de celle déterminée pour l'étalon marqué inorganique  $^{57}\text{Fe}$  utilisé pour la synthèse de cet étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb (voir **Tableau 24**).

Ainsi la méthode retenue pour caractériser isotopiquement l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb consiste à effectuer une ultrafiltration à 30 kDa de l'échantillon avant de le minéraliser. Les solutions d'étalon de Fe naturel (BNM-001, haute pureté) et d'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$ -Hb sont alors préparées afin d'obtenir une concentration finale d'environ  $10 \mu\text{g.g}^{-1}$  Fe. Les abondances isotopiques sont déterminées par calculs après mesures par ICPMS des rapports isotopiques  $^{54}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ ,  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ ,  $^{58}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ . Ainsi, deux déterminations ( $p=2$ ) sur différents mois, de 3 réplicats ( $n=3$ ) chacune dans la même journée ont été réalisées pour caractériser la composition isotopique des étalons marqués d'Hb enrichi en  $^{57}\text{Fe}$ . Le **Tableau 75** résume les abondances isotopiques obtenues pour les trois étalons marqués synthétisés.

**Tableau 75 : Abondances isotopiques obtenues pour les différents étalons marqués de  $^{57}\text{Fe}$ -Hb synthétisés.**

Etalon marqué ( $n \times p=6$ )	Abondance $^{54}\text{Fe}$ (% atomique)	Abondance $^{56}\text{Fe}$ (% atomique)	Abondance $^{57}\text{Fe}$ (% atomique)	Abondance $^{58}\text{Fe}$ (% atomique)
1	$0,14 \pm 0,03$	$3,17 \pm 0,33$	$94,63 \pm 0,42$	$2,05 \pm 0,08$
2	$0,28 \pm 0,17$	$4,79 \pm 2,57$	$90,02 \pm 5,68$	$4,91 \pm 3,40$
3	$0,30 \pm 0,21$	$6,44 \pm 4,30$	$90,51 \pm 3,86$	$2,75 \pm 0,64$
<b>Moyenne (<math>k=1</math>)</b>	<b><math>0,24 \pm 0,15</math></b>	<b><math>4,80 \pm 2,80</math></b>	<b><math>91,72 \pm 4,38</math></b>	<b><math>3,00 \pm 2,55</math></b>

L'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$ -Hb présente donc une abondance isotopique majoritaire d'environ  $(91,72 \pm 4,38)$  % pour l'isotope 57 et la stabilité a été mesurée sur une période d'un mois.

### Détermination de la présence d'impuretés

La solution d'étalon marqué d'Hb est également analysée par chromatographie d'exclusion stérique (conditions expérimentales du **Tableau 69**) afin d'évaluer la présence d'impuretés provenant d'autres espèces que l'Hb. La **Figure 85** présente les chromatogrammes obtenus en exclusion stérique couplée à une détection VISIBLE à 280 nm et une détection ICPMS à  $^{56}\text{Fe}$  et  $^{57}\text{Fe}$ .

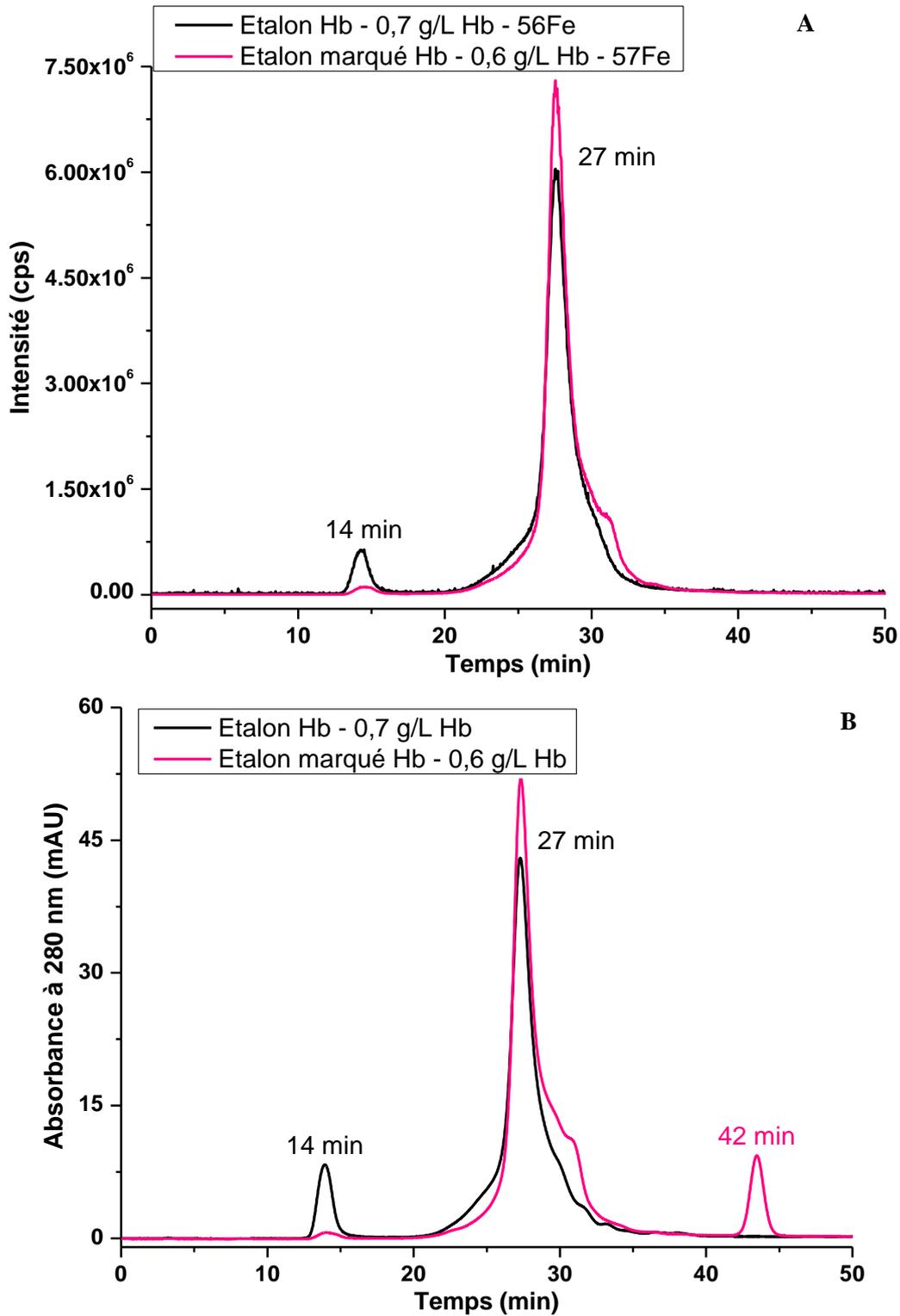


Figure 85 : Chromatogrammes de l'étalon d'Hb et de l'étalon marqué d'Hb obtenus par exclusion stérique et détection VISIBLE à 280 nm et ICPMS à  $^{56}\text{Fe}$  et  $^{57}\text{Fe}$ .

L'impureté contenant du Fe observée à 14 min pour l'étalon d'Hb n'est plus significativement présente dans l'étalon marqué (Figure 85A). Cependant, lors de l'analyse avec détection à 280 nm (Figure 85B), une impureté à 42 min (inférieure à 30 kDa) est observée. Cette espèce ne contient pas

de Fe puisqu'elle n'est pas détectée en ICPMS à  $^{56}\text{Fe}$  et  $^{57}\text{Fe}$ . Toutefois cette impureté est éliminée après ultrafiltration à 30 kDa de l'étalon marqué d'Hb. **L'étalon marqué ne contient donc pas d'impureté.**

L'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  d'Hb présente donc une isotopie en  $^{57}\text{Fe}$  acceptable de  $92 \pm 4 \%$ . L'analyse par chromatographie d'exclusion stérique ne montre pas la présence d'impureté. Nous disposons donc d'un étalon d'Hb enrichi en  $^{57}\text{Fe}$  permettant la mise en place de la dilution inverse en mode spécifique.

#### 2.6.3.2.4. Mise en place du protocole métrologique de l'ID en mode spécifique

Le protocole métrologique de l'ID en mode spécifique est représenté par la **Figure 86**. Ce protocole met en évidence l'utilisation d'étalon primaire en Fe traçables au SI afin d'étalonner les étalons secondaires en Hb utilisés pour l'ID en mode spécifique.

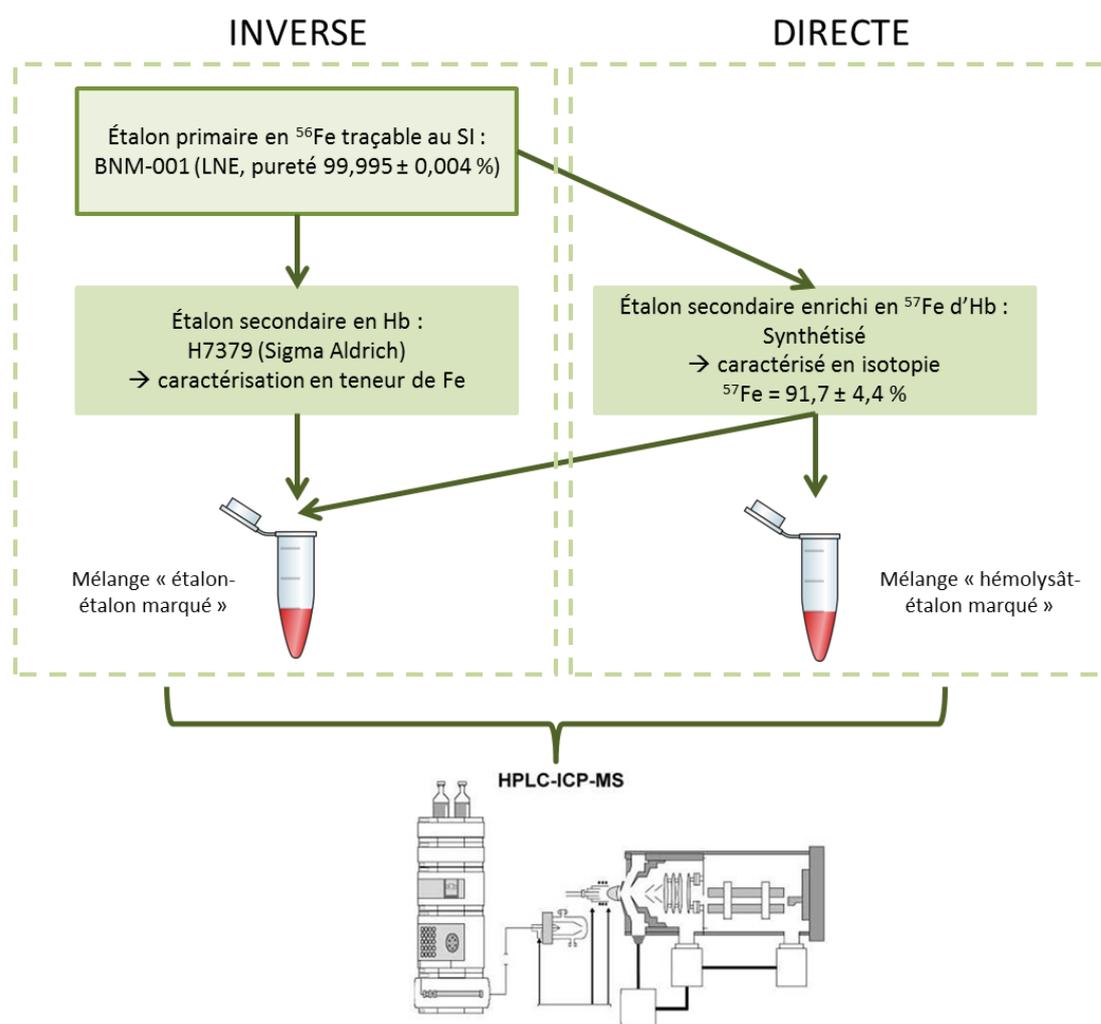


Figure 86 : Workflow expliquant l'approche quantitative de l'Hb par ID en mode spécifique.

La mise en place de la double ID en mode spécifique repose sur le même principe que pour la double ID-ICPMS. L'ID directe consiste à déterminer la concentration en Hb contenue dans un échantillon d'hémolysat en utilisant l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb synthétisé et caractérisé en abondance isotopique à partir de l'étalon primaire en Fe de haute pureté. Par ailleurs, l'ID inverse permet de caractériser l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb synthétisé en concentration à partir de l'utilisation d'un étalon secondaire d'Hb. Cet étalon secondaire est lui-même caractérisé par l'évaluation de sa concentration à travers sa teneur en Fe en utilisant l'étalon primaire en Fe de haute pureté.

L'équation obtenue afin de déterminer la concentration en Hb ( $C_s$  en  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  Hb) dans de l'hémolysat est la suivante :

$$C_s = W_{sp} \cdot \frac{m_{eta}}{m_{spi}} \cdot \frac{m_{spd}}{m_s} \cdot \frac{(A_{eta}^a - R_{inv}^{a/b} k_{inv} A_{eta}^b)}{(R_{inv}^{a/b} k_{inv} A_{sp}^b - A_{sp}^a)} \cdot \frac{(R_{dir}^{a/b} k_{dir} A_{sp}^b - A_{sp}^a)}{(A_s^a - R_{dir}^{a/b} k_{dir} A_s^b)} \cdot F_{dilution} \cdot \rho_{hémolysat} \cdot \frac{1 \cdot M_{Hb}}{4 \cdot M_{Fe}}$$

### Équation 50

Avec:

- $W_{sp}$  : fraction massique de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb dans le mélange « étalon-étalon marqué » ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Fe)
- $m_{eta}$  : masse de l'étalon d'Hb dans le mélange « étalon-étalon marqué » (mg)
- $m_{spi}$  : masse de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb dans le mélange « étalon-étalon marqué » (mg)
- $A_{eta}^a$  : abondance naturelle de l'isotope A ( $^{56}\text{Fe}$ ) dans l'étalon d'Hb (valeur IUPAC)
- $A_{eta}^b$  : abondance naturelle de l'isotope B ( $^{57}\text{Fe}$ ) dans l'étalon d'Hb (valeur IUPAC)
- $R_{inv}^{a/b}$  : rapport isotopique  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$  dans le mélange « étalon-étalon marqué »
- $k_{inv}$  : facteur de correction de biais en masse pour l'ID inverse
- $A_{sp}^a$  : abondance de l'isotope A ( $^{56}\text{Fe}$ ) dans l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb
- $A_{sp}^b$  : abondance de l'isotope B ( $^{57}\text{Fe}$ ) dans l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb
- $m_{spd}$  : masse de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb dans le mélange « échantillon-étalon marqué » (mg)
- $m_s$  : masse de l'échantillon dans le mélange « échantillon-étalon marqué » (mg)
- $R_{dir}^{a/b}$  : rapport isotopique  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$  dans le mélange « échantillon-étalon marqué »
- $k_{dir}$  : facteur de correction de biais en masse pour l'ID directe
- $A_s^a$  : abondance de l'isotope A ( $^{56}\text{Fe}$ ) dans l'échantillon
- $A_s^b$  : abondance de l'isotope B ( $^{57}\text{Fe}$ ) dans l'échantillon
- $F_{dilution}$  : facteur de dilution de l'hémolysat
- $\rho_{hémolysat}$  : masse volumique de l'hémolysat ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
- $M_{Hb}$  : masse moléculaire de l'Hb (64458 Da)
- $M_{Fe}$  : masse atomique du Fe (55,845  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

Les rapports isotopiques  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$  des différents mélanges sont déterminés après intégration des profils chromatographiques obtenus pour le  $^{56}\text{Fe}$  et  $^{57}\text{Fe}$  avec le logiciel Origin.

Le protocole analytique pour l'ID en mode spécifique est effectué selon la même trame que celui expliqué dans le Chapitre 2 pour la double ID (Fe)-ICPMS (paragraphe 1.5). Un rapport isotopique autour de 1 entre  $^{56}\text{Fe}$  (isotope A) et  $^{57}\text{Fe}$  (isotope B) a été choisi pour la préparation des échantillons. Toutes les dilutions ont été effectuées par gravimétrie (balances  $d=0,1$  mg et  $d=0,001$  mg) et dans une solution tampon à 10 mM Tris (pH 7,5-8,0).

Pour la mise en place de l'ID directe, les échantillons d'hémolysats du CRM JCCRM 912-2 subissent une dilution dans la solution tampon afin d'obtenir une concentration moyenne de  $1,2 \mu\text{g.kg}^{-1}$  Hb ( $\approx 4,0 \text{ ng.kg}^{-1}$  Fe). Les mélanges « échantillon-étalon marqué » sont préparés en ajoutant 45 à 200 mg de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb et 20 à 120 mg de CRM.

Pour l'ID inverse, une solution mère d'étalon d'Hb (H7379) de  $1 \text{ g.kg}^{-1}$  Hb est préparée de façon journalière et caractérisée par la méthode de la double (Fe)-ID-ICPMS développée au Chapitre 2 pour assurer la traçabilité au SI. Les mélanges « étalon-étalon marqué » sont préparés en ajoutant 60 à 200 mg de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb et 50 à 160 mg d'étalon d'Hb.

Pour la correction du biais en masse, une solution journalière d'étalon d'Hb d'environ  $70 \text{ mg.kg}^{-1}$  Hb contenant les abondances naturelles du Fe est préparée et analysée.

Les mélanges « échantillon-étalon marqué » et « étalon-étalon marqué » sont préparés en au moins quatre réplicats chacun et possèdent une concentration finale comprise entre  $60$  et  $80 \text{ mg.kg}^{-1}$  Hb ( $200$  et  $280 \mu\text{g.kg}^{-1}$  Fe). Ces solutions sont analysées par HPLC-ICPMS en échange d'anions. Les conditions analytiques des instruments HPLC et ICPMS sont présentées au paragraphe 2.4 de ce chapitre.

Une séquence typique d'ID en mode spécifique est présentée ci-dessous:

- Blanc réactif (solution tampon)
- Biais en masse : étalon d'Hb ( $\approx 70 \text{ mg.kg}^{-1}$  Hb)
- Mélange ID directe (« échantillon-étalon marqué »)
- Mélange ID inverse (« étalon-étalon marqué »)
- Blanc réactif (solution tampon)
- Biais en masse : étalon d'Hb ( $\approx 70 \text{ mg.kg}^{-1}$  Hb)
- Mélange ID directe (« échantillon-étalon marqué »)
- etc.

#### 2.6.3.2.5. Calcul des incertitudes

La démarche adoptée pour évaluer les incertitudes est similaire à celle décrite pour la double ID classique, expliquée dans le Chapitre 2 (paragraphe 1.5). Après avoir défini l'écriture du modèle

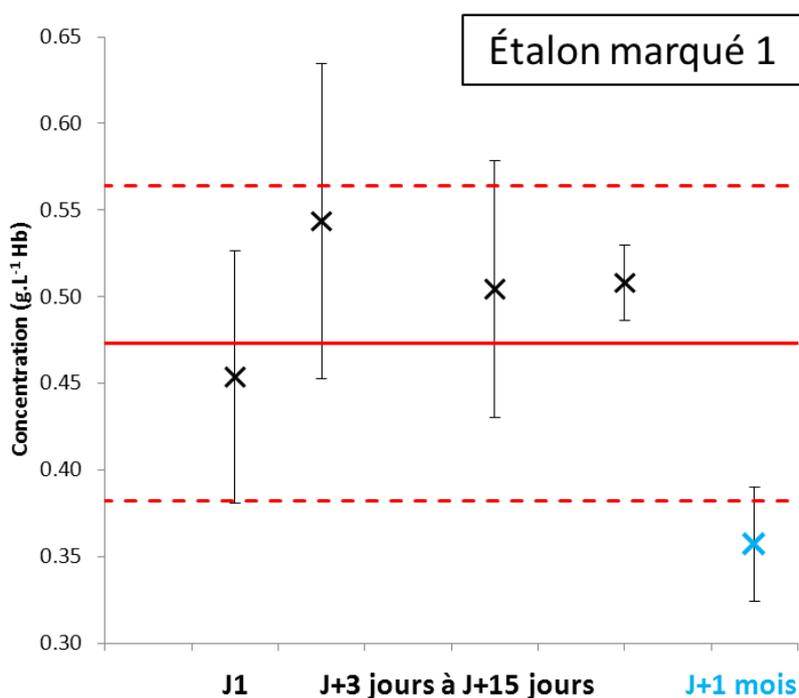
mathématique correspondant à la détermination de l'Hb totale par ID en mode spécifique (**Equation 50**) ainsi qu'évaluer les incertitudes-types de chaque grandeur d'entrée, l'incertitude-type composée du résultat,  $u_{Cs}$ , est calculée à partir du logiciel Wincert. Le résultat est accompagné de son incertitude élargie,  $U$ , calculée avec un facteur d'élargissement,  $k$ , égal à 2.

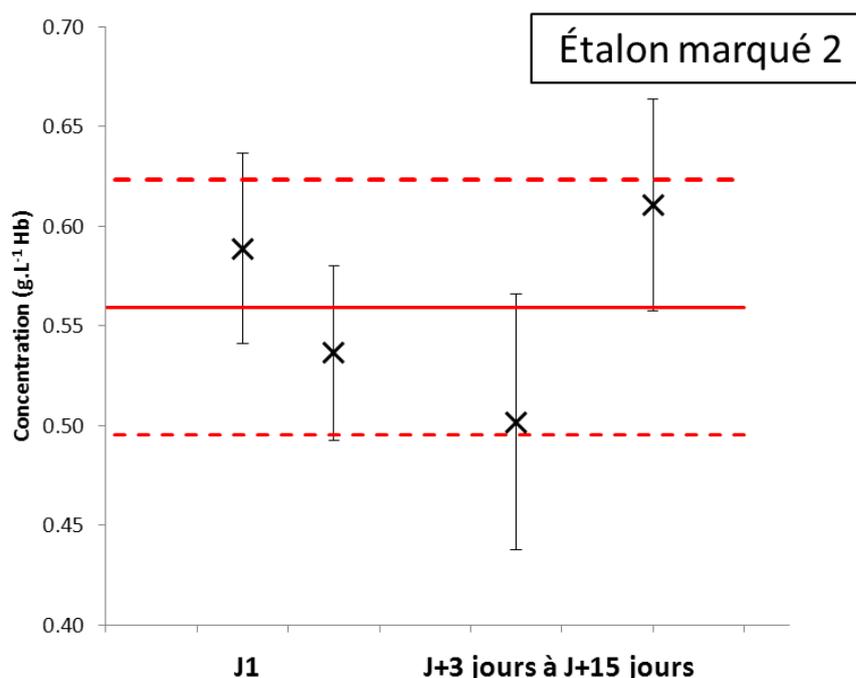
### 2.6.3.2.6. Résultats

Cette partie présente les résultats obtenus pour la détermination de la stabilité de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb synthétisé et pour l'analyse du matériau certifié en Hb, JCCRM 912-2, par ID en mode spécifique.

#### Détermination de la stabilité de l'étalon marqué $^{57}\text{Fe}$ -Hb

Afin de déterminer la stabilité de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb synthétisé, la concentration en Hb de différents étalons marqués est déterminée par analyse en ID inverse lors de la mise en place du protocole d'ID en mode spécifique. Ces analyses ont été effectuées seulement pour deux des trois étalons marqués synthétisés et sur plusieurs jours différents. Les résultats sont présentés dans la **Figure 87**.





**Figure 87 : Evaluation de la concentration en Hb dans deux étalons marqués synthétisés d'Hb différents (1 et 2). Les valeurs correspondent à celles évaluées par ID inverse en mode spécifique. La ligne continue de couleur rouge représente la valeur moyenne obtenue et les lignes discontinues représentent l'incertitude associée à cette valeur moyenne.**

Ces analyses mettent en évidence que la concentration de l'étalon marqué est stable sur une durée de 15 jours et a tendance à diminuer lorsque cette période est dépassée.

### Première détermination de la teneur en Hb dans le CRM JCCRM 912 par ID en mode spécifique

L'analyse par ID en mode spécifique du JCCRM 912-2L a été réalisée en préparant quatre réplicats (n=4) indépendants et analysés sur une même journée. L'étalon marqué <sup>57</sup>Fe-Hb utilisé est le deuxième étalon marqué synthétisé. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 76**.

**Tableau 76 : Résultats de l'analyse du JCCRM 912-2L par ID en mode spécifique lors d'une première détermination.**

Concentration JCCRM 912-2L (g.L <sup>-1</sup> Hb, k=2) ID directe	Valeur de référence (g.L <sup>-1</sup> Hb, k=2)	Erreur relative (%)
120,8 ± 6,6	78,0 ± 0,9	+ 55 %

L'erreur relative par rapport à la valeur de référence est donc de 55 %. Les profils chromatographiques sont très similaires entre l'étalon marqué d'Hb et l'étalon primaire d'Hb pour l'ID inverse comme le montre la **Figure 88**. Pour l'ID directe, les profils sont plus éloignés ce qui engendre une différence importante dans le rapport isotopique mesuré <sup>56</sup>Fe/<sup>57</sup>Fe et celui calculé ( $R_{\text{calculé}} \approx 1$ ).

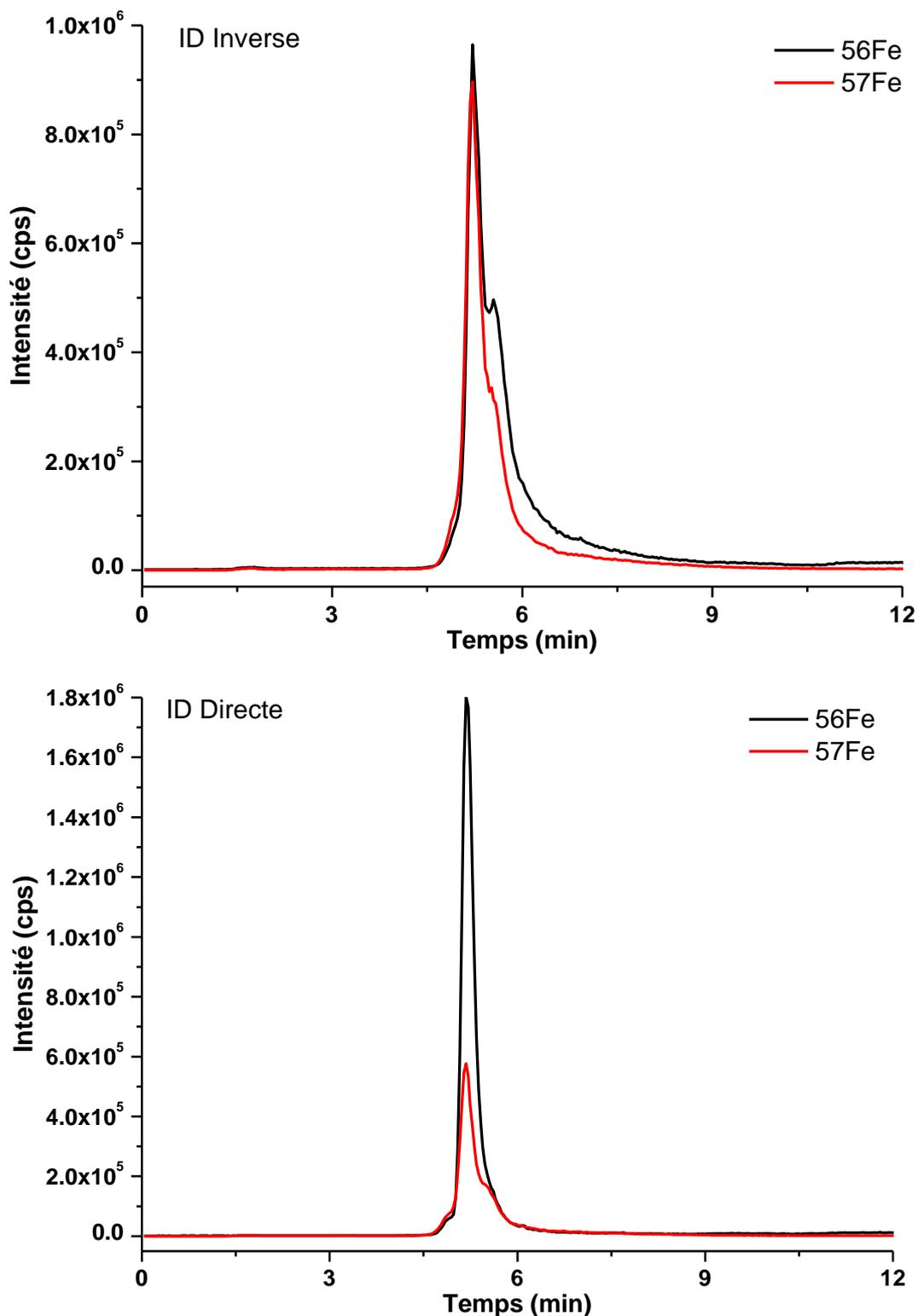


Figure 88 : Profils chromatographiques obtenus par ID en mode spécifique. La courbe rouge représente l'intensité relative à l'isotope 57 du Fe et la courbe noire représente l'intensité relative à l'isotope 56 du Fe.

### Causes de l'erreur relative élevée

Nous avons donc recherché les causes pouvant expliquer l'obtention d'une erreur relative supérieure à 50 % lors de l'analyse du CRM en Hb par ID en mode spécifique en utilisant l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb synthétisé. Pour cela différents tests sont effectués :

- 1/ Évaluation d'une dégradation éventuelle du CRM (JCCRM 912-2) utilisé pour l'analyse
- 2/ Évaluation d'une mauvaise synthèse de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb
- 3/ Évaluation d'une différence d'espèce d'Hb entre l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb et l'échantillon d'hémolysat (JCCRM 912-2)

#### 1/ Dégradation éventuelle du CRM JCCRM 912-2

Afin de s'assurer que notre échantillon n'a pas subi de dégradation au cours du temps, il est analysé par la méthode (Fe)-ID-ICPMS, précédemment développée, et les résultats sont comparés à ceux obtenus antérieurement (**Tableau 34**) par l'approche n'utilisant pas le couplage HPLC-ICPMS. A partir de la solution du CRM utilisée pour l'analyse par ID en mode spécifique, quatre réplicats (n=4) sont préparés pour être analysés par double (Fe)-ID-ICPMS en ajoutant l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$  inorganique. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 77**.

**Tableau 77 : Résultats de l'analyse de la solution de JCCRM 912-2L par double (Fe)-ID-ICPMS comparés à ceux obtenus lors de la validation de la méthode dans le paragraphe 1.**

	Fe, mg.L <sup>-1</sup> (k=2)	Hb, g.L <sup>-1</sup> (k=2)	Hb (certifiée) g.L <sup>-1</sup> (k=2)	Erreur relative (%)
JCCRM 912-2L (n×p=9) (Tableau 34)	276,8 ± 11,1	79,9 ± 3,2	78,0 ± 0,9	+ 2,4
JCCRM 912-2L (n=4) Etalon marqué $^{57}\text{Fe}$ inorganique	297,0 ± 18,4	85,7 ± 5,3		+ 9,9

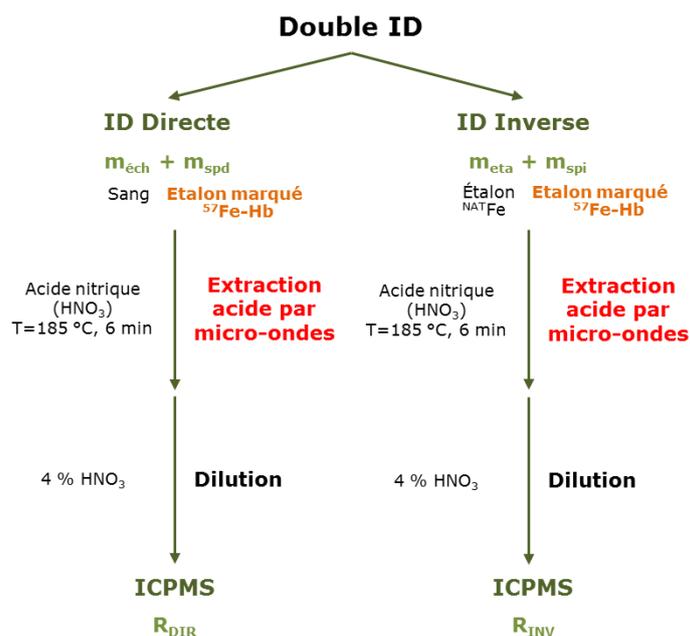
L'erreur relative observée par rapport à la valeur de référence est plus élevée car l'ID a été préparée à partir de l'échantillon utilisé pour l'ID en mode spécifique. Cependant, la valeur est compatible avec la valeur moyenne déterminée lors de la validation de la méthode dans le paragraphe 1.5.2 puisque l'écart normalisé est inférieur à 2 ( $E_N = 1,97$ ). Ainsi une pollution due à la préparation d'échantillon est envisagée.

**L'hypothèse de la dégradation du CRM qui pourrait expliquer l'erreur relative de 55 % obtenue par ID en mode spécifique n'est pas fondée.**

#### 2/ Mauvaise synthèse de l'étalon marqué $^{57}\text{Fe}$ -Hb

Afin de s'assurer que la synthèse de l'étalon marqué a été bien effectuée, celui-ci est utilisé pour analyser de nouveau la solution de CRM par (Fe)-ID-ICPMS : l'étalon marqué utilisé est un étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  inorganique ainsi il sera remplacé par l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb organique. Ainsi le

nouveau protocole analytique de la méthode (Fe)-ID-ICPMS est présenté par la **Figure 89**.



**Figure 89 : Protocole de la double (Fe)-ID-ICPMS adapté pour l'utilisation de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe-Hb}$ .**

Les mélanges « échantillon-étalon marqué » et « étalon-étalon marqué » subissent une extraction acide par micro-ondes. A partir de la solution du CRM utilisée pour l'analyse par ID en mode spécifique, quatre réplicats ( $n=4$ ) sont préparés pour être analysés par double (Fe)-ID-ICPMS avec l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe-Hb}$ . Les résultats sont présentés dans le **Tableau 78**.

**Tableau 78 : Résultats de l'analyse de la solution de JCCRM 912-2L par double (Fe)-ID-ICPMS en utilisant l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe-Hb}$  comparés à ceux obtenus lors de la validation de la méthode (Tableau 34).**

	Fe, $\text{mg.L}^{-1}$ ( $k=2$ )	Hb, $\text{g.L}^{-1}$ ( $k=2$ )	Hb (certifiée) $\text{g.L}^{-1}$ ( $k=2$ )	Erreur relative (%)
JCCRM 912-2L ( $n \times p=9$ ) (Tableau 34)	$276,8 \pm 11,1$	$79,9 \pm 3,2$		+ 2,4
JCCRM 912-2L ( $n=4$ ) Etalon marqué $^{57}\text{Fe-Hb}$ organique	$289,3 \pm 18,3$	$83,5 \pm 5,3$	$78,0 \pm 0,9$	+ 7,1

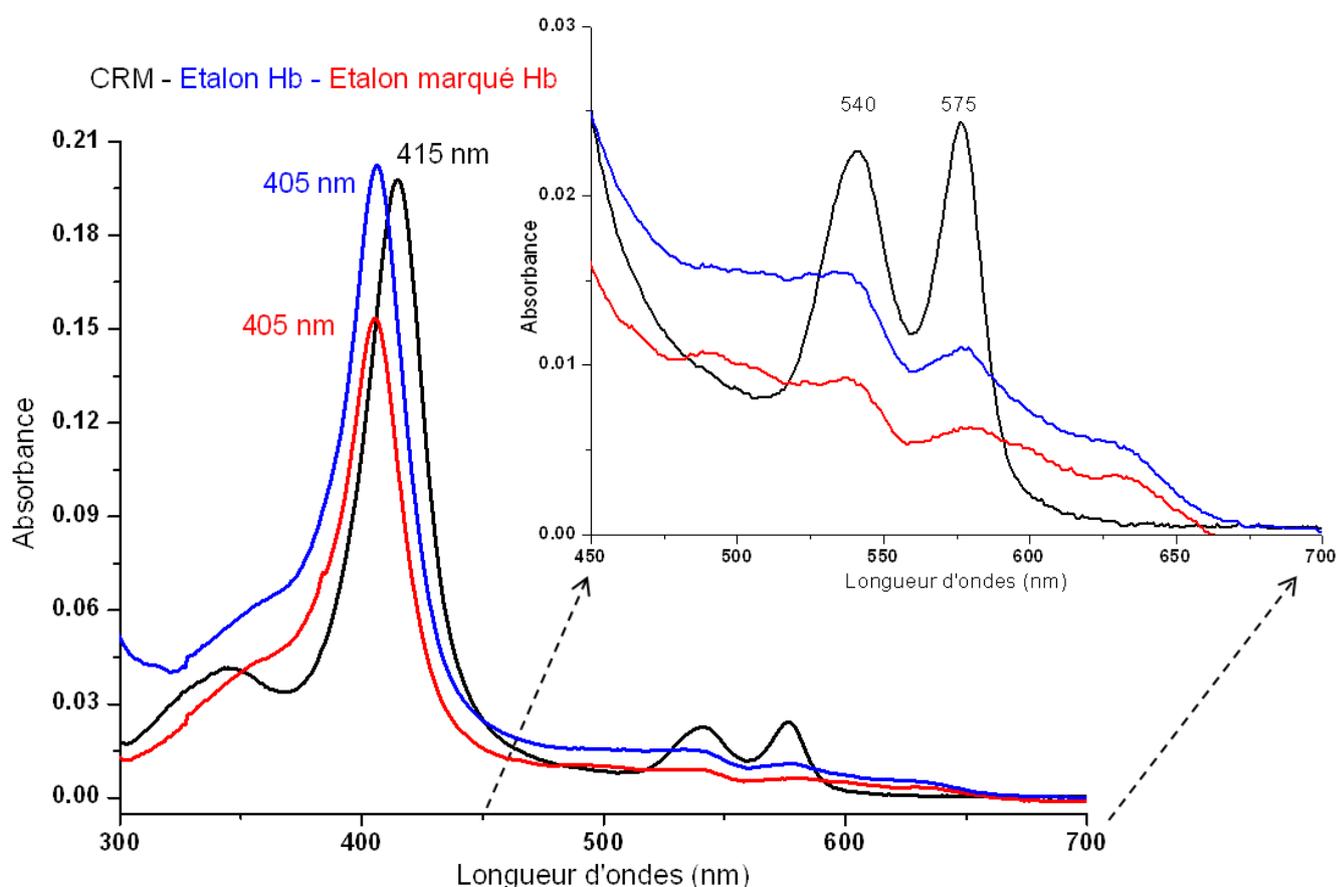
L'erreur relative observée par rapport à la valeur de référence est un peu plus élevée mais elle reste compatible avec les résultats précédents. La valeur est aussi compatible avec la valeur moyenne déterminée lors de la validation de la méthode (Fe)-ID-ICPMS puisque l'écart normalisé est inférieur à 2 ( $E_N = 1,38$ ) mais aussi avec la valeur obtenue sur le même échantillon mais avec l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$  inorganique ( $85,7 \pm 5,3 \text{ g.L}^{-1}$  Hb, **Tableau 77**).

L'hypothèse de la mauvaise synthèse de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe-Hb}$  qui pourrait expliquer l'erreur relative de 55 % obtenue par ID en mode spécifique n'est pas fondée.

### 3/ Différentes espèces d'Hb entre l'étalon marqué et l'échantillon

L'objectif de cette évaluation est de déterminer sous quelle forme d'Hb se trouve les échantillons mis en jeu lors de l'application de l'ID en mode spécifique : l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe-Hb}$ , l'étalon d'Hb et l'échantillon (CRM JCCRM 912).

Les différentes solutions utilisées pour la préparation de l'ID en mode spécifique ; la solution de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe-Hb}$ , la solution d'étalon d'Hb et la solution de CRM JCCRM 912-2, sont analysées par spectrophotométrie mètre en mode « scan » permettant un balayage de longueurs d'ondes comprises entre 300 et 700 nm. La **Figure 90** montre les profils d'absorption obtenus pour chaque solution.



**Figure 90** : Profils d'absorption pour les solutions de CRM, d'étalon d'Hb et de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe-Hb}$  par analyse par spectrophotométrie.

Le **Tableau 79** regroupe les longueurs d'ondes caractéristiques de ces espèces d'Hb identifiées dans la **Figure 90**.

**Tableau 79** : Longueurs d'ondes caractéristiques des espèces d'Hb étudiées.

Type d'espèce d'Hb	Longueur d'onde caractéristique
<b>HbO<sub>2</sub></b>	415 nm – 540 / 575 nm
<b>MétHb</b>	405 nm – 500/540/575/630 nm

Ces analyses permettent de mettre en évidence une différence d'espèces d'Hb entre le CRM (pic caractéristique à 415 nm) et l'étalon d'Hb et l'étalon marqué (pic caractéristique à 405 nm). Ceci signifie que le CRM est sous forme d'HbO<sub>2</sub> qui représente l'espèce d'Hb où les liaisons entre les chaînes de globines laissent entrer facilement l'oxygène. Cette forme signifie que le Fe est au degré d'oxydation II (Fe<sup>2+</sup>). C'est sous cette forme majoritaire que Hb est présente dans l'organisme. L'étalon ainsi que l'étalon marqué sont eux sous forme de MétHb où le Fe ferreux (Fe<sup>2+</sup>) est oxydé en Fe ferrique (Fe<sup>3+</sup>). Cela se traduit par une perte de la capacité à créer une liaison avec l'oxygène.

L'erreur relative obtenue lors de l'analyse du CRM par ID en mode spécifique pourrait provenir de cette différence entre les espèces. En effet en observant les profils chromatographiques obtenus lors de la première détermination (**Figure 88**) pour l'ID inverse, on remarque que le rapport isotopique entre l'étalon d'Hb et l'étalon marqué <sup>57</sup>Fe-Hb, qui sont sous forme de MétHb, est proche de 1 (rapport attendu est de 1) contrairement à l'ID directe. **Ceci conforte l'hypothèse que l'erreur relative peut être liée à la différence entre les espèces d'Hb.** Il est donc nécessaire de convertir les différents échantillons afin d'obtenir la même espèce d'Hb, l'ID en mode spécifique nécessitant en effet que l'étalon marqué et l'échantillon soient d'espèces identiques pour avoir un comportement similaire.

### Conversion des espèces d'Hb

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées afin de convertir les espèces d'Hb sous la même forme :

- Conversion HbO<sub>2</sub> en MétHb : oxydation de Fe<sup>2+</sup> en Fe<sup>3+</sup> avec par exemple du nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) ou le K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> [219, 220].
- Conversion MétHb en HbO<sub>2</sub> : le bleu de méthylène peut être utilisé pour réduire le Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> contenu dans l'Hb [221, 222].
- Conversion en une autre espèce : les espèces d'Hb étudiées peuvent être converties en une espèce commune comme l'alcaline hématine (AH) ou l'HiCN [142, 147, 148].

Pour vérifier si les conversions sont effectuées ou non, les différents échantillons sont analysés par spectrophotométrie car chaque espèce d'Hb possède des longueurs d'onde d'absorption caractéristiques comme présenté dans le **Tableau 80**.

**Tableau 80 : Longueurs d'ondes caractéristiques des principales espèces d'Hb étudiées.**

Type d'espèce d'Hb	Longueur d'onde caractéristique
<b>HbO<sub>2</sub></b>	415 nm – 540 / 575 nm
<b>MétHb</b>	405 nm – 500/540/575/630 nm
<b>AHD</b>	400 nm – 574 nm
<b>HiCN</b>	420 nm – 540 nm

Le **Tableau 81** regroupe tous les types de conversion réalisés dans cette étude sur le CRM, l'étalon d'Hb et l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb. L'oxydation du Fe contenu dans le CRM est satisfaisante soit par ajout de  $\text{NaNO}_2$  soit par ajout de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ . La réduction de  $\text{Fe}^{3+}$  dans l'étalon d'Hb et l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb avec le bleu de méthylène par contre, n'a pas donné de résultat concluant. Enfin, la conversion de tous les échantillons en une même espèce d'Hb comme HiCN ou AH est concluante avec l'utilisation des réactifs commerciaux (AHD, *Drabkin's reagent*) ou avec le mélange  $\text{NaNO}_2+\text{KCN}$ .

**Tableau 81 : Récapitulatif de tous les modes de conversion effectués sur le CRM, l'étalon d'Hb et l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb.**

Type de conversion	Réactif	Conditions analytiques testées	Résultat
<b>HbO<sub>2</sub> → MétHb</b>	NaNO <sub>2</sub>	Concentration réactif : 0,15 à 2,5 mmol.L <sup>-1</sup> Concentration CRM : 0,5 à 2 g.L <sup>-1</sup> Hb Préparation CRM : dilué ou non dilué Temps de conversion : 1h à 10 jours	<b>Conversion correcte</b> quelles que soient les conditions utilisées
	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Concentration réactif : 0,2 à 0,6 mmol.L <sup>-1</sup> Concentration CRM : 1,5 g.L <sup>-1</sup> Hb Préparation CRM : dilué Temps de conversion : 1 à 30 min	
<b>MétHb → HbO<sub>2</sub></b>	Bleu de méthylène	Concentration réactif : 3 à 300 mg.L <sup>-1</sup> Concentration échantillon : 0,7 g.L <sup>-1</sup> Hb Temps de conversion : 2h à 1 jour	Conversion non effectuée
<b>MétHb, HbO<sub>2</sub> → AH</b>	AHD	Dilution réactif : 1:2 pour étalon et étalon marqué et 1:151 pour CRM Concentration échantillon : 0,5 g.L <sup>-1</sup> Hb Concentration CRM : 78 g.L <sup>-1</sup> Hb ou 0,2 g.L <sup>-1</sup> Hb Préparation CRM : dilué ou non dilué Temps de conversion : 1 min à 4h	<b>Conversion correcte</b> quelles que soient les conditions utilisées
	4 g NaOH, 25 g Triton, 1 L H <sub>2</sub> O	Dilution réactif : 1:2 et 1:4 Concentration échantillon : 0,5 à 1 g.L <sup>-1</sup> Hb Préparation échantillon : dilué Temps de conversion : 20 min	<b>Conversion effectuée</b> quelles que soient les conditions utilisées mais pas en AHD
<b>MétHb, HbO<sub>2</sub> → HiCN</b>	<i>Drabkin's reagent</i>	Dilution réactif : 1:2 pour tous les échantillons et 1:340 pour le CRM Concentration échantillon : 0,5 g.L <sup>-1</sup> Hb Concentration CRM : 137 g.L <sup>-1</sup> Hb ou 0,4 g.L <sup>-1</sup> Hb Préparation CRM : dilué ou non dilué Temps de conversion : 15 min à 2h30	<b>Conversion correcte</b> quelles que soient les conditions utilisées
	KCN	Concentration réactif : 2 à 10 mmol.L <sup>-1</sup> Concentration échantillon : 0,5 à 1 g.L <sup>-1</sup> Hb Concentration CRM : 78 g.L <sup>-1</sup> Hb ou 0,5 g.L <sup>-1</sup> Hb Préparation CRM : dilué ou non dilué Temps de conversion : 25 min à 3h Conversion : à température ambiante ou à 56°C	<b>Conversion correcte</b> quelles que soient les conditions utilisées pour MétHb mais conversion non effectuée pour HbO <sub>2</sub>
	NaNO <sub>2</sub> + KCN	Concentration réactif : 0,15 à 0,25 mmol.L <sup>-1</sup> NaNO <sub>2</sub> et 10 à 20 mmol.L <sup>-1</sup> KCN Concentration échantillon : 1,5 g.L <sup>-1</sup> Hb Préparation échantillon : dilué Temps de conversion : 3h à 10 jours	<b>Conversion correcte</b> quelles que soient les conditions utilisées

La **Figure 91** représente les profils d'absorption du CRM converti dans les différentes espèces d'intérêt obtenus par spectrophotométrie. Les profils sont bien caractéristiques de chaque espèce (HbO<sub>2</sub>, HiCN, AH et MétHb).

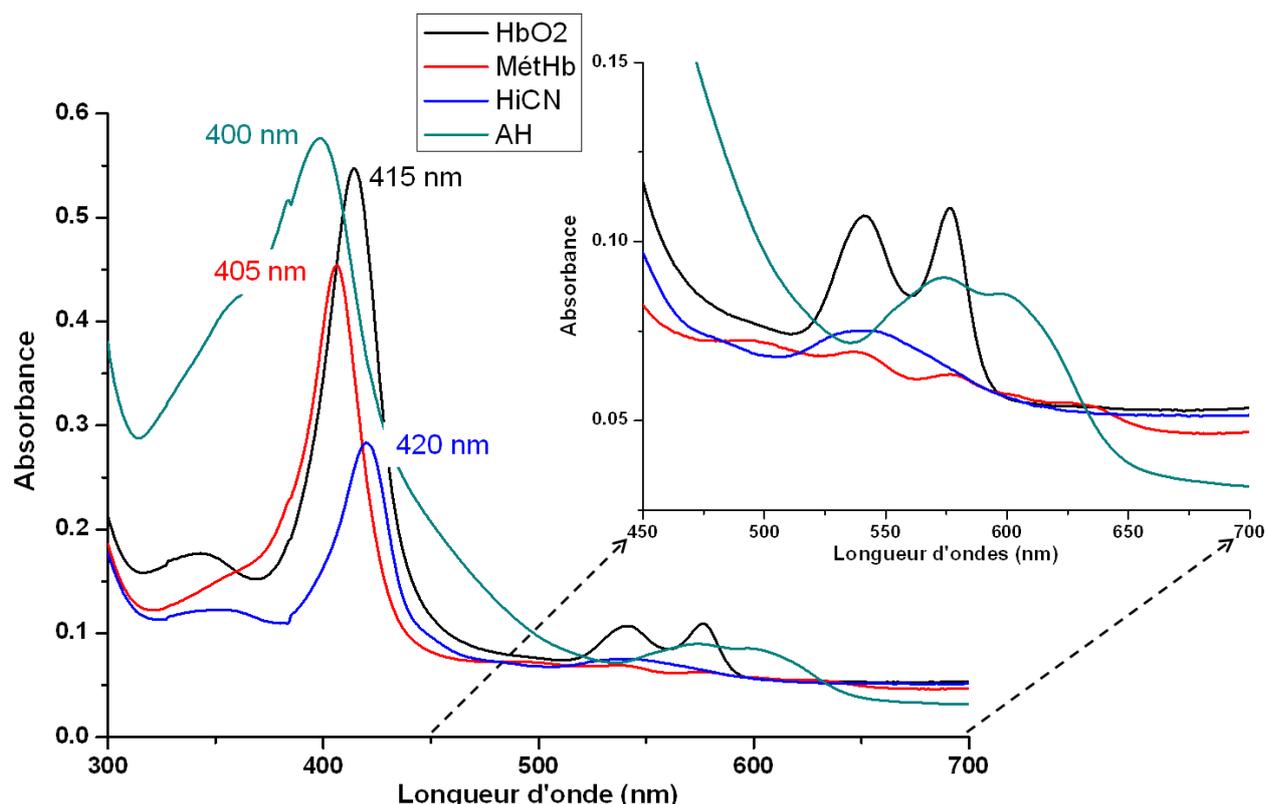


Figure 91 : Profils d'absorptions du CRM (HbO<sub>2</sub> convertie en HiCN, AH et MétHb. par spectrophotométrie

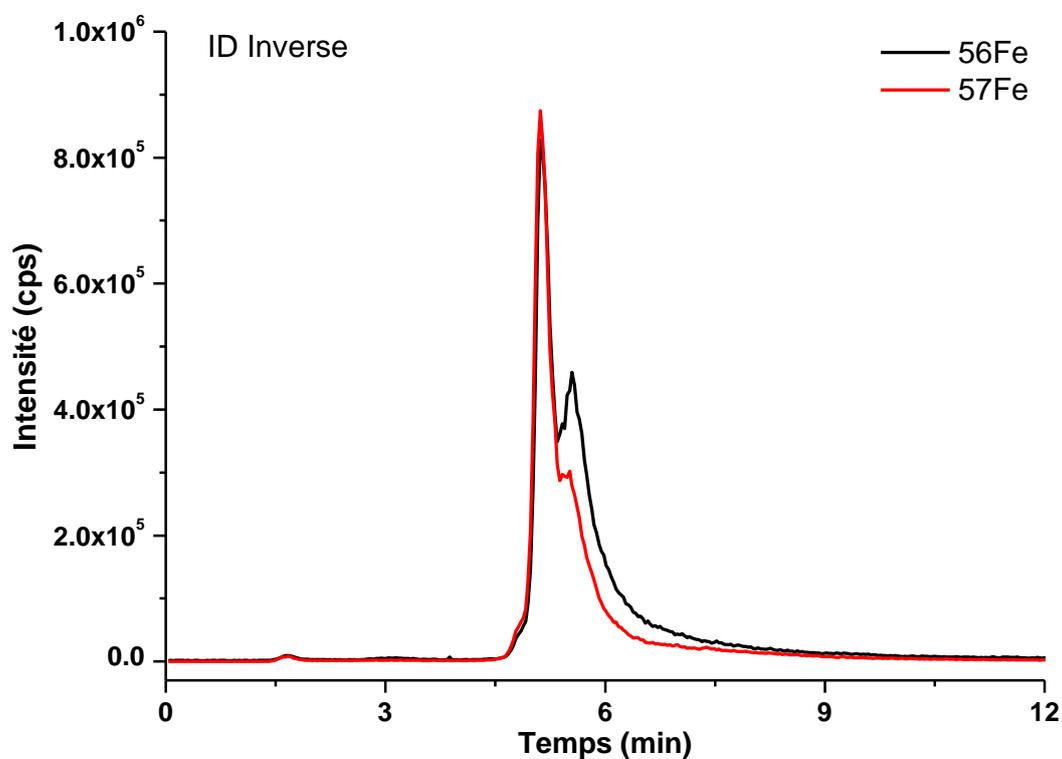
### Application de l'ID en mode spécifique sur les échantillons convertis par les différentes méthodes

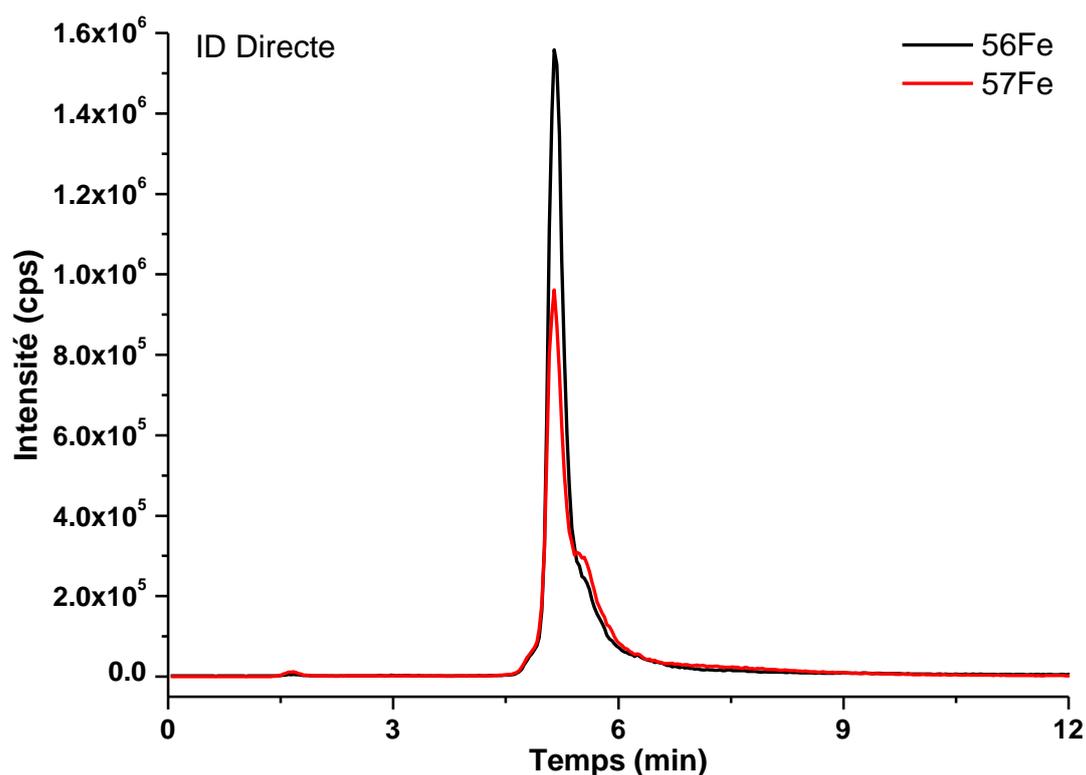
L'application de l'ID en mode spécifique est effectuée sur les échantillons (CRM, étalon d'Hb et étalon marqué <sup>57</sup>Fe-Hb) convertis par les différentes méthodes. Le **Tableau 82** résume les résultats obtenus selon les différentes méthodes de conversion de l'hémolysat JCCRM 912-2.

**Tableau 82 : Résultats de l'analyse du CRM JCCRM 912-2, convertis en MétHb, AH ou HiCN, par ID en mode spécifique.**

Type de conversion	Préparation des échantillons	Valeur de référence (g.L <sup>-1</sup> Hb, k=2)	Valeur mesurée (g.L <sup>-1</sup> Hb, k=2)	Erreur relative
<b>Conversion 1</b> HbO <sub>2</sub> → MétHb	0,15 mmol.L <sup>-1</sup> NaNO <sub>2</sub> 1h d'oxydation (n=2)	C <sub>ref</sub> = 78,0 ± 0,9	C <sub>m</sub> = 122,5 ± 5,0	+ 57 %
	10 jours d'oxydation (n=3)		C <sub>m</sub> = 114,9 ± 9,0	+ 47 %
	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 1h d'oxydation (n=2)	C <sub>ref</sub> = 78,0 ± 0,9	C <sub>m</sub> = 128,7 ± 6,5	+ 65 %
<b>Conversion 2</b> MétHb, HbO <sub>2</sub> → AH	Kit Haemodirect	Pas de séparation concluante donc pas d'exploitation		
<b>Conversion 3</b> MétHb, HbO <sub>2</sub> → HiCN	<i>Drabkin's reagent</i> 1h (n=2)	C <sub>ref</sub> = 137,2 ± 1,5	C <sub>m</sub> = 219,7 ± 15,0	+ 60 %
	NaNO <sub>2</sub> + KCN 3h d'oxydation (n=2)	C <sub>ref</sub> = 179,5 ± 2,1	C <sub>m</sub> = 266,1 ± 50,0	+ 48 %
	3 jours d'oxydation (n=3)	C <sub>ref</sub> = 78,0 ± 0,9	C <sub>m</sub> = 108,5 ± 8,2	+ 39 %
	7 jours d'oxydation (n=4)	C <sub>ref</sub> = 78,0 ± 0,9	C <sub>m</sub> = 105,5 ± 12,6	+ 35 %

Ces résultats mettent en évidence que la valeur de l'erreur relative entre la concentration mesurée par ID en mode spécifique et la concentration de référence du CRM n'est pas améliorée après la conversion de l'HbO<sub>2</sub> en MétHb ou en AH (erreur relative comprise entre 47 et 65 %). Par ailleurs, pour les échantillons convertis en HiCN avec le mélange NaNO<sub>2</sub> + KCN on observe une légère amélioration sur la valeur de l'erreur relative pour un temps d'oxydation supérieur à 3 jours par rapport à l'erreur relative initiale sans conversion de + 55 %. L'erreur relative passe de 48 % à 35 % selon le temps d'oxydation de l'échantillon (entre 3h et 7 jours). Ce paramètre est donc important pour ce type de conversion. Les profils chromatographiques obtenus pour les mélanges « échantillon-étalon marqué » et « étalon Hb-étalon marqué » sur le niveau 2L du CRM avec une durée d'oxydation de 7 jours sont représentés dans la **Figure 92**.





**Figure 92 : Profils chromatographiques obtenus par ID en mode spécifique après conversion des échantillons en HiCN. La courbe rouge représente l'intensité relative à l'isotope 57 du Fe et la courbe noire représente l'intensité relative à l'isotope 56 du Fe.**

Le profil chromatographique de l'ID inverse montre une proportion entre les isotopes 56 et 57 du Fe respectée ( $R_{\text{attendu}} \approx 1$ ), identique à celle du premier essai (**Figure 88**) sans conversion des échantillons. Cependant, une différence est observée pour les profils de l'ID directe puisque l'écart entre le profil de l'isotope 56 du Fe et celui de l'isotope 57 du Fe a diminué par rapport à la **Figure 88**. Cela signifie que le rapport isotopique pour l'ID directe se rapproche un peu plus de 1 par rapport à celui obtenu lors de la première détermination.

Cependant, un écart important entre la valeur de référence du CRM JCCRM 912 et la valeur mesurée est observé. D'autres méthodes de conversion peuvent aussi être élaborées comme l'utilisation de l'azoture de sodium afin d'oxyder l'échantillon. Cet écart peut peut-être s'expliquer par la différence de matrice entre l'étalon marqué et le CRM. Afin d'être plus juste, il serait nécessaire de synthétiser l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe-Hb}$  à partir du CRM. Dans ce cas, il n'y aurait pas de différence d'espèce entre l'échantillon et l'étalon marqué. Enfin, la conversion effectuée peut ne pas être totale. En effet, il peut y avoir une conversion partielle lors de l'étape de l'oxydation de l'échantillon. Cela pourrait engendrer la présence des deux espèces, MétHb et HbO<sub>2</sub>, simultanément. Une analyse par électrochimie pourrait peut-être nous indiquer la présence des deux formes d'oxydation du Fe ( $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$ ).

Les incertitudes finales sur ces résultats sont comprises entre 8 et 12 % où la contribution majeure est due à la concentration en étalon d'Hb déterminée au préalable par double (Fe)-ID-ICPMS.

### 3. Conclusion

La détermination de l'Hb dans des matrices sanguines par ID associée à l'ICPMS a été développée soit en minéralisant l'échantillon soit en appliquant la spéciation élémentaire selon deux modes : non-spécifique et spécifique. La validation a été réalisée par l'analyse du CRM en Hb totale (JCCRM 912-1 et JCCRM 912-2). La traçabilité des résultats est assurée par l'utilisation de l'étalon primaire en Fe de haute pureté (BNM-001) ainsi que par le calcul des incertitudes.

i) La méthode double (Fe)-ID-ICPMS est une approche simple à mettre en place et juste afin d'assurer une justesse des résultats (erreur relative inférieure à 3 %) avec de faibles incertitudes (inférieures à 4 %). Cependant, cette méthode est seulement applicable s'il n'y a pas de présence de Fe libre ou d'espèces contenant du Fe autre que l'Hb dans notre échantillon.

ii) Le mode non-spécifique, utilisant le  $^{57}\text{Fe}$  inorganique comme étalon secondaire, a permis d'obtenir une erreur relative raisonnable de  $-13\%$  sur l'analyse du CRM. Les incertitudes relatives obtenues pour cette méthode sont comprises entre 9 et 14 % où la contribution la plus importante est due à la fraction massique en Fe de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ .

iii) Pour le mode spécifique, la synthèse de l'étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$ -Hb a été effectuée avec succès. Une caractérisation complète a été réalisée en terme d'isotopie ( $^{57}\text{Fe}$ ,  $(92 \pm 4)\%$ ) et de stabilité (1 mois) en utilisant l'étalon d'Hb comme étalon secondaire et le Fe métallique de haute pureté comme étalon primaire. Cependant, c'est la forme oxydée de l'Hb ( $\text{Fe}^{3+}$ -MétHb) qui a été synthétisée alors que notre CRM se présente sous la forme non oxydée de l'Hb ( $\text{Fe}^{2+}$ -HbO<sub>2</sub>), une conversion des différents échantillons est donc nécessaire afin d'obtenir une seule et même espèce d'Hb. Dans cette étude, la conversion en HiCN avec une oxydation de l'échantillon en MétHb par ajout de NaNO<sub>2</sub> puis la conversion en HiCN après ajout de KCN présente les résultats les plus concluants (erreur relative comprise entre 35 et 39 %).

# CONCLUSION GÉNÉRALE



Le but des recherches entreprises au cours de cette thèse reposait sur la mise en œuvre de protocoles métrologiques permettant d'assurer la traçabilité au Système International des unités (SI) des analyses en biochimie clinique. Le LNE, laboratoire national de métrologie pour la France, se propose de disposer de telles techniques pour répondre aux besoins en qualité des analyses engendrées par les évolutions de la législation. Ainsi, en collaboration avec le LCABIE (UMR CNRS de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour), il a été décidé de développer des méthodes d'analyse par Dilution Isotopique (ID) associée à la Spectrométrie de Masse à Plasma Induit (ICPMS) tout en assurant leur traçabilité au SI.

Les techniques analytiques utilisées ont reposé sur l'utilisation de l'ICPMS soit pour effectuer des analyses en concentration totale, soit en y associant une méthode de séparation en amont, la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). Ces techniques ont été utilisées avec la mise en œuvre de l'ID comme méthode de dosage. L'ID, menée sous certaines conditions, est reconnue comme une méthode primaire par le BIPM, et son application permet la traçabilité des mesures au SI.

Les applications choisies reposaient sur l'étude du fer (Fe) et de ferroprotéines comme l'hémoglobine (Hb) présents dans les fluides biologiques humains (sérum, sang, etc.) puisque ceux sont des marqueurs d'importance en biologie médicale notamment pour le diagnostic de l'anémie.

La première partie du travail (**Chapitre 2**) a été consacrée à la mise en place d'une **méthode primaire par l'ID associée à l'ICPMS** afin de déterminer la **concentration totale en Fe** dans des fluides biologiques par minéralisation des échantillons. Le développement d'une méthode primaire de référence basée sur la mise en œuvre de l'ID-ICPMS pour la détermination du Fe total dans du sérum s'est montrée concluante. La validation du protocole analytique a été effectuée par l'analyse d'un matériau de référence certifié (SRM 1598a) ainsi que par la participation à la comparaison CCQM-K107 entre NMI. La traçabilité au SI des résultats obtenus a été établie à travers l'utilisation d'un étalon primaire certifié en Fe (BNM-001), par la mise en œuvre de protocoles métrologiques durant toutes les étapes de la préparation des échantillons et par l'établissement d'un bilan complet de l'incertitude de mesure.

L'application de cette méthode à d'autres échantillons de sérum (BCR-637 et échantillon du CNQ de l'ANSM B17) ainsi que dans une autre matrice comme le sang (Seronorm™) a démontré la validité de la méthode sur la mesure du Fe avec des incertitudes élargies relatives inférieures à 5 % ainsi que la faisabilité de l'application de la méthode pour l'assignation de valeurs de référence lors de programmes de contrôle qualité ainsi que pour la certification de matériaux de références.

Suite aux résultats positifs obtenus par le LNE lors de la comparaison clé CCQM-K107, le département Biomédical et Chimie inorganique du LNE a obtenu en 2015 l'accréditation Cofrac selon les référentiels ISO EN 17025 et ISO EN 15195 pour le dosage du Fe dans le sérum par ID-ICPMS. Ces travaux ont donné lieu à une publication (**Article 1 publié en Annexe 1**).

La méthode développée pourra ainsi être transférée à d'autres éléments essentiels comme par exemple des éléments d'importance en biologie médicale tels que les électrolytes (Cl, Mg, K) ou adaptée à d'autres matrices biologiques comme l'urine ou les tissus biologiques.

La deuxième partie du travail (**Chapitre 3**) a été dédiée au développement de **méthode primaire par ID-ICPMS** afin de doser **la concentration de l'Hb totale** dans des hémolysats.

i) La méthode développée dans le Chapitre 2 (Fe dans sérum) a été adaptée pour la détermination de l'Hb dans de l'hémolysat à partir de sa teneur en Fe en prenant en compte la stœchiométrie de la molécule :  $4\text{Fe}(\text{Hb})$ . La validation de la méthode (**Fe**)-**ID-ICPMS** a été réalisée par l'analyse du matériau de référence certifié en Hb (JCCRM 912-1 et 912-2). Cette méthode est une approche prometteuse pour assurer une justesse des résultats (erreur relative comprise entre 1 et 3 %) avec de faibles incertitudes (inférieures à 4 %). Les comparaisons des résultats obtenus pour les deux lots du MRC JCCRM avec d'autres méthodes comme les mesures spectrophotométriques ou d'autres techniques d'ID associées à l'ICPMS, la MS ou la spectroscopie Raman, ont permis de confirmer la validation de la méthode. Ces travaux ont donné lieu à un article en cours de révision (**Article 2 soumis en Annexe 2**). La traçabilité au SI des résultats obtenus a été établie à travers l'utilisation d'un étalon primaire certifié en Fe (BNM-001). Cependant, cette méthode est seulement applicable s'il n'y a pas de présence de Fe libre ou d'espèces contenant du Fe autre que l'Hb dans l'échantillon. C'est pour cette raison qu'il est nécessaire de développer une méthode d'analyse de spéciation permettant la quantification spécifique de l'Hb.

ii) Le développement de la méthode d'analyse en spéciation élémentaire pour le dosage spécifique de l'Hb a engendré le travail le plus conséquent de cette étude. La mise en place de cette méthode a nécessité de faire un choix sur la méthode de séparation adaptée pour l'analyse de l'Hb totale. Deux mécanismes de séparation ont été testés : échange de cations et échange d'anions. L'optimisation de la séparation ainsi que ses performances analytiques ont été évaluées à partir des deux types de détection : spectrométrie ICPMS ( $^{56}\text{Fe}$ ) et spectrophotométrie VISIBLE (415 nm). Le mécanisme qui reposait sur l'échange d'anions offrant de meilleures caractéristiques (pour la détection ICPMS : limite de détection de  $9 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Hb}$ , limite de quantification de  $30 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Hb}$ ) a été retenu pour cette application.

À partir de cette méthode optimisée, la mise en place de l'ID pour les analyses de spéciation élémentaire a été effectuée en utilisant le mode non-spécifique et le mode spécifique. Le développement de la méthode a été réalisé avec l'utilisation du CRM en Hb totale dans de l'hémolysat (JCCRM 912-1 et 2).

Les résultats obtenus par **ID en mode non-spécifique** donnent une erreur relative moyenne de - 12 % sur le CRM JCCRM 912-1. La traçabilité de la méthode est assurée d'une part par l'utilisation d'un étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$ , préalablement caractérisé en abondance isotopique et en fraction massique à travers l'utilisation de l'étalon primaire en Fe, d'autre part par l'utilisation de méthodes dites « primaires » comme la gravimétrie pour toute la préparation des échantillons et l'ID. Les incertitudes relatives obtenues pour cette méthode sont comprises entre 9 et 14 % avec comme contribution majeure, la détermination de la fraction massique de l'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$ .

La mise en place de l'**ID en mode spécifique** a nécessité le travail sur deux points essentiels : la caractérisation de l'étalon commercial d'Hb (H7379) et la synthèse ainsi que la caractérisation de l'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  de l'Hb. Ces deux critères sont nécessaires afin d'assurer la traçabilité des résultats. La

caractérisation de l'étalon d'Hb montre une pureté de  $(90 \pm 2)$  % en prenant en compte la fraction massique en eau et les impuretés protéiques contenues dans l'étalon. De plus, l'utilisation de cet étalon comme étalon secondaire pour l'ID en mode spécifique a nécessité de le caractériser à partir de sa teneur en Fe par la méthode (Fe)-ID-ICPMS avant chaque analyse (développée dans le Chapitre 2). Concernant la synthèse de l'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  d'Hb totale, elle a été effectuée en trois étapes : la synthèse de l'Apo-Hb, la synthèse du groupe hème enrichi en  $^{57}\text{Fe}$  et la reconstitution de la molécule. Trois lots d'étalons marqués d'Hb ont été réalisés. Sa caractérisation met en avant une isotopie en  $^{57}\text{Fe}$  de  $92 \pm 4$  % une absence d'impureté protéique contenant du Fe et une concentration est stable sur une durée d'environ 1 mois.

Lors de la mise en place de l'ID en mode spécifique, une particularité a été mise en évidence : les échantillons et les étalons ne sont pas sous la même forme d'Hb. Les étalons d'Hb (marqué et non marqué) se présente sous la forme de méthémoglobine (MétHb) où le Fe est au degré d'oxydation III ( $\text{Fe}^{3+}$ ) et l'échantillon (CRM JCCRM 912) se présente sous la forme d'oxyhémoglobine ( $\text{HbO}_2$ ) où le Fe est au degré d'oxydation II ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Dans cette étude, la conversion en Cyanméthémoglobine (HiCN) des étalons d'Hb marqué ( $^{57}\text{Fe}$ ) et non marqué ( $^{56}\text{Fe}$ ) ainsi que du CRM présente les résultats les plus concluants en mode spécifique. Cependant, l'erreur relative entre la valeur déterminée et la valeur de référence sur le CRM reste encore très élevée : entre 35 et 39 %.

Des pistes d'amélioration peuvent être envisagées afin de diminuer le biais. D'autres méthodes de conversion peuvent être élaborées comme l'utilisation de l'azoture de sodium afin d'oxyder l'échantillon. Par ailleurs, la conversion effectuée peut ne pas être totale. En effet, il peut y avoir une conversion partielle lors de l'étape de l'oxydation de l'échantillon. Cela pourrait engendrer la présence des deux espèces, MétHb et  $\text{HbO}_2$ , simultanément. Des analyses complémentaires permettant de distinguer les deux degrés d'oxydation, telles que les méthodes électrochimiques, pourraient lever cette interrogation.

La mise en place de l'ID en mode spécifique nécessite d'avoir à notre disposition un étalon marqué le plus spécifique possible or, dans notre étude, une différence entre l'étalon marqué et le CRM a été constatée. Afin d'être le plus juste, il serait nécessaire de synthétiser l'étalon marqué en  $^{57}\text{Fe}$  d'Hb à partir du CRM. Dans ce cas, il n'y aurait pas de différence d'espèce entre l'échantillon et l'étalon marqué.

**Ces travaux ont permis de mettre au point une méthode de référence pour l'analyse du Fe dans du sérum qui permet un raccordement du résultat de mesure au SI. Pour l'Hb, la procédure développée par ID-ICPMS, à travers sa teneur en Fe, est prometteuse, cependant, elle reste limitée aux échantillons où aucune autre espèce ferrique n'est présente. Quant aux méthodes utilisant l'ID avec le couplage HPLC-ICPMS, certaines limitations ont été évoquées au niveau de la justesse ce qui nécessite un travail supplémentaire afin de pouvoir les utiliser pour l'assignation de valeurs de référence.**



# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES



1. JCGM. *International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM) / Vocabulaire international de métrologie – Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM)*. 2012; Available from: <http://www.bipm.org/fr/publications/guides/>.
2. LNE. *Découvrir l'activité métrologie*. Available from: <http://www.lne.fr/fr/metrologie/decouvrir-metrologie.asp>.
3. Direction générale des entreprises. *La métrologie*. Available from: <http://www.entreprises.gouv.fr/metrologie>.
4. La métrologie française. *Les unités de mesure*. Available from: <http://www.metrologie-francaise.fr/fr/si/unites-mesure.asp>.
5. EURACHEM/CITAC, *Traceability in Chemical Measurement. A guide to achieving comparable results in chemical measurement*. 2003. p. 43.
6. O'Connor G. and Dean L., *How do you know your results measure up?* Chemistry International, 2012. **34**(1): p. 4-7.
7. Milton M.J.T. and Marschal A., *Frequently-asked questions about primary methods of measurement in chemical analysis*. Accreditation and Quality Assurance, 2001. **6**(6): p. 270-271.
8. BIPM. *Compte rendu de la 4e réunion du Comité Consultatif pour la Quantité de Matière*. 1999; Available from: <http://www.bipm.org>.
9. Quinn, T.J., *Primary methods of measurement and primary standards*. Metrologia, 1997. **34**: p. 61-65.
10. Richter, W., *Primary methods of measurement in chemical analysis*. Accreditation and Quality Assurance, 1999. **2**(8): p. 354-359.
11. Greenberg R.R., Bode P., and De Nadai Fernandes E.A., *Neutron activation analysis: A primary method of measurement*. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2011. **66**(3-4): p. 193–241.
12. Desenfant M., Priel M., and Rivier C., *Evaluation des incertitudes des résultats d'analyse*. Techniques de l'ingénieur, 2005. **P105**: p. 1-17.
13. European federation of national associations of measurement testing and analytical laboratories, *Measurement uncertainty revisited : Alternative approaches to uncertainty evaluation*. 2007. p. 62.
14. Fisicaro P., et al., *Approaches to uncertainty evaluation based on proficiency testing schemes in chemical measurements*. Accreditation and Quality Assurance, 2008. **13**: p. 361-366.
15. JCGM, *Evaluation des données de mesure - Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure*. 2008, JCGM. p. 121.
16. AFNOR, *Laboratoires de biologie médicale - Exigences concernant la qualité et la compétence - NF EN ISO 15189*. 2012. p. 1-64.
17. Journal officiel de la République française. *Décret n°2016-46 du 26 janvier 2016 relatif à la biologie médicale*. 2016; Available from: <http://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2016/1/26/AFSP1526854D/jo/texte>.
18. BIPM-JCTLM, *Meeting requirements for metrological traceability in laboratory medicine and clinical chemistry*. Mars 2015. p. 4.
19. BIPM-JCTLM. *JCTLM Database : laboratory medicine and in vitro diagnostics*. Available from: <http://www.bipm.org/jctlm/>.
20. ICSH, *Recommendations for the measurements of the serum iron in human blood*. British Journal of Haematology, 1978. **38**: p. 291-294.
21. Reilly, C., *The nutritional trace metals*. 2004: Blackwell publishing. 253 p.
22. IUPAC, *Atomic weights of the elements 2011*. Pure and Applied Chemistry, 2013. **85**(5): p. 1047-1078.
23. Trumbo, P., et al., *Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc*. Journal of the American Dietetic Association, 2001. **101**(3): p. 294-301.

24. IUPAC, *Isotope abundance variations of selected elements*. Pure and Applied Chemistry, 2002. **74**(10).
25. IUPAC, *Isotopic compositions of the elements 2009*. Pure and Applied Chemistry, 2011. **83**(2).
26. Arora, S., Kapoor R.K., *Iron metabolism in humans: an overview*. 2012, INTECH. p. 22 p.
27. Worwood, M., *The laboratory assessment of iron status--an update*. Clinica Chimica Acta, 1997. **259**(1-2): p. 3-23.
28. Johnson-Wimbley T.D. and D.Y. Graham, *Diagnosis and management of iron deficiency anemia in the 21st century*. Therapeutic advances in gastroenterology, 2011. **4**(3): p. 177-184.
29. Abbaspour, N., Hurrell R., Kelishadi R., *Review on iron and its importance for human health*. Journal of Research in Medical Sciences, 2014. **19**(2): p. 164-74.
30. Delmotte, N., et al., *Miniaturized monolithic disks for immunoabsorption of cardiac biomarkers from serum*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **389**(4): p. 1065-74.
31. Munoz M., Garcia-Erce J.A., and Remacha A.F., *Disorders of iron metabolism. Part II: iron deficiency and iron overload*. Journal of Clinical Pathology, 2011. **64**(4): p. 287-96.
32. Walczyk T., *Iron speciation in biomedicine*, in *Handbook of elemental speciation II*, L. John Wiley and Sons, Editor. 2005. p. 218-238.
33. Del Castillo Busto M.E., Montes-Bayon M., and A. Sanz-Medel, *The potential of mass spectrometry to study iron-containing proteins used in clinical diagnosis*. Analytical Chimica Acta, 2009. **634**(1): p. 1-14.
34. Vifor pharma. *The iron metabolism*. 2011; Available from: [www.ironatlas.com/fr.html](http://www.ironatlas.com/fr.html).
35. Saito, H., *Metabolism of Iron Stores*. Nagoya Journal of Medical Science, 2014. **76**(3-4): p. 235-254.
36. Shetty P., *Nutrition, immunity and infection*. 2010: CABI. 206 p.
37. ANSES. *Table de composition nutritionnelle Ciqual*. 2013; Available from: <https://pro.anses.fr/TableCIQUAL/index.htm>.
38. Nicolas G., *L'hepcidine, le chef d'orchestre de l'homéostasie du fer*. Diabète et obésité, 2009. **4**(29): p. 94-98.
39. Hininger-Favier I. and Herberg S., *Besoins, apports et disponibilités du fer*. Bulletin de l'académie nationale de médecine, 2005. **189**(8): p. 1623-1633.
40. Averill A.B. and Eldredge P., *Essential elements for life*, in *Principles of general chemistry*. 2012, Creative commons. p. 3023.
41. Gellein K., *High resolution inductively coupled plasma mass spectrometry : some applications in biomedicine*, in *Department of chemistry 2008*, Norwegian university of science and technology - Thèse. p. 83.
42. Association des enseignants de biochimie et biologie moléculaire des facultés de pharmacie (AE2BM), *Biochimie médicale : Marqueurs actuels et perspectives*. 2011: Médecine Sciences Publications. p. 607.
43. Cohen-Solal, A., et al., *Diagnosis and treatment of iron deficiency in patients with heart failure: expert position paper from French cardiologists*. Archives of Cardiovascular Diseases, 2014. **107**(10): p. 563-71.
44. Toxqui L. and Vaquero M.P., *Chronic iron deficiency as an emerging risk factor for osteoporosis: a hypothesis*. Nutrients, 2015. **7**(4): p. 2324-2344.
45. Brigham E.P., et al., *Iron status is associated with asthma and lung function in US women*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. 1-12.
46. Andrews, N.C., *Disorders of iron metabolism*. The New England Journal of Medicine, 1999. **341**(26): p. 1986-95.
47. WHO, *Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005*. 2008. p. 51.
48. Geissler C. and Singh M., *Iron, meat and health*. Nutrients, 2011. **3**(3): p. 283-316.
49. Alton I., *Iron deficiency anemia*. Guidelines for adolescent nutrition services, 2005: p. 101-108.

50. Pasricha S.R.S., et al., *Diagnosis and management of iron deficiency anaemia: a clinical update*. MJA, 2010. **193**(9): p. 525-532.
51. Kanwar P. and Kowdley K.V., *Metal storage disorders: Wilson disease and hemochromatosis*. Medical Clinics of North America, 2014. **98**(1): p. 87-102.
52. Deugnier Y., *Les surcharges hépatiques en fer chez l'homme*. Bulletin de l'académie nationale de médecine, 2005. **189**(8): p. 1665-1677.
53. Leitman S.F., *Hemochromatosis: the new blood donor*. The Education Program of the American Society of Hematology, 2013. **2013**: p. 645-50.
54. Oliveira F., Rocha S., and Fernandes R., *Iron metabolism: from health to disease*. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2014. **28**(3): p. 210-218.
55. Piperno A., *Classification and diagnosis of iron overload*. Haematologia, 1998. **83**: p. 447-455.
56. Wajcman H., *Hémoglobines : structure et fonction*. EMC-Hématologie, 2005: p. 145-157.
57. Bain B.J., et al., *Variant haemoglobins: a guide to identification*. 2010: John Wiley and Sons, Ltd. p. 254.
58. ICSH, *Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard EP 6/2: 1977) and specifications for international haemoglobinocyanide reference preparation (ICSH standard EP 6/3: 1977)*. Journal of Clinical Pathology, 1978. **31**(2): p. 139-43.
59. UniProt. *Compute pI/Mw - HBB\_HUMAN - P68871*. 2002; Available from: [http://web.expasy.org/cgi-bin/compute\\_pi/pi\\_tool1?P68871@2-147@average](http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool1?P68871@2-147@average)
60. *Rouge sang*. 2010; Available from: <http://svtcolin.blogspot.fr/2010/12/rouge-sang.html>.
61. Blankenship P. *Hemoglobin structure and function*. 2015; Available from: <http://slideplayer.com/slide/4463168/>.
62. Casiday R. and Frey R. *Hemoglobin and the heme group : metal complexes in the blood for oxygen transport*. 2013; Available from: [http://www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials/CourseTutorials/Tutorials/Hemoglobin/151\\_T3\\_hemoglobin.htm](http://www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials/CourseTutorials/Tutorials/Hemoglobin/151_T3_hemoglobin.htm).
63. Wright, R.O., W.J. Lewander, and A.D. Woolf, *Methemoglobinemia: etiology, pharmacology, and clinical management*. Ann Emerg Med, 1999. **34**(5): p. 646-56.
64. Kunkel H.G. and Wallenius G., *New hemoglobin in normal adult blood*. Science, 1955. **122**(3163): p. 288.
65. Lehmann H., *Haemoglobin and its abnormalities*. Practitioner, 1957. **178**(1064): p. 198-214.
66. Allen DW., Schoeder WA., and Balog J., *Observations on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal hemoglobin: a study of the effect of crystallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content*. Journal of the American Chemical Society, 1958. **80**: p. 1628-1634.
67. Clegg M.D. and Schroeder W.A., *A chromatographic study of the minor components of normal adult human hemoglobin including a comparison of hemoglobin from normal and phenylketonuric individuals*. Journal of the American Chemical Society, 1959. **81**(22): p. 6065-6069.
68. Huisman THJ. and Horton BF., *Studies of the heterogeneity of hemoglobin VII: chromatographic and electrophoretic investigations of minor hemoglobin fractions present in normal and in vitro modified red blood cell hemolysates*. Journal of chromatography A, 1965. **18**: p. 116-123.
69. Gillery P. and Vassault A., *Hémoglobines glyquées: structure, métabolisme, nomenclature*. Cahier de formation, 1997. **8**: p. 11-14.
70. Cao J.T., et al., *Sensitive determination of hemoglobin in human blood and serum by flow injection coupled with chemiluminescence detection*. Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi, 2014. **34**(1): p. 241-245.
71. Wada Y., *Advanced analytical methods for hemoglobin variants*. Journal of chromatography B, 2002. **781**(2002): p. 291-301.

72. Marengo-Rowe A.J., *The thalassemias and related disorders*. Baylor university medical center proceedings, 2007. **20**(1): p. 27-31.
73. Modell B., D.M., *Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators*. Bulletin of the WHO, 2008. **86**: p. 480-487.
74. Park Talare K., *Foundations in microbiology - Basic principles*. Vol. Sixth Edition. 2007. p. 540.
75. Taylor A., *Atomic spectrometry and the clinical chemistry of trace elements*. Journal of analytical atomic spectrometry, 2006. **21**: p. 381-383.
76. Tsalev D.L., *Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice*. Vol. III. 1995: CRC Press. p. 348.
77. AMELI. *Biolam 2015 - Régime général - Champ complet*. 2016; Available from: <http://www.ameli.fr/l-assurance-maladie/statistiques-et-publications/donnees-statistiques/actes-de-biologie-medicale/biolam-2013-2015.php>.
78. ICSH, *Proposed recommendations for measurement of serum iron in human blood*. British Journal of Haematology, 1971. **20**: p. 451-453.
79. GE Healthcare Life Sciences, *Spectrophotometry - Handbook*. 2012: Royaume Uni. p. 30.
80. Marczenko Z. and Balcerzak M., *Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis*. 2000. p. 528.
81. ICSH, *Revised recommendations for the measurements of the serum iron in human blood*. British Journal of Haematology, 1990. **75**(4): p. 615-6.
82. Rand R.N., *Practical spectrophotometric standards*. Clinical Chemistry, 1969. **15**(9): p. 839-863.
83. Ding Y.S., et al., *Determination of total iron binding capacity of serum by capillary electrophoresis*. Chromatographia, 1999. **49**: p. 71-74.
84. Mohsen U. A., Elaiash K. A., and I. M., *Determination of iron in blood serum by spectrophotometric and atomic absorption methods as a comparative study*. Cukurova medical journal, 2013. **38**(3): p. 358-364.
85. Tietz N.W., Rinker A.D., and Morrison S.R., *When is a serum iron really a serum iron? The status of serum iron measurements*. Clinical Chemistry, 1994. **40**(4): p. 546-551.
86. Haute Autorité de Santé, *Choix des examens du métabolisme du fer en cas de suspicion de carence en fer*. 2011. p. 82.
87. Jian-Xin Q., *Determination of Cu, Zn, Fe, Ca, Mg, Na ad K in serum by flame atomic absorption spectroscopy*. Application note - Agilent technologies, 2010: p. 1-4.
88. Donnici C.L., et al., *Fast Determination of Iron and Zinc in Hair and Human Serum Samples After Alkaline Solubilization by GF AAS*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2016. **27**(1): p. 119-126.
89. PerkinElmer, *Analytical methods for atomic absorption spectroscopy*. 1996. p. 310.
90. De Benzo Z.A., et al., *Determination of serum iron by aas: deproteinization versus direct analysis*. Clinica Chimica Acta, 1991. **197**(2): p. 141-148.
91. Najim S.S., *Determination of iron in human serum samples of Thalassaemia patients by flame atomic absorption*. Journal of Basrah Researches, 2014. **40**(1): p. 102-109.
92. Lee K.T. and Jacob E., *Determination of serum iron and zinc by atomic absorption spectroscopy*. Mikrochimica Acta, 1974: p. 65-72.
93. Sunderman F.W., *Atomic absorption spectrometry of trace metals in clinical pathology*. Human Pathology, 1973. **4**(4): p. 549-582.
94. Labidi N.S., *Spectroscopie atomique*. Institut des Sciences et de la Technologie. p. 108-146.
95. Nixon D.E., et al., *Routine measurement of calcium, magnesium, copper, zinc, and iron in urine and serum by inductively coupled plasma emission spectroscopy*. Clinical Chemistry, 1986. **32**(9): p. 1660-1665.
96. Labat L., et al., *Dosage des métaux par ICP-MS dans différents milieux biologiques*. Annales de Toxicologie Analytique, 2003. **XV**(4): p. 281-286.

97. Moens L., et al., *New high-resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry technology applied for the determination of V, Fe, Cu, Zn and Ag in human Serum*. Journal of analytical atomic spectrometry, 1994. **9**: p. 1074-1078.
98. Riondato J., et al., *Determination of trace and ultra trace elements in human serum with a Double Focusing Magnetic Sector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer* Journal of analytical atomic spectrometry, 1997. **12**: p. 933-937.
99. Sariego Muniz C., et al., *Multi-elemental trace analysis of human serum by double-focusing ICP-MS*. Journal of analytical atomic spectrometry, 1998. **14**: p. 193-198.
100. Vanhoe H., et al., *Determination of iron, cobalt, copper, zinc, rubidium, molybdenum, and cesium in human serum by inductively coupled plasma mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 1989. **61**(17): p. 1851-1857.
101. Sariego Muniz C., et al., *Accurate determination of iron, copper and zinc in human serum by isotope dilution analysis using double-focusing ICP-MS*. Journal of analytical atomic spectrometry, 1999. **14**: p. 1505-1510.
102. Li G., et al., *Measurement of the trace elements Cu, Zn, Fe and Mg and the ultratrace elements Cd, Co, Mn and Pb in limited quantity human plasma and serum samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry*. American Journal of Analytical Chemistry, 2012. **3**: p. 646-650.
103. Harrington J.M., et al., *Analysis of human serum and whole blood for mineral content by ICPMS and ICPOES: development of a mineralomics method*. Biological Trace Element Research, 2014. **160**(1): p. 132-142.
104. Nuttall K.L., Gordon W.H., and Ash K.O., *Inductively coupled plasma mass spectrometry for trace element analysis in the clinical laboratory*. Annals of Clinical and Laboratory Science, 1995. **25**(3): p. 264-271.
105. Jens Laboratory. *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometer*. Available from: <http://eecelabs.seas.wustl.edu/ICP-MS.aspx>.
106. Favre G., *Etude des réactions "ions-molécules" en phase gazeuse dans les dispositifs de collision-réaction : Application à la résolution directe des interférences spectroscopiques en ICP-MS*, in *Chimie*. 2008, Université d'Evry Val d'Essonne - Thèse. p. 159.
107. Thermo Fisher Scientific, *ELEMENT 2 / ELEMENT XR - Hardware Manual*. 150 p.
108. Volg J., et al., *High accuracy measurements of Fe isotopes using hexapole collision cell MC-ICP-MS and isotope dilution for certification of reference materials*. Journal of analytical atomic spectrometry, 2003. **18**: p. 1125-1132.
109. Vanhaecke F., et al., *Capabilities of inductively coupled plasma spectrometry for the measurement of Fe isotope ratios*. Journal of analytical atomic spectrometry, 2002. **17**: p. 933-943.
110. Darrouzès J. and Mccurdy E., *Analyse multiélémentaire avec un spectromètre de masse (ICP-MS) à cellule de collision/réaction en utilisant l'hélium comme gaz de collision*. Spectra analyse, 2006. **250**: p. 40-46.
111. Paucot H., *Les dispositifs de collision/réaction en ICPMS : revue descriptive et modes de fonctionnement*. Spectra analyse, 2006. **252**: p. 23-27.
112. Stumpf C. and Labarraque G., *La métrologie analytique inorganique par spectrométrie de masse ICP/MS; Seconde phase de développement*. Revue française de métrologie, 2005. **1**: p. 7-17.
113. Yip Y-C. and Sham W-C., *Applications of collision/reaction cell technology in isotope dilution mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 2007. **26**(7): p. 727-743.
114. Hoppler M., Zeder C., and Walczyk T., *Quantification of ferritin-bound iron in plant samples by isotope tagging and species-specific isotope dilution mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(17): p. 7368-7372.
115. Brauckmann C., et al., *Preparation and characterisation of an <sup>57</sup>Fe enriched haemoglobin spike material for species-specific isotope dilution mass spectrometry*. Journal of analytical atomic spectrometry, 2016. **31**: p. 1846-1857.

116. Del Castillo Busto E., et al., *Simultaneous determination of glycosylated haemoglobin, a long term biomarker of diabetes mellitus, and total haemoglobin by isotope dilution and HPLC-ICP-MS*. Journal of analytical atomic spectrometry, 2008. **23**: p. 758-764.
117. Del Castillo Busto E., et al., *Quantitative targeted biomarker assay for glycosylated haemoglobin by multidimensional LC using mass spectrometric detection*. Journal of Proteomics, 2011. **74**(1): p. 35-43.
118. Sariego Muniz C., et al., *Speciation of essential elements in human serum using anion-exchange chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis with double focusing ICP-MS*. Journal of analytical atomic spectrometry, 2001. **16**: p. 587-592.
119. Feng L., et al., *Simultaneous quantification of proteins in human serum via sulfur and iron using HPLC coupled to post-column isotope dilution mass spectrometry*. Analytical Methods, 2014. **6**: p. 7655-7662.
120. Hotz K., Kräyebuehl P.A., and Walczyk T., *Mobilization of storage iron is reflected in the iron isotopic composition of blood in humans*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2012. **17**(2): p. 301-309.
121. Costas-Rodríguez M., Delanghe J., and Vanhaecke F., *High-precision isotopic analysis of essential mineral elements in biomedicine : natural isotope ratio variations as potential diagnostic and/or prognostic markers*. Analytical Chemistry, 2016. **76**: p. 182-193.
122. Kräyebuehl P.A., et al., *Hereditary hemochromatosis is reflected in the iron isotope composition of blood*. Blood, 2005. **105**(10): p. 3812-3816.
123. Stenberg A., et al., *Measurement of iron and zinc isotopes in human whole blood: preliminary application to the study of HFE genotypes*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2005. **19**(1): p. 55-60.
124. Van Heghe L., et al., *The relationship between the iron isotopic composition of human whole blood and iron status parameters*. Metallomics, 2013. **5**(11): p. 1503-1509.
125. Christopher S.J., et al., *Improved calibration strategy for measurement of trace elements in biological and clinical whole blood reference materials via collision-cell inductively coupled plasma mass spectrometry* Journal of analytical atomic spectrometry, 2005. **20**: p. 1035-1043.
126. Giné M.F. and Pacher A.P., *Online Isotope Dilution and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry : from Elemental to Species Quantification*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2010. **21**(4): p. 575-589.
127. Garcia Alonso J.I. and Rodriguez-Gonzalez P., *Isotope Dilution Mass Spectrometry*. 2013, Royaume Uni: Royal Society of Chemistry. p. 453.
128. Hinojosa Reyes L., et al., *Determination of selenium in biological materials by isotope dilution analysis with an octapole reaction system ICP-MS*. Journal of analytical atomic spectrometry, 2003. **18**: p. 11-16.
129. Rodriguez-Gonzalez P., et al., *Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review*. Spectrochimica Acta Part B, 2005. **60**: p. 151-207.
130. Simpson L.A., et al., *A comparison of double-focusing sector field ICP-MS, ICP-OES and octapole collision cell ICP-MS for the high-accuracy determination of calcium in human serum*. Talanta, 2005. **65**(4): p. 900-906.
131. Yu L.L., et al., *Fast and accurate determination of K, Ca, and Mg in human serum by sector field ICP-MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. **405**: p. 8761-8768.
132. Murphy K.E., et al., *The accurate determination of potassium and calcium using isotope dilution inductively coupled "cold" plasma mass spectrometry*. Journal of analytical atomic spectrometry, 2002. **17**: p. 469-477.
133. Euriso-top. *Isotopic metals*. Available from: [http://www.euriso-top.com/isotopic\\_gases\\_and\\_metals/isotopic\\_metals](http://www.euriso-top.com/isotopic_gases_and_metals/isotopic_metals).
134. Sturup S., Hansen M., and Molgaard C., *Measurements of  $^{44}\text{Ca} : ^{43}\text{Ca}$  and  $^{42}\text{Ca} : ^{43}\text{Ca}$  Isotopic Ratios in urine using High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Journal of analytical atomic spectrometry, 1997. **12**: p. 919-923.

135. Van Lerberghe W., et al., *Haemoglobin measurement: the reliability of some simple techniques for use in a primary health care setting*. Bulletin of the World Health Organization, 1983. **61**(6): p. 957-965.
136. Delory G.E., *The preparation and analysis for iron of haemin and haemoglobin*. Analyst, 1942. **68**: p. 5-8.
137. Srivastava T., et al., *Methods for Hemoglobin Estimation: A Review of "What Works"*. Journal of Hematology and Transfusion, 2014. **2**(3): p. 1028-1035.
138. Elwood P.C. and Jacobs A., *Haemoglobin estimation: a comparison of different techniques*. British Medical Journal, 1966. **1**(5478): p. 20-24.
139. Van Slyke D.D. and Hiller A., *Gasometric determination of hemoglobin by the carbon monoxide capacity method*. Journal of Biological Chemistry, 1928. **78**: p. 807-819.
140. Sawant R.B., Bharucha Z.S., and Rajadhyaksha S.B., *Evaluation of hemoglobin of blood donors deferred by the copper sulphate method for hemoglobin estimation*. Transfusion and Apheresis Science, 2007. **36**(2): p. 143-148.
141. Drabkin D.L. and Austin H.J., *Spectrophotometric studies: I. Spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood*. The Journal of Biological Chemistry, 1932. **98**: p. 719-733.
142. Bull B.S, et al., *Reference and selected procedures for the quantitative determination of hemoglobin in blood; Approved standard*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000. **20**(28): p. 10.
143. Davis B.H., Jungerius B., and ICSH, *International Council for Standardization in Haematology technical report 1-2009: new reference material for haemoglobinocyanide for use in standardization of blood haemoglobin measurements*. International Journal of Laboratory Hematology, 2010. **32**(2): p. 139-141.
144. Sanz-Medel A., *Heteroatom(isotope)-tagged proteomics via ICP-MS: screening and quantification of proteins and their post-translational modifications*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**(3): p. 885-894.
145. Karsan A., et al., *An evaluation of hemoglobin determination using sodium lauryl sulfate*. American Journal of Clinical Pathology, 1993. **100**(2): p. 123-126.
146. Oshiro I., Takenaka T., and Maeda J., *New method for hemoglobin determination by using sodium lauryl sulfate (SLS)*. Clinical Biochemistry, 1982. **15**(2): p. 83-88.
147. Witt K., et al., *Establishing traceability of photometric absorbance values for accurate measurements of the haemoglobin concentration in blood*. Metrologia, 2013. **50**: p. 539-548.
148. Zander R., Lang W., and Wolf H.U., *Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemoglobin method. I. Description of the method*. Clinica Chimica Acta, 1984. **136**(1): p. 83-93.
149. Vanzetti G., *An azide-methemoglobin method for hemoglobin determination in blood*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1966. **67**(1): p. 116-126.
150. Von Schenck H., Falkensson M., and Lundberg B., *Evaluation of "HemoCue," a new device for determining hemoglobin*. Clinical Chemistry, 1986. **32**(3): p. 526-529.
151. Ruckman J.S., *A comparative study of total hemoglobin measurement technology: noninvasive pulse cooximetry and conventional methods*, in Science. 2011, University of Connecticut. p. 75.
152. Shah N., Osea E.A., and Martinez G.J., *Accuracy of noninvasive hemoglobin and invasive point-of-care hemoglobin testing compared with a laboratory analyzer*. International Journal of Laboratory Hematology, 2014. **36**(1): p. 56-61.
153. Pauling L., et al., *Sickle cell anemia, a molecular disease*. Science, 1949. **110**(2865): p. 543-548.
154. Old, J., et al., *Haemoglobin pattern analysis*, in *Prevention of Thalassaemias and Other Haemoglobin Disorders: Volume 2: Laboratory Protocols*. 2012: Nicosia, Cyprus. p. 184.
155. Frantzen F., *Chromatographic and electrophoretic methods for modified hemoglobins*. Journal of chromatography B, 1997. **699**: p. 269-286.

156. Ou C.N. and Rognerud C.L., *Rapid analysis of hemoglobin variants by cation-exchange HPLC*. Clinical Chemistry, 1993. **39**(5): p. 820-824.
157. Papadea C. and Cate J.C., *Identification and quantification of hemoglobins A, F, S, and C by automated chromatography*. Clinical Chemistry, 1996. **42**(1): p. 57-63.
158. Montes-Bayon M., DeNicola K., and Caruso J.A., *Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2003. **1000**(1-2): p. 457-476.
159. Manjula B.N. and Acharya S.A., *Purification and molecular analysis of hemoglobin by high-performance liquid chromatography*. Methods in Molecular Medicine, 2003. **82**: p. 31-47.
160. Wajcman, H., *Analysis of Hemoglobins and Globin Chains by High-Performance Liquid Chromatography*, in *Hemoglobin Disorders: Molecular Methods and Protocols*. 2003, Humana Press Inc. p. 21-29.
161. GE Healthcare Life Sciences, *Hemoglobin A1c measurement with Mono S method*. Application note - Ion exchange chromatography: p. 1-4.
162. Antunes M.V., et al., *Standardization of method for determining glycosylated hemoglobin (Hb A1c) by cation exchange high performance liquid chromatography*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. **45**(4): p. 651-658.
163. Philcox J.C., Haywood M.R., and Rofe A.M., *Hemoglobin A1c by HPLC with the Pharmacia Mono S HR 5/N cation-exchange column: influence of sample protein load on optimal chromatographic conditions*. Clinical Chemistry, 1992. **38**(8 Pt 1): p. 1488-1490.
164. Del Castillo Busto E.M., et al., *Simultaneous determination of glycated haemoglobin, a long term biomarker of diabetes mellitus, and total haemoglobin by isotope dilution and HPLC-ICP-MS*. Journal of analytical atomic spectrometry, 2008. **23**: p. 758-764.
165. Gupta S.P. and Hanash S.M., *Separation of hemoglobin types by cation-exchange high-performance liquid chromatography*. Analytical Biochemistry, 1983. **134**(1): p. 117-121.
166. Huisman, T.H., *Separation of hemoglobins and hemoglobin chains by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography, 1987. **418**: p. 277-304.
167. Sun G. and Palmer A.F., *Preparation of ultrapure bovine and human hemoglobin by anion exchange chromatography*. Journal of Chromatography B, 2008. **867**: p. 1-7.
168. Simoni J., et al., *Evaluation of anion-exchange liquid chromatography for purification of hemoglobin from peptides and other proteins*. Analytica Chimica Acta, 1991. **249**: p. 169-183.
169. Wan J.H., et al., *Rapid determination of human globin chains using reversed-phase high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2012. **901**: p. 53-58.
170. Mudarra Rubio, A., et al., *Sample preparation strategies for quantitative analysis of catalase in red blood cells by elemental mass spectrometry*. Metallomics, 2010. **2**(9): p. 638-645.
171. Scheller F.W., et al., *Thirty years of haemoglobin electrochemistry*. Advances in Colloid and Interface Science, 2005. **116**(1-3): p. 111-120.
172. Kobos R.K., et al., *Electrochemical determination of hemoglobin, hematocrit, and hemolysis*. Clinical Chemistry, 1987. **33**(1): p. 153-158.
173. Communauté française de spectrométrie de masse. *Electrospray*. 2016; Available from: <http://masse-spec.fr/electrospray>.
174. Kleinert P., et al., *Mass spectrometry: a tool for enhanced detection of hemoglobin variants*. Clinical Chemistry, 2008. **54**(1): p. 69-76.
175. Falick A.M., et al., *Tandem mass spectrometry in the clinical analysis of variant hemoglobins*. Rapid Commun Mass Spectrom, 1990. **4**(10): p. 396-400.
176. Peng J., et al., *Characterization of intact hemoglobin and oxaliplatin interaction by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry*. Clinical Chemistry, 2005. **51**(12): p. 2274-2281.
177. Ho C.S., et al., *Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications*. The Clinical Biochemist Reviews, 2003. **24**(1): p. 3-12.
178. Wada Y., et al., *Structural analysis of human hemoglobin variants with field desorption mass spectrometry*. Biochimica et Biophysica Acta, 1981. **667**(2): p. 233-241.

179. Haynes C.A., et al., *HPLC-ESI-MS/MS analysis of hemoglobin peptides in tryptic digests of dried-blood spot extracts detects HbS, HbC, HbD, HbE, HbO-Arab, and HbG-Philadelphia mutations*. *Clinica Chimica Acta*, 2013. **424**: p. 191-200.
180. Theberge R., et al., *MALDI-ISD Mass Spectrometry Analysis of Hemoglobin Variants: a Top-Down Approach to the Characterization of Hemoglobinopathies*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2015. **26**(8): p. 1299-1310.
181. Hogeback J., et al., *Investigating the adduct formation of organic mercury species with carbonic anhydrase and hemoglobin from human red blood cell hemolysate by means of LC/ESI-TOF-MS and LC/ICP-MS*. *Metallomics*, 2016. **8**(1): p. 101-107.
182. Zayas Z.P., et al., *Hemoglobin as a major binding protein for methylmercury in white-sided dolphin liver*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014. **406**(4): p. 1121-1129.
183. Templeton D.M., et al., *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000)*. *Pure and Applied Chemistry*, 2000. **72**(8): p. 1453-1470.
184. Bettmer J., et al., *The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis*. *Journal of Proteomics*, 2009. **72**(6): p. 989-1005.
185. Rodriguez-Gonzalez P. and Garcia-Alonso J.I., *Recent advances in isotope dilution analysis for elemental speciation*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2010. **25**: p. 239-259.
186. Harrington C.F., et al., *Potential for using isotopically altered metalloproteins in species-specific isotope dilution analysis of proteins by HPLC coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2005. **77**(13): p. 4034-4041.
187. Hann S., et al., *Studying metal integration in native and recombinant copper proteins by hyphenated ICP-DRC-MS and ESI-TOF-MS capabilities and limitations of the complementary techniques*. *Journal of analytical atomic spectrometry*, 2006. **21**: p. 1224-1231.
188. Deitrich C.L., et al., *Chemical preparation of an isotopically enriched superoxide dismutase and its characterization as a standard for species-specific isotope dilution analysis*. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(21): p. 8381-8390.
189. Deitrich C.L., et al., *Absolute quantification of superoxide dismutase (SOD) using species-specific isotope dilution analysis*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010. **397**(8): p. 3515-3524.
190. Del Castillo Busto E.M., M. Montes-Bayon, and A. Sanz-Medel, *Accurate determination of human serum transferrin isoforms: Exploring metal-specific isotope dilution analysis as a quantitative proteomic tool*. *Analytical Chemistry*, 2006. **78**(24): p. 8218-8226.
191. Ren Y. and Walczyk T., *Quantification of ferritin bound iron in human serum using species-specific isotope dilution mass spectrometry*. *Metallomics*, 2014. **6**(9): p. 1709-1717.
192. Swart C., *HTL05 Metallomics - Metrology for metalloproteins*. 2012, EMRP. p. 61.
193. ANSM. *Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale - Décembre 2012*. 2014; Available from: [http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/de265b4ea27e79bc6b09c8a926e8b479.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/de265b4ea27e79bc6b09c8a926e8b479.pdf).
194. Vanhaecke F., et al., *Dependence of detector dead time on analyte mass number in inductively coupled plasma mass spectrometry*. *Journal of analytical atomic spectrometry*, 1998. **13**: p. 567-571.
195. Watters R.L., et al., *Protocol for isotope dilution using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of inorganic elements*. *Metrologia*, 1997. **34**: p. 87-96.
196. AFNOR, *Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons interlaboratoires - NF EN ISO 13528*. 2005. p. 74.
197. Infante H.G., *Final report for CCQM-K107 : total elements and selenomethionine in human serum*. *Metrologia*, 2016. **53**(Technical Supplement): p. 57.

198. Frank C., et al., *Comparison of Potential Higher Order Reference Methods for Total Haemoglobin Quantification – An Interlaboratory Study*. Analytical and Bioanalytical Chemistry - En cours de soumission, 2016.
199. Zijlstra W. G. and Van Kampen E., *Standardization of hemoglobinometry. I. The extinction coefficient of hemoglobinocyanide*. Clinica Chimica Acta, 1960. **5**: p. 719-726.
200. Wolf H.U., Link H., and Lang W., *Preparation, purification and characterization of chlorohaemin*. Biological Chemistry, 1992. **373**(6): p. 305-313.
201. Lazareva E.N., Tuchin V.V., and Meglinski I., *Measurements of absorbance of hemoglobin solutions incubated with glucose*. Proceedings of SPIE, 2008. **6791**: p. 1-7.
202. Moesch C., *Utilisation de l'ICP-MS en biologie clinique*. Annales de Toxicologie Analytique, 2007. **XIX**(1): p. 11-21.
203. Konishi T., Kamada M., and Nakamura H., *Evaluation of ammonium acetate as a volatile buffer for high-performance hydrophobic-interaction chromatography*. Journal of Chromatography, 1990. **515**: p. 279-283.
204. Boisseau J. and Jouan P., *[Separation of oligopeptides and amino acids by chromatography on the ion-exchange resin, Chelex X-100]*. Journal of Chromatography, 1971. **54**(2): p. 231-237.
205. Bio-Rad, *Sample preparation - A guide to methods and applications*. p. 82.
206. Shrivastava A. and Gupta V.B., *Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods*. Chronicles of young scientists, 2011. **2**(1): p. 21-25.
207. UniProt. UniProtKB - P00915 (CAH1 HUMAN). 2002; Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P00915?sort=score>.
208. Moini M., Demars S.M., and Huang H., *Analysis of carbonic anhydrase in human red Blood cells using capillary electrophoresis/ electrospray ionization-mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(15): p. 3772-3776.
209. UniProt. UniProtKB - P04040 - CATA-Human. 2002; Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P04040?sort=score>.
210. Goth L., et al., *Blood Catalase Activity in Gestational Diabetes Is Decreased but Not Associated with Pregnancy Complications*. Clinical Chemistry, 2005. **51**(12): p. 2401-2404.
211. Vitai M. and Goth L., *Reference ranges of normal blood catalase activity and levels in familial hypocatalasemia in Hungary*. Clinica Chimica Acta, 1997. **261**(1): p. 35-42.
212. Grebe, M., et al., *Absolute quantification of transferrin in blood samples of harbour seals using HPLC-ICP-MS*. Metallomics, 2011. **3**(2): p. 176-85.
213. UniProt. HBA\_HUMAN - P69905. 2002; Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P69905>.
214. Winterhalter K.H. and Huehns E.R., *Preparation, properties, and specific Recombination of  $\alpha\beta$ -Globin Subunits*. Journal of Biological Chemistry, 1964. **239**: p. 3699-3705.
215. Marshall A.G., Lee K.M., and Martin P.W., *Motional freedom of the central metal atom in apohemoglobin reconstituted with  $^{111}\text{In}$ : protoporphyrin IX. Time-differential perturbed gamma-ray angular correlations*. Journal of Chemical Physics, 1983. **78**(3): p. 1528-1532.
216. Rossi Fanelli A., Antonini E, and Caputo A., *Studies on the structure of hemoglobin : Physicochemical properties of human globin*. Biochimica and biophysica acta, 1958. **30**: p. 608-615.
217. Acharya S.A. and Srinivasulu S., *Semisynthesis of hemoglobin*. Methods in Molecular Medicine, 2003. **82**: p. 177-193.
218. Lee K. M. and Marshall A.G., *Synthesis of indium-111 mesoporphyrin IX*. Journal of labelled compounds and radiopharmaceuticals, 1981. **18**(3): p. 353-360.
219. Castro C.E., Wade R.S., and Belser N.O., *Conversion of oxyhemoglobin to methemoglobin by organic and inorganic reductants*. Biochemistry, 1978. **17**(2): p. 225-231.
220. Kim-Shapiro D.B., et al., *The reaction between nitrite and hemoglobin: the role of nitrite in hemoglobin-mediated hypoxic vasodilation*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2005. **99**(1): p. 237-246.

221. Bellik B., et al., *A propos d'un cas de méthémoglobinémie grave suite à une intoxication volontaire par une teinture de chaussures*. Annales de Toxicologie Analytique, 2001. **XIII**(2): p. 88-93.
222. Cannon DJ., *Methemoglobin*. Therapeutic Drug Monitoring, 1991. **13**: p. 3-4.



# ANNEXES



**Annexe 1 : Article sur le développement d'une méthode primaire pour la détermination  
du fer total dans du sérum**

# Développement d'une méthode primaire pour la détermination du fer total dans du sérum

## *Development of a primary method for the determination of iron in serum*

Marie PALOS<sup>1,2</sup>, Maria Estela DEL CASTILLO BUSTO<sup>1</sup>, Jean-Marc HATTCHOUEL<sup>3</sup>, Florence PANNIER<sup>2</sup>, Paola FISICARO<sup>1</sup> et Sophie VASLIN-REIMANN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE), 1 rue Gaston Boissier, 75724 Paris Cedex 15, France, marie.palos@lne.fr, Paola.Fisicaro@lne.fr.

<sup>2</sup> Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (LCABIE), IPREM, Université de Pau et des Pays de l'Adour CNRS/UMR 5254, Hélioparc, 2 avenue du Président Angot, 64053 Pau Cedex 09, France.

<sup>3</sup> Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM), Direction des dispositifs médicaux de diagnostic et des plateaux techniques, 143/147 Bd Anatole France, 93285 Saint Denis Cedex, France.

### Résumé

Ce travail présente le développement d'une méthode de référence pour le dosage du fer dans du sérum par ICP-MS. Afin d'assurer la traçabilité métrologique des résultats, la dilution isotopique associée à l'ICP-MS (DI-ICP-MS) a été mise en place. De plus, cette méthode a l'intérêt d'être une méthode primaire. La validation de la méthode a été réalisée par l'utilisation d'un matériau de référence certifié (SRM 1598a) et la participation à une comparaison internationale entre laboratoires nationaux de métrologie (BIPM-CCQM K107). La méthode validée est maintenant utilisable par les laboratoires d'analyse biomédicale pour évaluer leurs capacités de mesure ou par ceux qui mènent des actions d'assurance qualité ou de contrôle qualité. En effet, cette méthode DI-ICP-MS peut être utilisée pour certifier des matériaux de référence ou pour attribuer des valeurs de référence aux échantillons utilisés dans le cadre d'essais d'aptitude. La faisabilité a été testée sur deux échantillons inconnus, le BCR<sup>®</sup>-637 de l'IRMM et l'échantillon B17 de l'ANSM (matériau distribué au cours d'un programme de contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale).

**MOTS CLÉS** : TRACABILITÉ MÉTROLOGIQUE, DILUTION ISOTOPIQUE, FER, SÉRUM, ICP-MS, MÉTHODE PRIMAIRE, ANALYSE BIOMÉDICALE.

### Abstract

*This work presents the development of a reference method by ICP-MS for the determination of iron in serum. To ensure the metrological traceability of the results, isotope dilution associated with ICP-MS*

*(ID-ICP-MS) has been applied, which has the potential to be a primary measurement procedure. Method validation has been demonstrated through the use of a certified reference material (SRM 1598a) and the participation in an international comparison between National Metrology Institutes (BIPM-CCQM K107). The validated method is now available to support clinical laboratories in the evaluation of their measurement capabilities and for quality assurance and quality control programmes. In fact, this ID-ICP-MS method can be used to certify reference materials or to assign reference values to samples used in proficiency testing schemes. The feasibility has been tested on two unknown samples, i.e. BCR<sup>®</sup>-637, IRMM sample and an ANSM B17 sample (a material distributed during a National Quality Control programme).*

**KEY WORDS**: METROLOGICAL TRACEABILITY, ISOTOPE DILUTION, IRON, SERUM, ICP-MS, PRIMARY MEASUREMENT PROCEDURE, BIOMEDICAL ANALYSIS.

### 1. Contexte de l'étude

Le fer est un élément essentiel pour les organismes vivants qui l'utilisent pour la synthèse de protéines responsables du transport de l'oxygène (hémoglobine Hb, myoglobine Mb) ainsi que pour la formation des enzymes contenant du fer. Chez l'être humain, il existe principalement sous des formes complexes liées à des protéines. Ces ferroprotéines peuvent être classées en trois groupes : les composés contenant un noyau hème

(Hb, Mb), les enzymes hémiques (cytochrome c peroxydase) et les composés non hémiques (ferritine Ft, transferrine Tf, enzymes flavines-fer) [1], avec une répartition type du fer de 60 % provenant de l'Hb, 25 % stockés essentiellement sous forme de ferritine et enfin 15 % liés à la Mb contenue dans les tissus musculaires [1]. Son transport dans le sérum se fait principalement après fixation sur la transferrine [2]. Le fer transporté sert à la synthèse de protéines mais aussi à l'approvisionnement des réserves en cet élément. Les principaux tissus de stockage cellulaire du fer sont le foie, la rate et la moelle osseuse. L'apport nutritionnel recommandé est de 8 mg par jour pour un adulte (cette quantité est de 18 mg par jour pour les femmes ménopausées). L'apport maximal toléré est de 45 mg par jour [3]. Un adulte peut ainsi avoir entre 3 g et 4 g de fer dans son organisme [4]. Les valeurs physiologiques du fer dans l'organisme sont comprises entre  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  et  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  [5].

La conséquence la plus connue d'une carence en fer est l'anémie (teneur en fer inférieure à  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  [6]) qui est le résultat d'un stade avancé de carence. Cependant, d'autres maladies peuvent être rencontrées avant l'apparition de l'anémie, notamment, un état de fatigue physique et mentale due à une diminution du stockage de l'oxygène [7]. Dans le cas d'un excès de fer dans l'organisme, l'hémochromatose est la maladie la plus répandue (teneur en fer supérieure à  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  [8]). C'est une maladie génétique due à un dysfonctionnement du stockage du fer qui entraîne son accumulation principalement dans le foie [9]. Sans traitement, cette maladie peut entraîner des atteintes hépatiques sévères (cirrhose, cancer hépatocellulaire), un dysfonctionnement sexuel... [10].

Le dosage du fer est largement réalisé par les laboratoires de biologie médicale : en 2014, 5,3 millions d'analyses pour le dépistage de l'anémie ont été effectués (7,3 millions d'euros remboursés) [11].

Compte-tenu de la gravité des pathologies associées aux teneurs anormales en fer et du nombre important d'analyses effectuées, la fiabilité des résultats de mesure pour le dosage du fer représente donc un enjeu majeur afin de disposer d'un diagnostic fiable et d'adapter au mieux les traitements. C'est dans cet objectif qu'en France, la réforme de la biologie médicale, adoptée en 2013, rend obligatoire l'accréditation par le Comité français d'accréditation (Cofrac) de tous les laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 d'ici 2020 [12]. Cette norme implique que les laboratoires disposent d'un matériau ou d'une méthode de référence qui permettent de garantir la traçabilité des mesures au Système international d'unités (SI) [13]. Cependant, il n'existe ni méthode de référence, ni matériau de référence répertoriés sur le site du JCTLM (CIPM, IFCC and ILAC Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine pour le dosage du fer dans du sérum humain [14]. Ce comité a été créé en 2002 en réponse à la mise en œuvre de la Directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*. Il existe toutefois, à notre connaissance, deux matériaux de référence certifiés en fer

dans du sérum. Le SRM 1598a *Inorganic constituents in animal serum* du NIST (laboratoire national de métrologie des États-Unis) est certifié par une méthode primaire (analyse par activation neutronique). Le JCCRM 322-5 *Serum iron* (sérum humain) est certifié par la méthode de référence définie par l'*International Council for Standardization in Haematology* (ICSH), qui n'est pas traçable aux unités SI. [15].

## 2. Méthodes analytiques employées pour la mesure du fer dans le domaine biomédical

A ce jour, il existe différentes méthodes de dosage du fer que l'on peut classer en trois groupes : les méthodes colorimétriques, les méthodes par spectrométrie d'absorption atomique et les méthodes par spectrométrie de masse [16]. Les techniques colorimétriques et par spectrométrie d'absorption atomique sont utilisées en routine dans les laboratoires de biologie médicale. Les méthodes utilisant la spectrométrie de masse ne sont quasiment utilisées qu'au sein de laboratoires de référence et de laboratoires nationaux de métrologie (LNM).

Les méthodes colorimétriques reposent sur l'ajout d'un chromogène à l'échantillon qui va se complexer avec le fer ferreux (Fe(II)) présent. Le complexe coloré est ensuite mesuré par spectrophotométrie. La méthode de référence définie par l'ICSH consiste à récupérer le surnageant d'une solution contenant du sérum et un agent de déprotéinisation (utilisé afin de dissocier le fer ferrique, Fe(III) lié aux protéines), auquel est ajoutée la solution du chromogène disodium-4,7-diphényl-1,10-phénanthroline disulfonate (bathophénanthroline). Ce mélange est analysé par spectrophotométrie à 535 nm [15]. Il existe un très grand nombre de chromogènes. Les plus répandus sont :

- Férène : disodium 3-(2-pyridyl)-5,6-bis-[2-(5-furyle acide sulfonique)]-1,2,4-triazine.
- Ferrozine : 3 - (2-pyridyl) -5,6-bis- (5-phényle acide sulfonique)] -1,2,4- triazine.
- TPTZ : [2,4,6-tri-(2-pyridyl)-5-triazine].

Leurs longueurs d'onde respectives de lecture sont 562 nm, 593 nm et 595 nm. Ce type de méthode est facile à mettre en œuvre, rapide et représente un faible coût. Le principal inconvénient de cette méthode est le risque d'une mauvaise estimation de la concentration en fer. En effet, les sources d'erreurs sont principalement au niveau du prétraitement initial des échantillons, notamment la dissociation incomplète du fer lié aux protéines, la coprecipitation du fer avec des protéines et la réduction incomplète du Fe(III) en Fe(II) [17]. De plus, la présence d'autres composés dans le sérum comme la bilirubine et les lipides peut créer des interférences spectrophotométriques [18, 19]. Enfin, certains chromogènes utilisés, comme le ferrozine, réagissent également avec le cuivre. Cependant, à des concentrations physiologiques, cette erreur reste faible [15].

La spectrométrie d'absorption atomique est une technique où l'atome absorbe un quantum d'énergie lumineuse correspondant à une longueur d'onde spécifique et entraînant l'excitation de cet atome. La mesure de la quantité de lumière absorbée permet de déterminer la concentration de l'élément dans l'échantillon (loi de Beer-Lambert). L'échantillon est analysé après dilution et l'ajout d'un acide [20]. La longueur d'onde utilisée pour la détection du fer est de 248,3 nm. C'est une technique robuste, facile à mettre en œuvre et spécifique qui permet également l'analyse d'autres métaux. Cependant, la gamme de travail est limitée, ce qui oblige une dilution des échantillons de concentrations élevées [21].

Afin de pallier les différentes contraintes rencontrées avec les méthodes de routine, la spectrométrie de masse couplée à une source plasma à courant induit (ICP-MS) peut être utilisée. Cette technique repose sur la détection d'ions mono-atomiques en analysant leur rapport masse sur charge. Cette méthode possède les avantages d'être multi élémentaire, d'avoir d'excellentes limites de détection (de l'ordre de  $1 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et de permettre la mesure de rapports isotopiques [22]. Un de ses inconvénients est l'existence d'interférences spectrales qui peuvent affecter la mesure : polyatomiques (par exemple,  $^{56}\text{Fe} : ^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ ) et isobariques (par exemple,  $^{58}\text{Fe} : ^{58}\text{Ni}$ ). Ces interférences peuvent être en partie éliminées en utilisant une cellule de collision/réaction (CCT), un ICP-MS haute résolution ou des corrections mathématiques [23]. Plusieurs méthodes de quantification peuvent être utilisées : l'étalonnage externe, les ajouts dosés et la dilution isotopique [24–27]. L'étalonnage externe présente l'inconvénient de ne pas corriger les effets de matrices tandis que la méthode par ajouts dosés est complexe à mettre en œuvre. En associant la dilution isotopique (DI) à l'ICP-MS, des déterminations exactes et précises peuvent être effectuées pour les éléments qui ont au moins deux isotopes libres d'interférences spectrales. La DI permet de compenser de nombreuses sources d'erreur, dont la perte d'échantillon pendant le processus de préparation. Un avantage majeur de cette approche par rapport aux procédures d'étalonnages classiques est qu'elle peut compenser des effets tels que les fluctuations du plasma, les instabilités de l'instrument et les pertes d'analytes [28]. Cette caractéristique est d'une grande importance pour la détermination de nombreux éléments dans des échantillons biologiques, où des effets de matrice importants sont couramment observés [22, 28]. La DI-ICP-MS est ainsi utilisée pour analyser un grand nombre d'éléments comme le calcium (Ca), le cuivre (Cu), le potassium (K) dans le sérum humain [22, 29, 30]. D'autres matrices comme le sang, l'urine, le foie, le rein peuvent aussi être analysées [28].

Le Comité consultatif pour la quantité de matière (CCQM) du CIPM (Comité international des poids et mesures) considère la DI comme une méthode primaire pour la détermination de la teneur d'un élément [31]. L'incertitude globale peut être facilement déterminée sur la base de l'équation de mesure. Si elle est appliquée correctement, la DI peut directement relier le résultat de mesure au SI avec des incertitudes significativement plus petites

Tableau 1  
Récapitulatif des informations relatives aux quatre échantillons étudiés.

Échantillon	Type de matrice	Concentration en fer (en $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
NIST SRM 1598a	Sérum congelé, d'origine animale	$30,1 \pm 1,1$ ( $k = 2$ )
ERM <sup>®</sup> -DA 120a	Sérum congelé, d'origine humaine	$9,5 \pm 0,4$ ( $k = 2,2$ )
BCR <sup>®</sup> -637	Sérum congelé, d'origine humaine	–
B17	Sérum lyophilisé, d'origine humaine	$24,4 \pm 0,8$

que celles obtenues par d'autres méthodes. C'est pour cette raison que l'objectif du travail présenté dans cet article est le développement et la validation d'une méthode de référence pour le dosage du fer sérique par DI associée à l'ICP-MS.

### 3. Matériels et méthodes analytiques mis en œuvre

#### 3.1. Échantillons étudiés

Les quatre échantillons analysés sont des sérums d'origines animale et humaine. Le premier échantillon est un matériau de référence certifié du NIST (SRM 1598a) constitué d'un sérum congelé d'origine animale (mélange de sérum bovin et porcine) certifié pour différents éléments dont le fer. Les trois autres échantillons sont des sérums d'origine humaine. L'échantillon « ERM<sup>®</sup>-DA 120a *Frozen human serum – trace metals* » de l'institut national de métrologie du Royaume-Uni (LGC) est un sérum congelé certifié en cuivre (Cu), sélénium (Se) et zinc (Zn). L'échantillon « CRM BCR<sup>®</sup>-637 *Human serum* » est un sérum congelé certifié en aluminium (Al), sélénium (Se) et zinc (Zn) par l'IRMM (*Institute for Reference Materials and Measurements*, UE). Le dernier échantillon « B17 » a été fourni par l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de la santé) à l'occasion d'un contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale effectué en décembre 2012 [32]. Il se présente sous forme lyophilisée. Le tableau 1 récapitule les informations relatives aux échantillons utilisés.

Pour homogénéiser la présentation des concentrations en fer, l'unité utilisée est « la micromole par litre » ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Si besoin, la conversion de l'unité en « microgramme par litre,  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  » se fait en divisant par la masse molaire exacte du fer ( $M_{\text{Fe}} = 55,845 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

#### 3.2. Préparation des étalons

La préparation des étalons se fait à partir d'un matériau de référence certifié de haute pureté pour le fer, BNM-001 (LNE), ( $99,995 \pm 0,004$ ) % ( $k = 2$ ). Une masse d'environ 50 mg est minéralisée dans un mélange de 2 mL d'eau Milli-Q<sup>TM</sup> 18,2  $\text{m}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$  (Millipore, Allemagne) et de 3 mL d'acide nitrique (Optima qualité,

67–69 %, 10 ng·L<sup>-1</sup> Fe, Fisher chemical, Canada). Après minéralisation complète, le volume total est complété jusqu'à 50 mL avec de l'eau Milli-Q<sup>TM</sup>. Cette préparation est effectuée deux fois afin d'obtenir deux solutions mères de 1 000 µg·g<sup>-1</sup> en fer chacune. Six étalons sont réalisés par pesée afin d'obtenir des solutions de concentration en fer comprise entre 0,5 ng·g<sup>-1</sup> et 20 ng·g<sup>-1</sup>. Deux étalons marqués, enrichis en isotope <sup>57</sup>Fe, sont utilisés : le premier sous la forme d'une solution marquée certifiée en <sup>57</sup>Fe à (10,05 ± 0,17) mg·kg<sup>-1</sup> (Certipur<sup>®</sup> Reference Material Spike Solution, IRMM/Merck), le deuxième sous la forme métallique enrichie en <sup>57</sup>Fe (Eurisotop, France). Une quantité de 50 mg de métal est mise en solution dans un mélange de 3 mL d'H<sub>2</sub>O, 2 mL d'HNO<sub>3</sub> et 1 mL d'acide chlorhydrique (Optima qualité, 32–35 %, 10 ng·L<sup>-1</sup> Fe, Fisher chemical, Canada). Les solutions obtenues sont d'environ 1 000 µg·g<sup>-1</sup> en fer.

### 3.3. Traitement des échantillons

Quatre échantillons sont préparés à partir de sérums congelés (SRM 1598a, ERM<sup>®</sup>-DA 120a, CRM BCR<sup>®</sup>-637) ou lyophilisés (B17). Pour les échantillons congelés, aucune étape de mise en solution préliminaire n'est nécessaire. Pour l'échantillon lyophilisé, B17, une étape de reconstitution est réalisée. Une quantité de 5 mL d'eau est ajoutée directement à la poudre. La préparation des échantillons doit tenir compte de la mise en œuvre de la dilution isotopique. L'étalon marqué doit être ajouté à l'échantillon le plus tôt possible lors du traitement. Toutes les étapes de préparation sont réalisées par gravimétrie jusqu'à l'ajout de l'étalon marqué. Une quantité identique en échantillon et en étalon marqué, d'environ 0,15 g à 0,30 g, est mise en présence de 2 mL d'HNO<sub>3</sub> (Optima qualité) pour subir une digestion acide assistée d'un système de micro-ondes Discover SP-D (CEM, France). Les résidus de minéralisation sont ensuite repris dans 50 mL d'eau Milli-Q<sup>TM</sup> afin d'obtenir une concentration finale en fer comprise entre 5 ng·g<sup>-1</sup> et 15 ng·g<sup>-1</sup>. Les échantillons obtenus sont analysés par ICP-MS.

Parallèlement, une évaluation préliminaire de la teneur en fer des flacons Pyrex<sup>®</sup> (CEM, France) utilisés pour la minéralisation est réalisée par ICP-MS. Pour cela, avant chaque analyse, une série de dix blancs, contenant 2 % d'HNO<sub>3</sub> dans 50 mL d'eau, est préparée selon le même protocole que pour les échantillons.

### 3.4. Détection par ICP-MS

La détection s'effectue avec un ICP-MS. Trois instruments de mesure différents ont été utilisés dans cette étude : Agilent 7700× ICP-Q-MS (Agilent Technologies, USA), iCAP Qc ICP-Q-MS (Thermo Fisher Scientific, Allemagne) et ELEMENT XR<sup>TM</sup> ICP-MS (Thermo Fisher Scientific, Allemagne). Des essais préliminaires ont permis d'optimiser les différentes configurations utilisées pour l'analyse du fer. Les deux premiers ICP-MS sont de type quadripolaire avec une cellule de collision/réaction. La cellule est utilisée en mode réactionnel

Tableau 2  
Paramètres de fonctionnement des instruments.

Paramètres de l'Agilent 7700× ICP-Q-MS	
Paramètres du plasma	Paramètres d'acquisition
Puissance : 1 550 W	Isotopes mesurés : <sup>56</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe
Débit gaz vecteur : 1 L·min <sup>-1</sup>	Points par pics : 3
Débit gaz plasmagène : 15 L·min <sup>-1</sup>	Temps d'acquisition par point : 4 s
Débit gaz auxiliaire : 1 L·min <sup>-1</sup>	Répétition : 5
Paramètres de la cellule de collision/réaction	
Débit H <sub>2</sub> : 5 mL·min <sup>-1</sup>	
Biais CCT : -18 V	
Biais quadripôle : -15 V	
Paramètres de l'iCAP Qc ICP-Q-MS	
Paramètres du plasma	Paramètres d'acquisition
Puissance : 1 550 W	Isotopes mesurés : <sup>56</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe
Débit gaz vecteur : 1,05 L·min <sup>-1</sup>	Nombre de balayage : 60
Débit gaz plasmagène : 14 L·min <sup>-1</sup>	Dwell time : 0,2 s
Débit gaz auxiliaire : 0,8·min <sup>-1</sup>	Répétition : 5
Paramètres de la cellule de collision/réaction	
Débit He : 4 mL·min <sup>-1</sup>	
Biais CCT : -21 V	
Biais quadripôle : -18 V	
Paramètres de l'ELEMENT XR <sup>TM</sup> ICP-MS	
Paramètres du plasma	Paramètres d'acquisition
Puissance : 1 550 W	Isotopes mesurés : <sup>56</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe
Débit gaz vecteur : 1,06 L·min <sup>-1</sup>	Temps d'intégration par point : 0,05 s
Débit gaz plasmagène : 16 L·min <sup>-1</sup>	Nombre de points par pic : 20
Débit gaz auxiliaire : 0,8 L·min <sup>-1</sup>	Nombre de balayage : 15
	Répétition : 5
Paramètres haute résolution	
Résolution : 4 500	
Masse de l'aimant : 55,934	
Temps de stabilisation de l'aimant : 0,001 s	

avec un débit d'hydrogène de 5 mL·min<sup>-1</sup> pour l'instrument Agilent 7700×. Pour l'instrument iCAP Qc, la cellule est utilisée en mode collision avec un débit d'hélium de 4 mL·min<sup>-1</sup>. L'instrument ELEMENT XR est un instrument à secteur magnétique utilisé en moyenne résolution ( $m/\Delta m \approx 4 500$ ). Les différentes caractéristiques des instruments sont récapitulées dans le tableau 2.

Pour les trois instruments, les réglages des débits de gaz, la position de la torche ainsi que celle de la lentille ionique sont optimisés pour chaque analyse afin d'obtenir une sensibilité maximale sur une solution multi-élémentaire à 1 µg·L<sup>-1</sup>.

### 3.5. Dilution isotopique

La DI consiste à déterminer la concentration d'un élément (fer) dans un échantillon par l'ajout d'une quantité connue d'un étalon marqué de ce même élément dont la composition isotopique a été artificiellement modifiée. Une fois l'équilibre isotopique atteint, les rapports

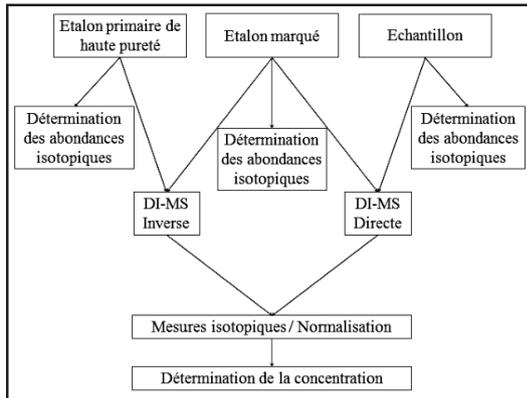


Fig. 1. – Différentes étapes de réalisation de la dilution isotopique utilisée comme méthode primaire.

isotopiques sont mesurés par spectrométrie de masse élémentaire [33]. Il est nécessaire de bien choisir le rapport isotopique mesuré pour mener la DI. On privilégie de préférence deux isotopes libres d'interférents et ayant une abondance naturelle élevée.

Pour cette étude, nous avons choisi le rapport isotopique  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ . Afin d'assurer le caractère primaire de la méthode, une approche métrologique de la DI est par ailleurs nécessaire. Le protocole fait intervenir plusieurs étapes qui sont synthétisées dans la figure 1.

Il faut déterminer les abondances isotopiques de l'échantillon, de l'étalon marqué (sp) et de l'étalon de haute pureté (eta). Ensuite, la concentration de l'étalon marqué ( $C_{\text{sp}}$ ,  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) est calculée à partir de la mesure du rapport des deux isotopes A et B (respectivement fer-56 et fer-57) dans le mélange entre l'étalon primaire de haute pureté et l'étalon marqué en utilisant l'équation (1) ; cette étape est la DI inverse.

$$C_{\text{sp}} = \frac{m_{\text{eta}} C_{\text{eta}}}{m_{\text{spi}}} \left[ \frac{R_i K_i (B)_{\text{eta}} - (A)_{\text{eta}}}{(A)_{\text{sp}} - R_i K_i (B)_{\text{sp}}} \right] \quad (1)$$

avec :

- $m_{\text{eta}}$  (g), prise d'essai de la solution étalon primaire ;
- $m_{\text{sp}}$  (g), masse d'étalon marqué pour la dilution isotopique inverse ;
- $C_{\text{eta}}$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), concentration de la solution étalon primaire ;
- $C_{\text{sp}}$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), concentration de l'élément dans la solution de l'étalon marqué ;
- $(A)_{\text{eta}}$  (%), abondance naturelle de l'isotope A dans l'étalon primaire ;
- $(B)_{\text{eta}}$  (%), abondance naturelle de l'isotope B dans l'étalon primaire ;
- $(A)_{\text{sp}}$  (%), abondance de l'isotope A dans l'étalon marqué ;

$(B)_{\text{sp}}$  (%), abondance de l'isotope B dans l'étalon marqué ;

$R_i$  (-), rapport isotopique pour la dilution isotopique inverse ;

$K_i$  (-), facteur de correction de dérive et de biais en masse pour la dilution inverse.

La concentration de l'élément à doser ( $C_{\text{ech}}$  en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) est calculée avec l'équation (2) à partir de la mesure du rapport des isotopes A et B dans le mélange échantillon-étalon marqué ; cette étape est la DI directe.

$$C_{\text{ech}} = \frac{m_{\text{spd}} C_{\text{sp}} \left[ \frac{R_d K_d (B)_{\text{sp}} - (A)_{\text{sp}}}{(A)_{\text{ech}} - R_d K_d (B)_{\text{ech}}} \right] d}{m_{\text{ech}}} \quad (2)$$

avec :

$m_{\text{spd}}$  (g), masse d'étalon marqué pour la dilution isotopique directe ;

$m_{\text{ech}}$  (g), prise d'essai de l'échantillon ;

$C_{\text{sp}}$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), concentration de l'élément dans la solution de l'étalon marqué ;

$C_{\text{ech}}$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), concentration de l'élément dans l'échantillon ;

$(A)_{\text{sp}}$  (%), abondance de l'isotope A dans l'étalon marqué ;

$(B)_{\text{sp}}$  (%), abondance de l'isotope B dans l'étalon marqué ;

$(A)_{\text{ech}}$  (%), abondance naturelle de l'isotope A dans l'échantillon ;

$(B)_{\text{ech}}$  (%), abondance naturelle de l'isotope B dans l'échantillon ;

$R_d$  (-), rapport isotopique pour la dilution isotopique directe ;

$K_d$  (-), facteur de correction de dérive et de biais en masse pour la dilution directe ;

$d$  ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), masse volumique de l'échantillon.

Une normalisation des mesures des  $R_{A/B}$  est effectuée pour prendre en compte le biais en masse du spectromètre de masse. L'analyse d'un point de contrôle préparé à partir de l'étalon de haute pureté permet de faire cette correction [34]. Enfin, la concentration de l'échantillon est déterminée en combinant les équations (1) et (2).

### 3.6. Évaluation des incertitudes

La traçabilité des résultats de mesure ainsi que leur comparabilité ne peuvent pas être assurées si une incertitude ne leur est pas associée. La démarche retenue pour ce travail repose sur la méthode analytique recommandée par le Guide pour l'expression des incertitudes

Tableau 3  
Isotope mesurée pour l'étalon de fer d'Eurisotop.

	<sup>54</sup> Fe	<sup>56</sup> Fe	<sup>57</sup> Fe	<sup>58</sup> Fe
<b>Abondance en %</b> ( <i>k</i> = 2)	0,001 4 ± 0,027	1,39 ± 0,36	96,63 ± 0,40	1,97 ± 0,24
<b>Valeurs Eurisotop fournies (%)</b>	0,03	1,65	96,28	2,04

(GUM) [35]. L'incertitude est calculée par la loi de propagation des incertitudes à partir du modèle mathématique décrivant l'ensemble du processus de mesure. Le modèle mathématique utilisé est l'équation générale (1) ou (2) de la dilution isotopique. Les incertitudes ont été calculées à partir du logiciel Wincert V.3.11.2002.0115 (Implex développé au LNE).

#### 4. Résultats

L'objectif est de développer et de valider une méthode primaire pour le dosage du fer dans du sérum. Cette méthode doit permettre un dosage fiable pour des concentrations physiologiques comprises entre 500 µg·L<sup>-1</sup> et 1 700 µg·L<sup>-1</sup> [5]. Cette méthode de référence permettra d'assigner des valeurs de référence traçables aux matériaux d'étalonnage et aux échantillons de contrôle de qualité, et aussi d'évaluer la justesse des méthodes de routine. Un protocole métrologique de la dilution isotopique associée à l'ICP-MS (DI-ICP-MS) a été mis en place pour atteindre cet objectif.

##### 4.1. Caractérisation de l'étalon marqué

Pour s'assurer de la traçabilité des résultats de mesure, des étalons certifiés en isotopie et en teneur ont été utilisés. Et l'étalon marqué <sup>57</sup>Fe d'Eurisotop (laboratoire non LNM) n'ayant pas été certifié suivant un protocole métrologique reconnu, a été caractérisé. Il a été analysé une fois par mois, pendant six mois, en utilisant les ICP-MS ELEMENT XR et iCAP Qc. Une moyenne des valeurs obtenues (*n* = 6) a été calculée. Un test de Cochran est réalisé afin d'éliminer les éventuelles valeurs aberrantes de manière statistique. L'incertitude élargie est choisie avec un facteur d'élargissement, *k*, de 2. Les valeurs obtenues sont compatibles avec celles données par le producteur du métal enrichi (tab. 3). Ceci indique que l'isotopie de ce matériau est stable.

##### 4.2. Évaluations préliminaires des concentrations en fer

Afin d'évaluer la gamme de concentrations dans laquelle se situent les échantillons et d'adapter, en conséquence, la dilution isotopique aux échantillons, une estimation préliminaire de la concentration des échantillons en élément fer est effectuée avec les ICP-MS ELEMENT XR et iCAP Qc à l'aide d'un étalonnage

Tableau 4  
Concentrations en fer de l'échantillon « NIST SRM 1598a » obtenues avec différents instruments.

	ICP-Q-MS (H <sub>2</sub> )	ELEMENT XR™	ICP-Q-MS (He)
<b>Concentration en fer</b> (µg·L <sup>-1</sup> , <i>k</i> = 2)	1 653 ± 38	1 629 ± 46	1 632 ± 41
<b>Biais (%)</b>	-2	-3	-3
<b>Écart normalisé</b> ( <i>E<sub>N</sub></i> )	0,76	1,35	1,28

externe puis en réalisant des ajouts dosés sur l'échantillon, pour une estimation plus précise (valeurs non reportées).

De plus, l'évaluation de la contamination éventuelle en fer des tubes de minéralisation donne une concentration moyenne de 10 µg·L<sup>-1</sup>. Les tubes de minéralisation ayant une concentration en fer supérieure à cette moyenne sont écartés.

##### 4.3. Validation de la méthode

La validation de la méthode (justesse et incertitude) a été réalisée par l'analyse de l'échantillon « SRM 1598a » et en participant à une comparaison interlaboratoire. Une série de quatre répliquats du matériau SRM 1598a est préparée et analysée sur les trois instruments de mesure afin de s'assurer qu'il n'y a pas d'impact sur le résultat final. La teneur en fer certifiée par le NIST est de (1 680 ± 60) µg·L<sup>-1</sup> (*k* = 2) avec une masse volumique d'échantillon de (1,027 4 ± 0,000 6) g·mL<sup>-1</sup>. Les résultats reportés dans le tableau 4 sont les valeurs moyennes des quatre répliquats pour chaque instrument de mesure avec leurs incertitudes élargies de répétabilité (*k* = 2).

Les valeurs mesurées peuvent être comparées à la valeur certifiée en utilisant l'écart normalisé *E<sub>N</sub>* [36].

$$E_N = \left| \frac{C_{\text{éch}} - C_{\text{cert}}}{\sqrt{u_{C_{\text{éch}}}^2 + u_{C_{\text{cert}}}^2}} \right| \quad (3)$$

avec :

*C<sub>éch</sub>*, valeur déterminée ;

*C<sub>cert</sub>*, valeur certifiée ;

*u<sub>C<sub>éch</sub></sub>*, incertitude-type de *C<sub>éch</sub>* ;

*u<sub>C<sub>cert</sub></sub>*, incertitude-type de *C<sub>cert</sub>*.

Les écarts normalisés obtenus avec les trois instruments sont inférieurs à 2, ce qui signifie que les valeurs mesurées ne sont pas statistiquement significativement différentes de la valeur de référence. La méthode développée est donc validée par l'analyse de ce matériau de référence certifié. L'intérêt d'avoir travaillé avec

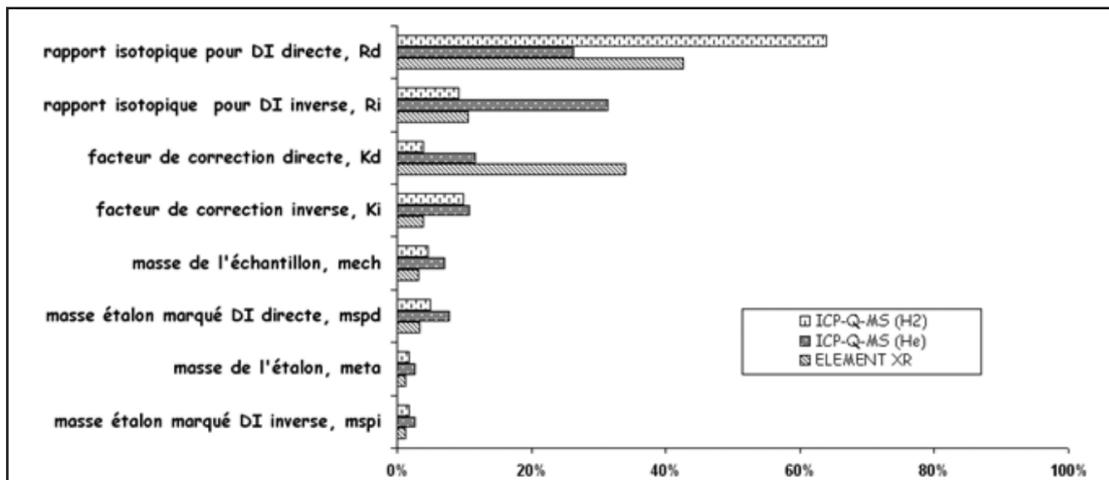
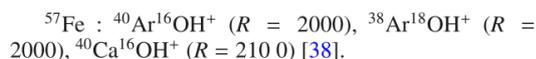


Fig. 2. – Répartition des composantes d'incertitude sur la détermination de la concentration en fer au LNE.

trois instruments de mesure est de pouvoir comparer leurs performances. En effet, ils utilisent des approches différentes pour corriger les interférences, qui dans le cas du fer sont principalement spectrales de type polyatomique avec l'argon et le calcium présent, d'une manière générale, dans le sérum avec une concentration de l'ordre de  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  [37] :



Une deuxième validation a été effectuée lors de la participation du LNE à la comparaison clé organisée dans le cadre du CCQM (comparaison CCQM-K107) pilotée en 2013 par le LGC sur l'échantillon « ERM<sup>®</sup>-DA 120a ». La méthode de quantification retenue par tous les laboratoires est la DI-ICP-MS : six ont utilisé l'ICP-MS à secteur magnétique et quatre, l'ICP-MS quadripôle avec une cellule de collision (CCT). L'étape de préparation d'échantillon choisie par la majorité des participants est une digestion acide avec activation par champ micro-ondes. Seulement deux laboratoires ont réalisé une simple dilution du sérum et ils obtiennent les valeurs les plus faibles. En effet, la digestion acide permet d'extraire la totalité du fer présent dans le sérum. Avec une dilution du sérum il y a un risque de précipitation des protéines et donc une sous estimation de la teneur en fer. Les résultats obtenus sur l'échantillon ERM<sup>®</sup>-DA 120a, ayant une densité de  $(1,0226 \pm 0,0203) \text{ kg}\cdot\text{L}^{-1}$ , sont représentés dans le tableau 5.

Une comparaison des moyennes entre les résultats du LNE et la valeur de référence KCRV conduit à un écart normalisé inférieur à 2, ce qui montre la justesse de la méthode développée et l'absence de biais. On peut noter que la concentration en fer du sérum ERM<sup>®</sup>-DA 120a est environ trois fois moins élevée que celle du sérum SRM 1598a. L'incertitude relative obtenue est de l'ordre

Tableau 5  
Résultats de la comparaison CCQM-K107 (échantillon ERM<sup>®</sup>-DA 120a).

	Valeur de référence mesurée	Valeur KCRV*	Écart normalisé ( $E_N$ )
Concentration en fer ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$541 \pm 22$ ( $k = 2$ )	$530 \pm 22$ ( $k = 2$ )	$0,74 < 2$

\*Valeur de référence de la comparaison.

de 4 %, ce qui est inférieur à l'incertitude cible de la comparaison (5 %).

La méthode développée a été ainsi validée pour un domaine de concentrations en fer comprises entre  $510 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et  $2050 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (soit  $9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  à  $37 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) avec une incertitude élargie ( $k = 2$ ) inférieure à 5 % sur l'ensemble du domaine.

#### 4.4. Évaluation de l'incertitude de mesure de la concentration en fer

Une évaluation des principales sources d'incertitude est effectuée. La figure 2 montre un exemple de la répartition des composantes d'incertitude pour une mesure individuelle.

Les principales sources d'incertitude sont les rapports isotopiques inverses ( $R_i$ ) et directs ( $R_d$ ). La tendance reste sensiblement la même suivant le type d'ICP-MS utilisé. L'effet sur l'incertitude finale des rapports isotopiques directs ( $R_d$ ) a tendance à être plus élevé que celui des rapports isotopiques inverses ( $R_i$ ). En effet, le type d'échantillon est différent puisque pour la DI directe, l'échantillon est le sérum donc une matrice complexe, tandis que pour la DI inverse, l'échantillon est une solution d'un étalon de haute pureté. D'autres facteurs ont un effet mineur

Tableau 6  
Concentrations en fer sur le BCR®-637 et le SRM 1598a.

	BCR®-637 (n = 4)	SRM 1598a (1 680 ± 60) µg·L <sup>-1</sup>	Écart normalisé (E <sub>N</sub> ) sur le SRM
Concentration en fer (µg·L <sup>-1</sup> , k = 2)	1 671 ± 74	1 174 ± 43	0,19 < 2

sur l'incertitude finale notamment les facteurs de correction de dérive et de biais en masse ( $K_d$  et  $K_i$ ) ainsi que les différentes prises d'essai ( $m_{ech}$ ,  $m_{spd}$ ,  $m_{spi}$ ,  $m_{eta}$ ). Tous ces facteurs correspondent au calcul de l'incertitude pour une mesure. Cependant, lorsque la valeur finale est calculée sur la base de plusieurs réplicats, la fidélité doit être prise en compte. La fidélité est l'écart entre les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés [13]. Ce facteur se calcule en divisant l'écart type par la racine carrée du nombre de réplicats. Plus la dispersion des résultats est élevée, plus la fidélité sera grande. Dans ce cas, cette variable est largement prépondérante par rapport aux autres données.

#### 4.5. Application de la méthode à des échantillons inconnus

Une fois la validité de la méthode démontrée dans l'intervalle de concentrations et aux incertitudes cibles, elle a été appliquée à la caractérisation d'échantillons inconnus afin d'assurer la mise en œuvre de programmes d'assurance qualité ou de contrôle qualité pour les laboratoires d'analyse biomédicale.

La méthode est ici appliquée à deux échantillons dont la teneur en fer était inconnue : le BCR®-637, un matériau de référence certifié mais pas pour le fer, et à un échantillon fourni par l'ANSM lors d'un contrôle national de qualité (CNQ) effectué en 2012 (échantillon B17).

##### 4.5.1. Échantillon BCR®-637

L'échantillon BCR®-637 a été analysé uniquement par l'ICP-MS ELEMENT XR™. Afin de contrôler la justesse de l'analyse, l'échantillon SRM 1598a a été utilisé comme point de contrôle. Cet échantillon est inséré dans la séquence d'analyse après chaque échantillon du BCR. Le tableau 6 montre les résultats obtenus.

Il faut noter qu'il n'y a pas eu de biais de mesure lors de l'analyse, au regard du résultat obtenu pour le SRM. En effet, l'écart normalisé est largement inférieur à 2, ce qui indique la justesse de la mesure. La valeur obtenue est comprise dans la gamme des valeurs physiologiques. En outre, l'incertitude finale est acceptable très correcte puisqu'elle est de l'ordre de 4 %.

##### 4.5.2. Échantillon B17

Pour le dosage du fer dans cet échantillon, 1 472 laboratoires ont participé au contrôle national de qualité

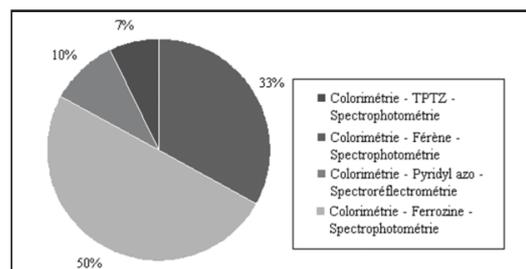


Fig. 3. – Répartition des méthodes de routine utilisées lors du CNQ ANSM 2012 pour la mesure du fer.

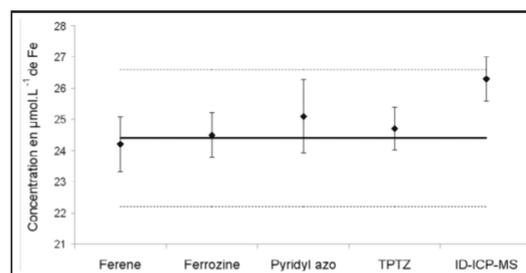


Fig. 4. – Résultats du CNQ de 2012 (sur l'échantillon B17). Les valeurs sont représentées avec les écarts types associés. La valeur consensuelle est indiquée par le trait plein. Les limites acceptables de la valeur consensuelle sont délimitées en pointillés.

(CNQ) organisé par l'ANSM en 2012. Tous les laboratoires participants ont utilisé une méthode colorimétrique. Environ 90 % d'entre eux ont associé la méthode colorimétrique à une détection spectrophotométrique (fig. 3). Le chromogène le plus représenté était la ferrozine, utilisé par la moitié des laboratoires (fig. 3).

La valeur consensuelle, moyenne de l'ensemble des résultats des laboratoires après élimination des valeurs aberrantes est de  $(1\ 363 \pm 45) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

La valeur déterminée par la méthode développée (DI-ICP-MS) est de  $(1\ 470 \pm 54) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $k = 2$ ). Le résultat obtenu est une moyenne des valeurs déterminées à l'aide de l'instrument ELEMENT XR ainsi que de l'instrument iCAP Qc. Cette valeur est comparée aux concentrations déterminées par les autres laboratoires (fig. 4).

La valeur obtenue par la méthode primaire développée est comprise entre les limites acceptables définies par l'ANSM. Cependant cette valeur déterminée par DI-ICP-MS est plus élevée (entre 5 % et 8 %) que les valeurs déterminées par les méthodes utilisées par les différents laboratoires. En effet, les méthodes de dosage utilisées sont différentes étant donné que les laboratoires ont effectué des dosages colorimétriques. La colorimétrie présente comme principal inconvénient de nécessiter une étape de pré-traitement des échantillons pour les analyser par spectrophotométrie. Cette étape consiste à dissocier le fer ferrique lié aux protéines et à le réduire en fer ferreux

Tableau 7

Résumé des résultats obtenus sur les différents échantillons exprimés dans les mêmes unités.

	Concentration en fer (en $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et incertitudes élargies (en %)	Valeurs physiologiques en $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
NIST SRM 1598a	29,3 (3)	10–30
ERM <sup>®</sup> -DA 120a	9,7 (4)	
BCR <sup>®</sup> -637	21 (4)	
B17	26,3 (3,5)	

pour que le complexe fer-chromogène puisse avoir lieu. Donc, il y a le risque d'une dissociation incomplète du fer lié aux protéines, d'une co-précipitation du fer avec des protéines ainsi que de la réduction incomplète du Fe(III) en Fe(II) qui pourrait expliquer ce biais. Or, dans la méthode développée tout le fer, quelque soit sa forme chimique, est dissocié des protéines par la digestion acide assistée par champs micro-ondes. Le biais observé peut non seulement provenir des performances des méthodes mais d'un effet de matrice susceptible de varier d'une méthode à une autre sachant que ce dernier est minimisé par l'utilisation de la DI.

## 5. Conclusion

Le développement d'une méthode primaire de référence basée sur la mise en œuvre de la dilution isotopique (DI) associée à l'ICP-MS pour la détermination du fer total dans du sérum s'est montrée concluante. En effet, le protocole analytique a été validé par l'analyse d'un matériau de référence certifié (SRM 1598a) ainsi que par la participation à la comparaison clé CCQM-K107.

La traçabilité au SI des résultats obtenus a été établie à travers l'utilisation d'un étalon primaire certifié en fer (BNM-001), par la mise en œuvre de protocoles métrologiques durant toutes les étapes de la préparation des échantillons et par l'établissement d'un bilan complet de l'incertitude de mesure.

L'application de cette méthode à d'autres échantillons de sérum (BCR<sup>®</sup>-637 et échantillon du contrôle de national de qualité ANSM B17) a démontré la validité de la méthode sur la mesure du fer pour des concentrations dans la gamme des valeurs physiologiques avec des incertitudes relatives inférieures à 5 % ainsi que la faisabilité de l'application de la méthode pour l'assignation de valeurs de référence lors de programmes de contrôle qualité (tab. 7).

Cette méthode fera prochainement l'objet d'une demande d'accréditation du LNE selon les référentiels ISO EN 17025 et ISO EN 15189.

La méthode développée pourra ainsi être transférée sur d'autres éléments essentiels comme par exemple des éléments d'importance en biologie médicale tels que les électrolytes (Na, Mg, K) ou sur d'autres matrices comme le sang (métaux lourds tels que le plomb).

## Références

- [1] ABBASPOUR N., HURRELL R. et KELISHADI R., "Review on iron and its importance for human health", *J. Res. Med. Sci.*, **19**, 2014, 164-174.
- [2] DEL CASTILLO M.E., MONTES GAYÓN M. et SANZ-MEDEL A., "The potential of mass spectrometry to study iron-containing proteins used in clinical diagnosis", *Analytica Chimica Acta*, **634**, 2009, 1-14.
- [3] TRUMBO P., "Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc", *J. Am. Diet. Assoc.*, **101**, 2001, 294-301.
- [4] ARORA S. et KAPOOR R.K., "Iron Metabolism in Humans: An Overview", *INTECH*, 2012, ISBN 978-953-51-0605-0.
- [5] WORWOOD M., "The laboratory assessment of iron status – an update", *Clinica Chimica Acta*, **259**, 1997, 3-23.
- [6] ROCKEY D.C. et CELLO J.P., "Evaluation of the gastrointestinal tract in patients with iron-deficiency anemia", *Gastrointestinal tract and iron-deficiency anemia*, **329**, 1993, 1691-1695.
- [7] COHEN-SOLAL A., LECLERCQ C., MEBAZAA A., De GROOTE P., DAMY T., ISNARD R. et GALINIER M., "Diagnosis and treatment of iron deficiency in patients with heart failure: Expert position paper from French cardiologists", *Archive of Cardiovascular Disease.*, **107**, 2014, 563-571.
- [8] « L'hémochromatose – hémochromatose héréditaire », *Orphanet*, Octobre 2006. <https://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/hemochromatose-FRfrPub92.pdf>
- [9] KANWAR P. et KOWDLEY K.V., "Metal Storage Disorders: Wilson Disease and Hemochromatosis", *Medical Clinics of North America*, **98**, 2014, 87-102.
- [10] LEITMAN S.F., "Hemochromatosis : the new blood donor", *Hematology ASH*, 2013, 2013, 645-650.
- [11] <http://www.ameli.fr/l-assurance-maladie/statistiques-etpublications/donnees-statistiques/actes-de-biologie-medicale/biolam-2012-2014.php>
- [12] NF EN ISO 15189, 2012, « Laboratoires de biologie médicale – Exigences concernant la qualité et la compétence ».
- [13] JCGM 200:2012 (E/F), 3<sup>e</sup> édition, "International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM) / Vocabulaire international de métrologie – Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM) », accessible par le site web du BIPM : <http://www.bipm.org/fr/publications/guides/>.
- [14] <http://www.bipm.org/jctlm/>.
- [15] ICSH, "Recommendations for the measurements of the serum iron in human blood", *British Journal of Haematology*, **38**, 1978, 291-294.
- [16] TAYLOR A., "Atomic spectrometry and the clinical chemistry of trace elements", *J. Anal. At. Spectrom.*, **21** 2006, 381-383.

- [17] TIETZ N.W., RINKER A.D. et MORRISON S.R., "When is a serum iron really a serum iron? The status of serum iron measurements", *Clin. Chem.*, **40**, 1994, 546-551.
- [18] DING Y.S., LIU L.L., MA Y.F., LIN B.C., "Determination of total Iron binding capacity of serum by Capillary Electrophoresis", *Chromatographia*, **49**, 1999, 71-74.
- [19] MOHSEN U.A., ELAISH K.A. et ISSA M., "Determination of iron in blood serum by spectrophotometric and atomic absorption methods as a comparative study", *Cukurova Medical Journal*, **38**, 2013, 358-364.
- [20] PerkinElmer, "Analytical methods for Atomic Absorption Spectroscopy", 1996.
- [21] LEE K.T. et JACOB E., "Determination of serum iron and zinc by atomic absorption spectroscopy", *Mikrochim. Acta.*, **1**, 1974, 65-72.
- [22] SARIEGO MUNIZ C., MARCHANTE GAYÓN J.M., GARCÍA ALONSO J.I., SANZ-MEDEL A., "Accurate determination of iron, copper and zinc in human serum by isotope dilution analysis using double-focusing ICP-MS", *J. Anal. At. Spectrom.*, **14**, 1999, 1505-1510.
- [23] VANHAECKE F., BALCAEN L., DE WANNEMACKER G. et MOENS L., "Capabilities of inductively coupled plasma spectrometry for the measurement of Fe isotope ratios", *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**, 2002, 933-943.
- [24] VANHOE H., VANDECASTEELE C., VERSIECK J. et DAMS R., "Determination of Iron, Cobalt, Copper, Zinc, Rubidium, Molybdenum, and Cesium in human serum by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry", *Anal. Chem.*, **61**, 1989, 1851-1857.
- [25] MOENS L., VERREPT P. et DAMS R., "New high-resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry technology applied for the determination of V, Fe, Cu, Zn and Ag in human Serum", *J. Anal. At. Spectrom.*, **9**, 1994, 1074-1078.
- [26] RIONDATO J., VANHAECKE F., MOENS L. et DAMS R., "Determination of trace and ultra trace elements in human serum with a Double Focusing Magnetic Sector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer", *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**, 1997, 933-937.
- [27] SARIEGO MUNIZ C., MARCHANTE GAYÓN J.M., GARCÍA ALONSO J.I. et SANZ-MEDEL A., "Multi-elemental trace analysis of human serum by double-focusing ICP-MS", *J. Anal. At. Spectrom.*, **14**, 1998, 193-198.
- [28] HINOJOSA REYES L., MARCHANTE GAYÓN J.M., GARCÍA ALONSO J.I. et SANZ-MEDEL A., "Determination of selenium in biological materials by isotope dilution analysis with an octapole reaction system ICP-MS", *J. Anal. At. Spectrom.*, **18**, 2003, 11-16.
- [29] YU L.L., DAVIS W.C., ORDONEZ Y.N. et LONG S.E., "Fast and accurate determination of K, Ca, and Mg in human serum by sector field ICP-MS", *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 2013, 8761-8768.
- [30] SIMPSON L.A., HEARN R., MERSON S. et CATTERICK T., "A comparison of double-focusing sector field ICP-MS, ICP-OES and octapole collision cell ICP-MS for the high-accuracy determination of calcium in human serum", *Talanta*, **65**, 2005, 900-906.
- [31] Compte-rendu de la 4<sup>e</sup> réunion du Comité Consultatif pour la Quantité de Matière, (1998), 1999, accessible par le site web du BIPM : <http://www.bipm.org>.
- [32] « Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale – Décembre 2012 », ANSM, 2014. [http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/de265b4ea27e79bc6b09c8a926e8b479.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/de265b4ea27e79bc6b09c8a926e8b479.pdf)
- [33] FASSETT J.D. et PAULSEN P.J., "Isotope dilution mass spectrometry for accurate elemental analysis", *Anal. Chem.*, **61**, 1989, 643-649.
- [34] STUMPF C. et LABARRAQUE G., « La dilution isotopique par ICP/MS : une méthode de référence pour l'analyse d'éléments traces », *Spectra Analyse*, **32**, 2003, 14-18.
- [35] JCGM 100:2008 « Évaluation des données de mesure – Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure / Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement », (GUM 1995 avec des corrections mineures), accessible par le site web du BIPM : <http://www.bipm.org/fr/publications/guides/>.
- [36] NF EN ISO 13528 « Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons interlaboratoires », AFNOR, 2005.
- [37] ALIMONTI A., BOCCA B., MANNELLA E., PETRUCCI F., ZENNARO F., COTICHINI R., D'IPPOLITO C., AGRESTI A., CAIMI S., FORTE G., "Assessment of reference values for selected elements in a healthy urban population", *Ann Ist Super Sanità*, **41**, 2005, 181-187.
- [38] NIXON D.E., MOYER T.P., JOHNSON P., MCCALL J.T., NESS A.B., FJERSTAD W.H. et WEHDE M.B., "Routine measurement of Calcium, Magnesium, Copper, Zinc, and Iron in urine and serum by Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy", *Clin. Chem.*, **32**, 1986, 1660-1685.

Article reçu le 19 janvier 2015, version révisée reçue le 24 juillet 2015.



**Annexe 2 : Article sur la comparaison de méthodes de référence d'ordres supérieures  
pour la quantification de l'hémoglobine totale**

# Comparison of potential higher order reference methods for total haemoglobin quantification—an interlaboratory study

Claudia Frank<sup>1</sup> · Christine Brauckmann<sup>1</sup> · Marie Palos<sup>2</sup> · Cristian G. Arsene<sup>1</sup> · Joerg Neukammer<sup>3</sup> · Maria Estela del Castillo Busto<sup>2</sup> · Sabine Zakel<sup>1</sup> · Claudia Swart<sup>1</sup> · Bernd Güttler<sup>1</sup> · Rainer Stosch<sup>1</sup>

Received: 11 October 2016 / Revised: 14 December 2016 / Accepted: 21 December 2016  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

**Abstract** The total haemoglobin (Hb) concentration in blood is one of the most frequently measured analytes in clinical medicine because of its significance for evaluating the health state of a human. The spectrophotometric cyanmethaemoglobin (HiCN) method is the internationally accepted conventional reference method to determine this biomarker. It is frequently used in clinical routine diagnostics but is not traceable to the International System of Units and thus does not meet highest metrological demands. A further critical issue is the toxicity of the necessary potassium cyanide. Different methods to solve these problems are reported here. They all were validated against the HiCN method in an interlaboratory comparison by measuring the total Hb concentration present in the certified reference material JCCRM 912-2M. Methods considered were the spectrophotometric alkaline haematin detergent (AHD) method as well as several isotope dilution (ID)-based approaches. The latter include inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), species-specific (SS) ICP-MS, organic MS and Raman spectrometry.

**Keywords** Haemoglobin · Reference method · HiCN · Isotope dilution · Raman spectroscopy · Mass spectrometry

## Introduction

The total haemoglobin (Hb) concentration in blood is an important diagnostic parameter that provides information about a person's health status. Several diseases such as anaemia [1], porphyria [2], polycythaemia vera [3] or diabetes [4] as well as jaundice [5] which is often a symptom for several diseases like acute hepatitis or acute liver failure [3] are known to be often accompanied by a total Hb value out of range of the normal physiological level. In addition, knowledge of the Hb concentration is essential for the control of banked blood [6, 7] and its level triggers decisions concerning blood transfusions [8]. The total Hb concentration is therefore considered of high priority and is one of the most frequently measured analytes in laboratory medicine [9].

Such routine measurements are carried out by clinical laboratories which are obliged to verify their analytical capabilities by regular participation in external quality assessment (EQA) schemes. The relevant physiological concentration ranges of high priority analytes such as total Hb are defined in national guidelines such as the Guideline for Quality Assessment in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (RiLiBÄK) of the German Medical Association [10]. This guideline further specifies the total allowable deviation of an individual laboratory result from the target value of an EQA ring trial which is 6 % in the case of total Hb.

Most of the results reported for this analyte are generated by photometric measurements like the so-called cyanmethaemoglobin (HiCN) method. Although this method generally leads to consistent results with statistical variations in the required order of 6 %, considerable

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00216-016-0176-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Claudia Frank  
Claudia.Frank@ptb.de

<sup>1</sup> Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB), Bundesallee 100, 38116 Braunschweig, Germany

<sup>2</sup> Laboratoire National de Métrologie et d'essais (LNE), 1, Rue Gaston Boissier, 75784 Paris Cedex 15, France

<sup>3</sup> Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB), Abbestraße 2-12, 10587 Berlin, Germany

discrepancies of some 20 % relative to the target value occurred in recent ring trials. The results are also method dependent and not traceable to the International System of Units (SI) because of missing of a primary calibrator. Further to this, the HiCN method requires highly toxic potassium cyanide to be used which might cause serious issues.

Despite the importance of Hb as a diagnostic marker, SI-traceable reference procedures are not yet available. This is due the complexity of the molecule that does not allow for analytical procedures to be used similar to those used for smaller molecules such as creatinine or glucose.

In this study, a variety of specially adapted isotope dilution (ID)-based potential reference methods were used along with photometric measurements to cross-validate different strategies and to provide SI-traceability for this measurand. This approach is also considered as a test case which should demonstrate the general applicability of the various tools to be used for other complex biomarkers present in different concentration ranges.

Six methods for total Hb quantification are compared using the certified reference material JCCRM 912-2M [11]. Two of the methods presented, the HiCN and the alkaline haematin detergent (AHD) method, are based on the conversion of the haemin into stable, uniform complexes and measuring their respective spectral absorbance at certain wavelengths. The methods of highest metrological order are based on the ID approach whereby different Hb isotopologues serve as internal standards. Different MS techniques being sensitive to the incorporated Fe or to specific signature peptides as well as Raman spectrometry being sensitive to the molecule as a whole were used as detection methods.

### HiCN method

The internationally accepted conventional reference method for measuring total Hb concentration is the HiCN or Dapkin method [12]. A reference preparation protocol for HiCN was developed by the International Council for Standardization in Haematology (ICSH) in 1995 and subsequently recommended by the World Health Organization [13]. The method is described in national standards [14–16] and is based on the conversion of all Hb variants in blood into HiCN. After conversion, the spectral absorbance  $A_x(\lambda)$  measured at 540 nm is used to calculate the Hb mass fraction  $w_x$  according to:

$$w_x = \frac{A_x(\lambda) \cdot M(\text{Hb}(\text{Fe}))}{d \cdot \varepsilon(\lambda) \cdot \Phi_x}, \quad (1)$$

whereby,  $d$  represents the absorption length of the rectangular spectrophotometric cuvette,  $\varepsilon(\lambda)$  is the molar decadic absorption coefficient of the reaction product,  $\Phi$  denotes the volume fraction of the blood sample in the measurement solution and  $M(\text{Hb}(\text{Fe}))$  is the mean molar mass of one Hb subunit (all

symbols used are additionally listed and explained in Table S3 of the Electronic Supplementary Material, ESM). The index  $x$  refers to the sample. For this method, a metrological traceability to the SI cannot be established because a primary calibrator, i.e. a well-characterized and stable reference material is not available and frozen blood samples are used for interlaboratory surveys. Another disadvantage of the HiCN protocol, in particular for routine applications, is the toxicity of the conversion reagents. Against this backdrop, various methods employing non-hazardous substitutes for HiCN have been investigated and applied in haematology [17–19].

### AHD method

An alternative spectral absorbance measurement procedure for total Hb concentration determination in blood is the AHD method. This protocol is based on a conversion of the different variants of Hb into a complex composed of alkaline haematin and non-toxic dispersant followed by a measurement of the absorbance at 574 nm [20, 21]. The results of the AHD and the HiCN methods are generally found to be in a good agreement with each other [22]; hence, methods alternative to the HiCN procedure including the AHD method are preferably used for routine applications [20–22].

Apart from its application in clinical haematology, the AHD procedure is of particular interest because of the availability of a primary calibrator. The AHD method results in the conversion of all Hb variants into oxidized haemin stabilized in Triton X-100 micelles. An identical compound can be derived by dissolving crystalline chlorohaemin of defined purity in the AHD conversion solution. Therefore, such chlorohaemin solutions are potentially suited as (primary) calibrator. The AHD method has the potential as primary method according to ISO 17511 [23] since the link to the SI can be established through chlorohaemin solutions of defined purity.

### ID approach

According to the Consultative Committee for Amount of Substance: Metrology in Chemistry and Biology (CCQM), the ID approach is a primary reference method of highest metrological quality, whose operation can be completely described, and for which a complete uncertainty budget can be expressed [24]. The ID is based on the principle that an isotopically enriched analyte (spike  $y$ ) is used as an internal standard. In practice, not only the sample  $x$  is mixed with a known amount of the spike but also a well-characterized reference  $z$  whose analyte concentration is as close as possible to that of sample  $x$ . With the measured isotopic composition of the blends  $b_x$  (sample  $x$  and spike  $y$ ) and  $b_z$  (reference  $z$  and spike  $y$ ) the Hb concentration in the sample  $x$  can be calculated [25–28]. Besides the two spectrophotometric methods, this paper covers three different variants of ID-MS as well as one ID-Raman technique (the

abbreviation ID-MS includes all here described MS methods while IDMS represents only the organic MS method).

**ID-ICP-MS, IS-SS-ICP-MS and IDMS**

The first MS technique considered is the ID-ICP-MS. It is based on the determination of the total Fe content in sample x assuming that the only Fe source is Hb, representing approximately 98 % of the total protein content in red blood cells [29]. Taking into account that each Hb molecule contains four Fe atoms (the mass fraction of Hb-Fe is therefore 0.00347 g/g [11]), Fe mass fractions are converted into Hb mass fractions. Before acid digestion, the sample is spiked with a <sup>57</sup>Fe spike followed by ICP-MS measurements. In parallel, reverse ID analysis is carried out against a primary calibrator, a CRM Fe material or reference z, to assess SI-traceability.

The second MS method is the species-specific (SS) ICP-MS. Here, a commercially available HbA<sub>0</sub> material serves as the reference. The species-specific spike is enriched in <sup>57</sup>Fe and was synthesized and characterized as described by Brauckmann et al. [30]. Since all Hb variants behave identically during chromatographic separation and subsequent ICP-MS detection, this reference and spike are suitable to determine the total Hb concentration. Within this study, different variants like HbA<sub>0</sub>, HbA<sub>2</sub>, HbF and HbS were tested. HbA<sub>0</sub> was chosen because it is the most abundant form of Hb in humans (96–98) %. It consists of two α-chains, two β-chains and four haemin units [31]. The ID-SS-ICP-MS was performed as double and as triple ID experiment whereby the latter requires a second blend bz2 to be used. This blend also contains the reference z and the spike y but in different proportions compared to bz1 [28].

Finally, Hb was quantified by IDMS following a concept known from the field of proteomics research [32]. Briefly, signature peptides produced by proteolysis of Hb with trypsin were identified and quantified in place of the intact protein. Considering α-globin as a component present in all Hb variants, signature peptides for the quantification of α-globin were selected, thus corresponding to the total Hb concentration in the sample. In this case, <sup>15</sup>N-enriched HbA<sub>0</sub> of biotechnological origin was used as the spike.

All ID-MS approaches were implemented as double ID-MS, and therefore, the mass fractions w<sub>x</sub> were calculated according to the following equation [28, 33]:

$$w_x = w_z \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{m_z}{m_{yz}} \cdot \frac{R_y - R_{bx}}{R_{bx} - R_z} \cdot \frac{R_{bz} - R_z}{R_y - R_{bz}} \tag{2}$$

Here, m denotes the mass, R represents the isotopic ratios with R<sub>bx</sub> = x<sub>bx,57</sub>/x<sub>bx,56</sub> and R<sub>bz</sub> = x<sub>bz,57</sub>/x<sub>bz,56</sub>, the indices x the sample, y the spike and z the reference; 56 and 57 are the isotopes of interest.

The results w<sub>x</sub> obtained by ID-ICP-MS corresponds to the Fe mass fraction. To convert this result into the Hb mass fraction w<sub>Hb</sub>, the molar masses M of Fe and Hb as well as the dilution factor f<sub>dil</sub> = (1/Φ) of the sample were considered using the following equation:

$$w_{Hb} = w_x \cdot f_{dil} \cdot \frac{M_{Hb}}{4 \cdot M_{Fe}} \tag{3}$$

The triple ID-SS-ICP-MS approach requires an additional blend bz2 to be used, leading to Eq. 4 [28]:

$$w_x = w_z \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{1}{R_x - R_{bx}} \cdot \left[ \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot \frac{R_{bz2} - R_{bx}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot (R_x - R_{bz1}) + \frac{m_{z2}}{m_{yz2}} \cdot \frac{R_{bx} - R_{bz1}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot (R_x - R_{bz2}) \right] \tag{4}$$

**ID-Raman**

Raman spectrometry is an optical alternative to measuring isotopologue abundance ratios. Based on molecular vibrations, mass discrimination between the analyte and the spike is obtained from vibrational energies that are shifted to lower wavenumbers for the spike as compared to those obtained for the pristine analyte. The application of the ID-Raman method requires a set of reference mixtures containing different ratios between the reference z and the spike y solution to be measured. From the resulting spectra, a partial least squares (PLS) model was generated and validated by cross-validation according to the leave-one-out principle. The predictive ability of the PLS model and the optimum number of factors to be

included was judged by means of the root mean square error of cross validation (RMSECV). With the help of this model and the spectra of the blends bx and bz, the mass fraction w<sub>x</sub> of sample x can be determined using the ID-Raman equation [34]:

$$w_x = w_z \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{m_z}{m_{yz}} \cdot \frac{\frac{\dot{x}_{bx}}{(1-\dot{x}_{bx})}}{\frac{\dot{x}_{bz}}{(1-\dot{x}_{bz})}} \tag{5}$$

Here, ẋ denotes the amount-of-substance fraction. The spike material used here is the same recombinant <sup>15</sup>N-HbA<sub>0</sub> that was used for the IDMS method and the HbA<sub>0</sub> reference

material was applied for both the ID-SS-ICP-MS and the IDMS method. Under the conditions described here, the different Hb variants are not distinguishable which allows this method to be used for total Hb quantification.

## Experimental

### General

To ensure the consistency and comparability of the results, all partners participating in the comparison used the same sample material JCCRM 912-2M (ReCCS, Kanagawa, Japan) having a certified total Hb concentration of  $(137.2 \pm 1.5)$  g/L. The material is a haemolysed erythrocyte sample out of pooled blood sample and the certification was according to the ICSH reference protocol. The density of the sample was measured with an oscillating tube densimeter (Stabinger Messtechnik [35]) to be  $r_x = (1.03949 \pm 0.00073)$  g/cm<sup>3</sup> ( $k=2$ ) at 23 °C. Taking into account the temperature dependence of the water density, the value reduces to  $r_x = (1.0390 \pm 0.0007)$  g/cm<sup>3</sup> at 25 °C which is in excellent agreement with the values given by ReCCS for the sample material JCCRM 912-2M ( $r_{\text{cert}} = 1.039$  g/cm<sup>3</sup>). Based on these values, the mass fraction of Hb is  $w_{x,\text{cert}} = (132.1 \pm 1.4)$  g/kg. The samples were thawed as recommended by the manufacturer's protocol. For calculations, the mean molecular weight of Hb of 64,458 g/mol [36] was used. Unless otherwise stated, aqueous solutions and dilutions were prepared in ultrapure water (18 M $\Omega$ ·cm) produced using a Milli-Q system (Millipore, Darmstadt, Germany or Molsheim, France).

Specific information about the chemicals and instrumentations used for all methods are given in the [ESM](#).

### HiCN and AHD methods

For the HiCN and AHD experiments, a procedure was used as described in DIN 58931 [15]. Both procedures require four different dilutions of the sample with the converting solution to be prepared gravimetrically. Using the respective molar extinction coefficients [37–39], the mass fraction for Hb was calculated using Eq. 1.

**Sample preparation** The temperature of the 912-2M material and the HiCN conversion solution were adapted to room temperature prior to mixing. Four solutions were gravimetrically prepared covering a range from 1:50 to 1:400. The sample specific dilution series was adjusted to cover an absorbance range approximately between  $0.4 \leq A(\lambda = 540 \text{ nm}) \leq 1.6$ , since uncertainty contributions are minimal for these absorbance values. Subsequent to the preparation of the dilution series, the solutions were centrifuged for 20 min at 800 g to remove fragments of the cell membranes. After 90 min the spectral

absorbances of the four solutions were measured relative to the conversion solution using selected pairs of cuvettes, characterized by identical absorbance when filled with pure water. To have access to the reproducibility of the instrument and to make sure that the endpoint of the reaction was reached, 20 replicate measurements were performed for all solutions covering a spectral range from 450 nm to 750 nm. When applying the AHD method, the sample was prepared as described for the HiCN method with one exception. The volume fraction of the sample was in the range between 1:40 and 1:250 to account for the smaller extinction coefficient of the AHD complex and the dispersant.

### ID-ICP-MS

**Sample preparation** The approach developed for the quantification for total Hb is based on the determination of its Fe content by means of double ID-ICP-MS using <sup>57</sup>Fe as an inorganic spike following acid digestion. After a first evaluation of the Fe content in the sample by external calibration and standard addition, double ID-ICP-MS was applied. Approximately 0.15 g of the sample x was mixed with the <sup>57</sup>Fe-enriched spike y to give a <sup>57</sup>Fe/<sup>56</sup>Fe ratio of approximately 1. Then, the resulting blend bx was gently mixed, diluted up to 2 mL with HNO<sub>3</sub> and subject to microwave-assisted acid digestion. The resulting digest was diluted to 50 mL with ultrapure water to obtain a final concentration of about 5 to 15 ng/g Fe. Finally, the sample was measured with ICP-MS performed on two different days and with at least four independent replicates being prepared. To perform reverse ID-ICP-MS at least four blends bz were prepared gravimetrically using the reference z and the spike y (<sup>57</sup>Fe).

To check the presence or absence of low molecular Fe species in the sample (e.g. free Fe or haemin), an ultrafiltration step with a cut-off of 3 kDa was performed with samples of  $\approx 0.5$  g centrifuged with an Ultracentrifuge Sigma 1-16PK (Thermo Fisher Scientific, Germany) at 14,000 g at 4 °C for 30 min. Both the retentate ( $>3$  kDa) and the permeate ( $<3$  kDa) were accurately weighted and the centrifugation cycle was repeated until a constant weight of the fractions was obtained. Then, the different fractions were analysed by double ID-ICP-MS using the protocol described in the [ESM](#).

### ID-SS-ICP-MS

**Sample preparation** To determine the purity of the HbA<sub>0</sub> reference material, 10 mg HbA<sub>0</sub> were dissolved in 8 mL ultrapure water to yield an Fe concentration of  $\approx 2$  mg/kg. This solution was freshly prepared on the day of use. The Fe reference solution and the <sup>57</sup>Fe-enriched spike solution were also adjusted to a Fe concentration of  $\approx 2$  mg/kg. These three solutions were used for the preparation of the blends with an isotopic ratio of <sup>57</sup>Fe/<sup>56</sup>Fe = 1. Three blends containing HbA<sub>0</sub> and

$^{57}\text{Fe}$ -enriched spike solution and two blends with the Fe reference and the  $^{57}\text{Fe}$ -enriched spike solutions were prepared gravimetrically. In the next step, 1.5 mL  $\text{HNO}_3$  and 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  were added volumetrically to each blend for microwave digestion. Blank samples and samples to calculate the mass bias correction were prepared in parallel and treated like the blend solutions. After microwave digestion, the samples were diluted with 50 mL ultrapure water resulting in a Fe concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The purity of the Hb material was determined by total Fe double ID-ICP-MS. Because the Hb:Fe-stoichiometry is known to be 1:4, the Hb concentration in the material can be calculated.

The ID-SS-ICP-MS experiments for measuring the Hb concentration of the reference material 912-2M were implemented as both double and triple variants. The  $^{57}\text{Fe}$ -enriched HbA<sub>0</sub> spike material was prepared as described by Brauckmann et al. [30]. All preparation steps were done gravimetrically and defined  $^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ -isotope ratios of 1.1 (bz1) and 0.9 (bz2) were adjusted. All dilutions and dissolving steps were undertaken with 12.5 mmol/kg TRIS at pH 7.8. The HbA<sub>0</sub> stock solution (8 mg HbA<sub>0</sub> in 1 g TRIS buffer) was freshly prepared at the day of measurement. All solutions for preparation were adjusted to a Hb concentration of 4 mg/g. The volumes of the blends bx, bz1 and bz2 were adjusted to 60  $\mu\text{L}$ , diluted with 1 mL and homogenized. Furthermore, 20  $\mu\text{L}$  of a 50 mmol/kg KCN solution were added. The samples were stored at 4 °C in the HPLC autosampler and analysed with a nested sample sequence.

## IDMS

**Sample preparation** To ensure independence from the ID-SS-ICP-MS approach, the purity of the HbA<sub>0</sub> reference material was determined by amino acid analysis using IDMS as described by Arsene et al. [40]. An HbA<sub>0</sub> reference solution was prepared in 50 mM TRIS at pH 7.0 with a concentration close to a stock solution of  $^{15}\text{N}$ -HbA<sub>0</sub> in acetonitrile/water (1/2, v/v) containing 0.1 % formic acid. The concentration of the  $^{15}\text{N}$ -HbA<sub>0</sub> stock solution was determined by comparing mass spectrometric signals of tryptic  $^{15}\text{N}$ -labelled peptides with those of the HbA<sub>0</sub> reference solution added in a known amount.

Blends of known amounts of the HbA<sub>0</sub> reference solution and the  $^{15}\text{N}$ -labelled HbA<sub>0</sub> stock solution were prepared and used for calibration. The JCCRM 912-2M material was diluted in 50 mM TRIS at pH 7.0. Three aliquots of this solution were each spiked with the same amount of  $^{15}\text{N}$ -labelled HbA<sub>0</sub> as is present in the calibration blend. All solutions were gravimetrically prepared. Samples and calibration blends (bx and bz) were proteolysed using trypsin. The products were desalted by solid phase extraction (SPE), lyophilized and dissolved in 30  $\mu\text{L}$  water containing 0.1 % formic acid prior to LC-MS/MS analysis.

## ID-Raman

**Sample preparation** The HbA<sub>0</sub> reference material was dissolved in ultrapure water and adjusted to a concentration close to the  $^{15}\text{N}$ -HbA<sub>0</sub> spike solution (~0.1 g/kg). Within this study, different variants like HbA<sub>0</sub>, HbA<sub>2</sub>, HbF and HbS were tested. All behave identically therefore, HbA<sub>0</sub> was chosen because it is the most abundant form of Hb in humans. For the generation of the PLS model, 11 different ratios between 0 and 1 of the HbA<sub>0</sub> reference z and the  $^{15}\text{N}$ -HbA<sub>0</sub> spike y were prepared. After having been shaken for at least 1 h, two drops of every mixture were deposited on top of each other on a 200 nm Au-coated Si wafer (drop-coating method) [41] and dried at room temperature. Every drop was measured at least three times, resulting in a set of 33 calibration spectra. The sample x (JCCRM 912-2M) was diluted with ultrapure water to a concentration close to the spike concentration. Afterwards sample x and spike y and also reference z and spike y were mixed in a 1:1 ratio, respectively. Both blends bx and bz were prepared three times and each resulting solution was measured at least at three different positions on the edge of one dried drop where the Hb tend to migrate. All preparation steps were handled gravimetrically and on the day of measurement. Preprocessing of the spectra includes baseline correction and vector normalization.

## Results and discussion

The results obtained by the different methods are summarized in Table 1 and Fig. 1. The uncertainty budgets related to each method were calculated according to the ISO *Guide to the expression of uncertainty in measurement* (GUM) [42]. All uncertainty values are expressed as expanded uncertainties  $U$  with a coverage factor of  $k=2$ .

Although the study material comes along with a certified value for the total Hb concentration, it was decided to calculate an independent reference value because reference material certification does not involve results obtained by higher order reference procedures which should be compared here. Instead, a value based on consensus of the set of reported laboratory results was calculated. Among the group of estimators recommended in a CCQM guidance document [43], the median  $\bar{w}_m$  was chosen here as it has been proven to be a robust estimator which has frequently been applied to determine reference values in several CCQM key comparisons [43–45]. The median was calculated according to following equation for an odd number of methods:

$$\bar{w}_m = w_{(N+1)/2} \quad (6)$$

with  $N$  being the number of the different methods involved. The associated standard uncertainty is described as:

**Table 1** Certified value, mass fractions  $w_{\text{Hb}}$ , from the ICSH recommended mass concentration  $\beta_{\text{Hb}}$  and the corresponding expanded uncertainties ( $k=2$ ) from the different methods applied to JCCRM 912-2M

Method	Mass fraction $w_{\text{Hb}}/\text{g/kg}$	Mass concentration $\beta_{\text{Hb}}/\text{g/L}$	Expanded uncertainty $U_{\text{rel}}/\%$
HiCN	$130.9 \pm 0.9$	$135.6 \pm 0.9$	0.7
AHD	$131.2 \pm 1.5$	$136.3 \pm 1.5$	1.1
ID-ICP-MS	$136.0 \pm 4.1$	$141.3 \pm 4.2$	3.0
Double ID-SS-ICP-MS	$135.4 \pm 2.1$	$140.4 \pm 2.2$	1.6
Triple ID-SS-ICP-MS	$133.1 \pm 2.9$	$138.3 \pm 3.0$	2.2
IDMS	$131.5 \pm 5.1$	$136.6 \pm 5.3$	3.9
ID-Raman	$136.0 \pm 8.5$	$141.3 \pm 8.8$	6.2
Median $w_{\text{m}}$	$133.1 \pm 3.2$	$138.3 \pm 3.3$	2.4
Certified value	$132.1 \pm 1.5$	$137.2 \pm 1.5$	1.1

$$u(\bar{w}_{\text{m}}) = \sqrt{\frac{\pi}{2N}} \cdot 1,483 \cdot \text{med}\left(|w_i - \bar{w}_{\text{m}}|\right) \quad (7)$$

with  $i$  as continuous number.

When calculating  $w_{\text{m}}$  according to Eq. 6 the participants' results  $w_i$  have to be arranged in the order of increasing values, while calculation of  $u(\bar{w}_{\text{m}})$  using Eq. 7 requires the absolute deviations of the participants' results from the median  $|w_i - \bar{w}_{\text{m}}|$  to be arranged in the order of increasing values.

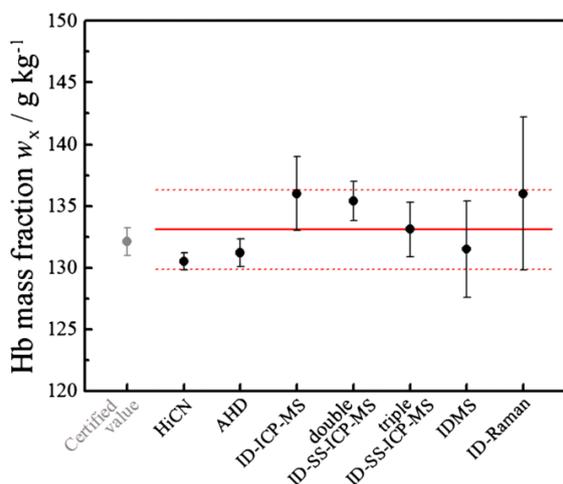
The purpose of this comparison was to establish quantitative expression of the equivalence of the individual measurements. A quantitative estimate for equivalence of measurements is the degree of equivalence (DoE,  $d_i$ ) which is expressed as the deviation of the measurement results from

the comparison reference value together with the uncertainty of that deviation:

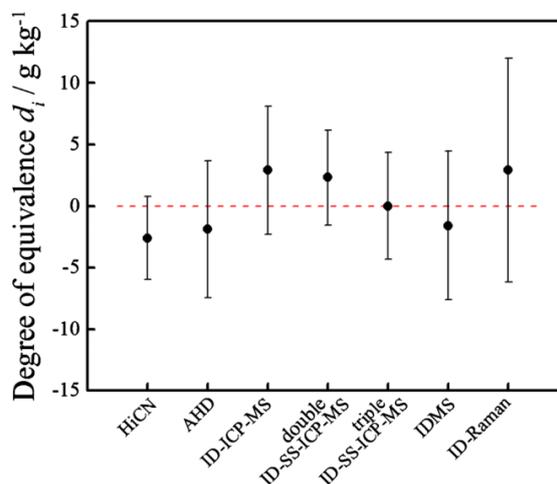
$$d_i = w_i - \bar{w}_{\text{m}} \quad (8)$$

$$u(d_i) = \sqrt{u^2(w_i) + u^2(\bar{w}_{\text{m}})} \quad (9)$$

The results are plotted in Fig. 2. Those values enclosing zero with their uncertainty interval are considered to be consistent with the reference value and hence can be assumed as a successful contribution. Using  $|d_i|/U(d_i) \leq 1$  as the criterion for acceptable equivalence, all methods considered in this study pass this criterion.



**Fig. 1** Hb mass fractions  $w_{\text{Hb}}$  and their corresponding expanded uncertainties ( $k=2$ ) obtained with the different methods for the reference material 912-2M. The solid red line represents the median  $\bar{w}_{\text{m}}$  (133.1 g/kg) of the experimental values and the dashed red lines represent the expanded uncertainty (3.2 g/kg,  $k=2$ )



**Fig. 2** DoE plot of the equivalence statements related to the median. The black dots show the DoE  $d_i$ , while the error bars denote the expanded uncertainty associated with the DoE  $U(d_i)$ , calculated applying a coverage factor of  $k=2$ . Results enclosing zero with their uncertainty interval are considered to be consistent with the reference value

The next paragraphs provide a closer look at the results obtained by the individual methods.

### HiCN method

To ensure photometrical traceability, the true quantity values of spectral absorbance  $A_x$  were derived from the measured values  $a_x$  using the lines relation  $A_x(\lambda) = C_0(\lambda) + C_1(\lambda) \cdot a_x(\lambda)$ . As described in Witt et al. [46], the constants  $C_0$  and  $C_1$  were determined by using certified neutral density filters. For each of the four dilutions prepared, the mass fractions  $w_x$  were calculated according to Eq. 1 using the molar extinction coefficient of  $\epsilon^{\text{HiCN}}(\lambda = 540 \text{ nm}) = (11,000 \pm 20) \text{ L}/(\text{mol}/\text{cm})$  for the Hb monomer [38] with the molecular weight  $M = (16114.5 \pm 16) \text{ g}/\text{mol}$  [36]. This value is an average and was chosen in accordance to the German Standards Institution (DIN 58931 [15]), the British Standards Institution (BS 3985 [14]) and the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [16]. The final result was calculated as the weighted average value to be  $(130.5 \pm 0.9) \text{ g}/\text{kg}$ .

### AHD method

As with the HiCN method, photometrical traceability was established by converting the measured absorbance values  $a_x$  to the corresponding true quantity values  $A_x$ . The mass fractions  $w_x$  were calculated according to Eq. 1 for each of the four dilutions using the molar extinction coefficient  $\epsilon^{\text{AHD}}(\lambda = 574 \text{ nm}) = (6945 \pm 19) \text{ L}/(\text{mol}/\text{cm})$  [37]. The final result was determined to be  $(131.2 \pm 1.5) \text{ g}/\text{kg}$  based on the weighted average from the four values obtained for the corresponding dilutions.

The uncertainty budgets associated to both absorbance-based methods are discussed in detail in Witt et al. [46]. Accordingly, the largest contribution results from the uncertainties of the molar extinction coefficients.

### ID-ICP-MS

Equations 2 and 3 were used as model equations to calculate the Hb concentration of the JCCRM 912-2M by means of Fe determination as well as the uncertainty associated with the method. Calibration factors  $K$  (according to Eq. 6, with  $j$ : x, y, z, bx and bz) are needed to correct for mass bias discrimination [47] by converting the measured counting rate or peak area ratios  $R_{j,\text{meas}}$  into “true” isotope amount ratios  $R_j$  using a natural Fe standard of the reference material z.

$$R_j = K \cdot R_{j,\text{meas}} \quad (10)$$

In order to assess metrological traceability, the spike enriched in  $^{57}\text{Fe}$  was characterized every day by reverse ID-

ICP-MS taking into account its isotopic abundances calculated during a 6-month period ( $\chi(^{56}\text{Fe}) = 1.39(36) \%$ ,  $\chi(^{57}\text{Fe}) = 96.63(40) \%$ ). The mass fraction  $w_x$  was calculated to be  $(136.0 \pm 4.1) \text{ g}/\text{kg}$  ( $n = 8$ ).

The presence of Fe forms not bound to Hb was evaluated in the JCCRM 912-2M by a 3 kDa ultrafiltration step. Ultrafiltrated fractions were submitted to microwave digestion after  $^{57}\text{Fe}$  spike addition. By converting the Fe content into Hb content, less than 0.1 % Hb was found in the fraction <3 kDa while 98.3 % Hb were found in the fraction >3 kDa according to the certificated value. Therefore, all quantified Fe is assumed to be complexed by Hb in the JCCRM 912-2M reference material.

### ID-SS-ICP-MS

According to Eqs. 2 and 6, the purity and the associated uncertainty were calculated for the HbA<sub>0</sub> material referring to its total Hb amount, which was used as reference z for the 912-2M analysis. This was achieved by means of total Fe determination using ID-ICP-MS. A double ID-ICP-MS approach was applied and measured against the Fe reference material. The certified value  $w(\text{Fe})$  in this material is  $(0.999864 \pm 0.000044) \text{ kg}/\text{kg}$ . Applying the double ID-MS equation (Eq. 2), the purity of the HbA<sub>0</sub> material was calculated to be  $(0.4794 \pm 0.0034) \text{ g}/\text{g}$  ( $n = 30$ ). The manufacturer’s specification for this material is given to a purity of (40–60) %.

The mass fraction  $w$  for the JCCRM 912-2M material applying the double ID-SS-ICP-MS was calculated to be  $(135.4 \pm 2.1) \text{ g}/\text{kg}$  and with triple ID-SS-ICP-MS to be  $(133.1 \pm 2.9) \text{ g}/\text{kg}$ . The calculations were carried out according to Eqs. 2 and 6 for the double ID-SS-ICP-MS approach and according to Eqs. 4 and 6 for the triple ID-SS-ICP-MS approach.

### IDMS

For the IDMS approach, the purity of the HbA<sub>0</sub> reference material was determined by amino acid analysis. The mean value was found to be  $(0.497 \pm 0.017) \text{ g}/\text{g}$ . In detail, the results were 0.481 g/g, 0.504 g/g and 0.506 g/g obtained for phenylalanine, leucine and valine, respectively. Under the assumption that Hb is the only amino acid source in the reference solution and with a known amino acid sequence of Hb the mass fraction in the reference solution can be calculated.

The mass fraction  $w_x$  of Hb in the JCCRM 912-2M material was calculated by referring signals of signature peptides in the sample to those in the calibration blend according to Eqs. 2 and 6. Results for the mass fraction of total Hb in the JCCRM 912-2M material were  $130.2 \text{ g}/\text{kg}$ ,

134.0 g/kg and 130.4 g/kg obtained by quantification of the signature peptides VGAHAGEYGAEALER (T4), MFLSFPTTK (T5) and TYFPHFDLSHGSAQVK (T6), respectively. From these data, the mean value for the mass fraction of total Hb in the JCCRM 912-2M material was calculated to be  $(131.5 \pm 5.1)$  g/kg.

**Table 2** Contributions to the expanded uncertainties with  $k=2$  for the different methods

Symbol	Quantity	Uncertainty contribution
<b>HiCN</b>		
$\epsilon^{\text{HiCN}}$	Molar extinction coefficient	44 %
$A^{\text{HiCN}}(\lambda = 540 \text{ nm})$	Decadic spectral absorbance at 540 nm	14 %
$M(\text{Hb}(\text{Fe}))$	Mean molar mass of one Hb subunit	14 %
$D$	Absorption path length	14 %
$\Phi$	Volume fraction of sample in the measurement solution	14 %
<b>AHD</b>		
$\epsilon^{\text{AHD}}$	Molar extinction coefficient	56 %
$A^{\text{AHD}}(\lambda = 574 \text{ nm})$	Decadic spectral absorbance at 574 nm	20 %
$M(\text{Hb}(\text{Fe}))$	Mean molar mass of one Hb subunit	8 %
$d$	Absorption path length	8 %
$\Phi$	Volume fraction of sample in the measurement solution	8 %
<b>ID-ICP-MS</b>		
$R_{\text{bx}}$	Measured ratio in the blend bx	46.22 %
$R_{\text{bz}}$	Measured ratio in the blend bz	22.62 %
$m_x$	Mass of the sample x in the blend bx	10.12 %
$m_{y\text{x}}$	Mass of the spike y in the blend bx	10.02 %
$f_{\text{dil}}$	Dilution factor of the sample x	3.67 %
$m_{y\text{z}}$	Mass of the spike y in the blend bz	3.28 %
$m_z$	Mass of the reference z in the blend bz	3.16 %
$\Sigma m$	Summed up uncertainty contribution of different weighed portion	0.91 %
<b>Double ID-SS-ICP-MS</b>		
$R_{\text{bz}}$	Measured ratio in the blend bz	63.2 %
$w_{z,\text{pur}}$	Purity of the reference z	27.4 %
$R_{\text{bx}}$	Measured ratio in the blend bx	6.0 %
$\Sigma m$	Summed up uncertainty contribution of different weighed portion (<0.5 %)	3.4 %
<b>Triple ID-SS-ICP-MS</b>		
$R_{\text{bz1}}$	Measured ratio in the blend bz1	55.4 %
$R_{\text{bx}}$	Measured ratio in the blend bx	33.8 %
$w_{z,\text{pur}}$	Purity of the reference z	9.3 %
$R_{\text{bz2}}$	Measured ratio in the blend bz2	0.5 %
$\Sigma m$	Summed up uncertainty contribution of different weighed portion (<0.5 %)	1.0 %
<b>IDMS</b>		
$w_{z,\text{pur}}$	Purity of the reference z as determined by amino acid analysis using IDMS	76.6 %
$w_x$	Mass fraction of Hb in sample x	23.4 %
<b>ID-Raman</b>		
$\dot{x}_{\text{bx}}$	Amount-of-substance fraction of $^{\text{nat}}\text{Hb}$ in the blend bx	39.3 %
$\dot{x}_{\text{bz}}$	Amount-of-substance fraction of $^{\text{nat}}\text{Hb}$ in the blend bz	58.9 %
$w_{z,\text{pur}}$	Purity of the reference z	0.2 %
$\Sigma m$	Summed up uncertainty contribution of different weighed portion (<0.2 %)	1.6 %

## ID-Raman

For this approach, the same HbA<sub>0</sub> reference z was used as for the ID-SS-ICP-MS and for the IDMS approach. Therefore, the same purity studies are valid for these measurements ( $w_{\text{pur}} = (0.4794 \pm 0.0034) \text{ g/g}$ ; see ID-SS-ICP-MS section).

To calculate the mass fraction  $w_x$  for the Hb reference material JCCRM 912-2M, Eq. 5 was used as a model equation to achieve the values and their corresponding uncertainties. It was determined to be  $(136.0 \pm 8.5) \text{ g/kg}$ .

By comparing the results of the purity measurements of the HbA<sub>0</sub> reference z accomplished with ICP-MS and with amino acid analysis used for ID-SS-ICP-MS, IDMS and ID-Raman, a good agreement within the uncertainties can be observed ( $(0.4794 \pm 0.0034) \text{ g/g}$  and  $(0.497 \pm 0.017) \text{ g/g}$ ). Using two different purity measurement procedures makes the ID-SS-ICP-MS and the IDMS method independent of each other.

A closer look at the uncertainty contributions related to the different methods (Table 2) reveals that one of the major contributions in each individual method is the influence of one or more measurement solutions. The uncertainties of the spectrophotometric methods depend, among other things, on the molar extinction coefficient of the AHD and HiCN complex, respectively. Both factors were taken from the literature as well as the mean molar mass of the Hb subunit. The uncertainties of all ID methods depend completely on factors which were determined directly in the laboratory. The uncertainties of the ICP-MS are very small compared to those hyphenated to an HPLC, because the isotope ratios  $R_i$  are more highly encumbered with an uncertainty than in elemental analysis. Therefore, the weighed portions have a higher impact on the stand-alone method than on the hyphenated methods. Thus, the determined purity of the spike material counts in the uncertainty budgets of the species-specific MS methods. The uncertainty of the ID-Raman method results almost entirely from the contribution due to the measurements of Hb isotopologue ratios in the blends.

## Conclusions

The aim of this study was to cross validate several higher order measurement procedures for total Hb quantification to establish traceability to the SI unit mole and to provide a powerful tool for evaluation of commercial available test kits for this important biomarker. The benefit of using various and independent methods for cross validation is that systematic errors in sample preparation and measurement can be reduced to a minimum. Therefore, two spectrophotometric techniques (HiCN and AHD) for total Hb quantification and different ID-based methods based on MS and Raman spectrometry were compared. The various methods are based on complementary procedures but aim for quantifying the same measurand (Hb

in blood). While absorbance measurements detect the chromophore group, inorganic MS detects the metal component in the protein, organic MS addresses the globin component and Raman spectrometry is sensitive to the protein structure as a whole. Systematic uncertainties of the respective final measurement values are excluded in this way. Hence, the excellent agreement found in this study can be regarded as a successful cross-validation of the different methods applied. The different ID approaches provide a tool to establish SI-traceable measurements with respect to the mole at the highest metrological level.

By comparing of spectrophotometric methods with primary measurement procedures that are based on ID, the precision and accuracy of spectrophotometric methods for total Hb concentration is demonstrated. It should be emphasized that these methods are not intended to replace the routine methods in clinical laboratories as their realization is very expensive and time consuming. On the other hand, they are known for their accuracy and precision and are thus useful to validate the routine methods. However, a statement on which of these methods is most appropriate for a national metrology institute to establish a higher order reference measurement procedure or even to generate a national standard can hardly be made at this time. With this study, it was demonstrated that SI-traceability can be achieved by applying known and proven metrological concepts for various methods but a decision in favour of a specific procedure needs to be drawn individually and depends on whether a particular technique is deeply anchored at an institute and if state-of-the-art instrumentation is available.

The realized comparison provides a route to validate SI-traceability to the mole for the HiCN-based measurement results for the determination of total Hb concentration in blood. These method is then perfectly suited as higher order reference methods to establish SI-traceability in comparison with schemes with testing laboratories. ID methods may be used to validate traceability to the SI unit mole on a regular basis, for example, via external quality assurance schemes for calibration laboratories using photometric methods.

**Acknowledgements** We thank the Stabinger GmbH for developing and providing a prototype of a high accuracy density measurement device, applicable to small sample volumes.

The research leading to these results has received funding from the European Union on the basis of Decision No. 912/2009/EC within the European Metrology Research Programme (EMRP) HLT-05 2012. The EMRP is jointly funded by the EMRP participating countries within EURAMET and the European Union.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- World Health Organisation. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. *VMNIS*. 2011; 1–6.
- Karima Z, Lyoumia S, Nicolasa G, Deybacha J-C, Gouyaa L, Puy H. Porphyrias: a 2015 update. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015;39(4):412–35.
- Bach M, et al. *Pschrymbel - Klinisches Wörterbuch (clinical glossary)*. 261 ed. Walter de Gruyter; 2007.
- Lyons TJ, Basu A. Biomarkers in diabetes: hemoglobin A1c, vascular and tissue markers. *Transl Res*. 2012;159(4):303–12.
- Mishra JP, Mishra J, Padhi RK, Mishra S, Manjareeka M. Hematological profile in neonatal jaundice. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2014;25(2):225–8.
- Kiefel V. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*. 4th ed. Berlin: Springer; 2011.
- St.Pierre M, Hofinger G. Human factors und Patientensicherheit in der Akutmedizin. 3rd ed. Berlin: Springer; 2014.
- Müller M, Geisen C, Zacharowski K, Tonn T, Seifried E. Transfusion of packed red cells—indications, triggers and adverse events. *Dtsch Arztebl Int*. 2015;112:507–18.
- Magnan MA, Mood DW. The effects of health state, hemoglobin, global symptom distress, mood disturbance, and treatment site on fatigue onset, duration, and distress in patients receiving radiation therapy. *Oncol Nurs Forum*. 2003;30(2):E33–9.
- Bundesärztekammer. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (RiLiBÄK). *Dtsch Arztebl*. 2014;111(38):1583–618.
- Zwart A, van Assendelft OW, Bull BS, England JM, Lewis SM, Zijlstra WG. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobinocyanide standard (4th edition). *J Clin Pathol*. 1996;49(4):271–4.
- Drapkin DL, Austin JH. Spectrophotometric studies: I. Spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. *J Biol Chem*. 1932;98(2):719–33.
- Lewis SM, Kumari S. Guidelines on standard operating procedures for haematology, Chapter 7: Haemoglobinometry. WHO; 1999.
- British Standard Institution. Haemoglobinocyanide (cyanmethaemoglobin) preparation as a standard for spectrometric haemoglobinometry. BS 3985:2003 Haemoglobinocyanide (cyanmethaemoglobin) preparation as a standard for spectrometric haemoglobin. 2003.
- German Standards Institution. Haematology—determination of haemoglobin concentration in blood—reference method. DIN 58931:2010 Haematology—determination of haemoglobin concentration in blood—reference method. 2010.
- Bull BS, Houwen B, Koepke JA, Simson E, van Assendelft OW. Reference and selected procedures for the quantitative determination of hemoglobin in blood; Approved standard—third edition CLSI standard H15-A3: reference and selected procedures for the quantitative determination of hemoglobin in blood (Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute). 2000.
- Lewis SM, Garvey B, Manning R, Sharp SA, Wardle J. Lauryl sulphate haemoglobin: a non-hazardous substitute for HiCN in haemoglobinometry. *Clin Lab Haematol*. 1991;13:279.
- Lema OE, Carter JY, Arube PA, Munafu CG, Wangai MW, Rees PH. Evaluation of the alkaline haematin D-575 method for haemoglobin estimation in east Africa. *Bull WHO*. 1994;72:937.
- Shah VB, Shah BS, Puranik GV. Evaluation of non-cyanide methods for hemoglobin estimation Indian. *Indian J Pathol Microbiol*. 2011;54(4):764.
- Zander R, Lang W, Wolf HU. Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemoglobin method: I. Description of the method. *Clin Chim Acta*. 1984;136:83.
- Wolf HU, Lang W, Zander R. Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemoglobin method: II. Standardisation of the method using pure chlorohaemin. *Clin Chim Acta*. 1984;136:95.
- Moharram NMM, El Aouad R, Al Busaidy S, Fabricius A, Heller S, Wood WG, et al. International collaborative assessment study of the AHD 575 method for the measurement of blood haemoglobin. *East Mediterr Health J*. 2006;12:722.
- International Organization for Standardization. 2003 In vitro diagnostic medical devices—measurement of quantities in biological samples—metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials. ISO 17511:2003 In vitro diagnostic medical devices Measurement of quantities in biological samples Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials. 2003.
- BIPM. Consultative Committee for Amount of Substances (CCQM), report of the 4th meeting. 1998.
- Rienitz O. Entwicklung chemisch analytischer Primärmethoden zur Bestimmung physiologisch relevanter Bestandteile in Humanserum: Dissertation, TU Berlin; 2001.
- Rodríguez-Gomzáles P, Marchante-Gayón JM, García-Alonso JJ, Sanz-Medel A. Isotope pattern deconvolution for internal mass bias correction in the characterisation of isotopically enriched spikes. *J Anal Atom Spectrom*. 2005;60(2):151–207.
- Bedson P. Guidelines for achieving high accuracy in isotope dilution mass spectrometry (IDMS). Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2002.
- Frank C, Rienitz O, Swart C, Schiel D. Improving species-specific IDMS: the advantages of triple IDMS. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(6):1913–9.
- Roux-Dalvai F, de Peredo AG, Simó C, Guerrier L, Bouyssie D, Zanella A, et al. Extensive analysis of the cytoplasmic proteome of human erythrocytes using the peptide ligand library technology and advanced mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2008;7:2254–69.
- Brauckmann C, Frank C, Schulze D, Kaiser P, Swart C. Preparation and characterisation of <sup>57</sup>Fe enriched hemoglobin spike material for species-specific isotope dilution mass spectrometry. *J Anal Atom Spectrom*. 2016;31:1846–57.
- Swart C. Metrology for metalloproteins— where are we now, where are we heading? *Anal Bioanal Chem*. 2013;405:5698–723.
- Brun V, Masselon C, Garin J, Dupuis A. Isotope dilution strategies for absolute quantitative proteomics. *J Proteomics*. 2009;72(5): 740–9.
- del Castillo Busto ME, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A. Accurate determination of human serum transferrin isoforms: exploring metal-specific isotope dilution analysis as a quantitative proteomic tool. *Anal Chem*. 2006;78:8218–26.
- Zakel S, Rienitz O, Güttler B, Stosch R. Double isotope dilution surface-enhanced Raman scattering as a reference procedure for the quantification of biomarkers in human serum. *Analyst*. 2011;136: 3956–61.
- Kratky O, Leopold H, Stabinger H. Dichtemessungen an Flüssigkeiten und Gasen auf 10–6 g/cm<sup>3</sup> bei 0,6cm<sup>3</sup> Präparatvolumen. *Z Angew Phys*. 1969;27:273–7.
- Braunitzer G. The molecular weight of haemoglobin erythrocytometric methods and their standardization. *T Stand Comm Proc Symp 18 9th Congr Eur Soc Haematol*. 1963;59.
- Wolf HU, Link H, Lang W. Preparation, purification and characterization of chlorohaemin. *J Biol Chem*. 1992;373:305.

38. Zijlstra WG, van Kampen EJ. Standardisation of hemoglobinometry: I. The extinction coefficient of hemiglobincyanide at 540 nm:  $\epsilon_{\text{HICN}}^{540}$ . *Clin Chim Acta*. 1960;5:719.
39. van Kampen EJ, Zijlstra WG. Standardisation of hemoglobinometry: II. The hemiglobincyanide method. *Clin Chim Acta*. 1961;6:538.
40. Arsene CG, Ohlendorf R, Burkitt W, Pritchard C, Henrion A, O'Connor G, et al. Protein quantification by isotope dilution mass spectrometry of proteolytic fragments: cleavage rate and accuracy. *Anal Chem*. 2009;80(11):4154–60.
41. Frank C, Rienitz O, Jährling R, Schiel D, Zakei S. Reference measurement procedures for the iron saturation in human transferrin based on IDMS and Raman scattering. *Metallomics*. 2012;4:1239–44.
42. BIPM. Evaluation of measurement data—guide to the expression of uncertainty in measurement. *JCGM 100:2008*.
43. BIPM. CCQM Guidance note: estimation of a consensus KCRV and associated Degrees of Equivalence. [www.bipm.org/cc/CCQM/Allowed/19/CCQM13-22\\_Consensus\\_KCRV\\_v10.pdf2013](http://www.bipm.org/cc/CCQM/Allowed/19/CCQM13-22_Consensus_KCRV_v10.pdf2013).
44. Ratel G. Evaluation of the uncertainty of the degree of equivalence. *Metrologia*. 2005;42:140–4.
45. Rienitz O, et al. Final report in CCQM-K87: mono-elemental calibration solutions. *Metrologia*. 2012;49.
46. Witt K, Wolf HU, Heuck C, Kammel M, Kummrow A, Neukammer J. Establishing traceability of photometric absorbance measurements for accurate determination of the haemoglobin concentration in blood. *Metrologia*. 2013;50(5):539–48.
47. Vogel J. In: Nelms SM, editor. *Inductively coupled plasma mass spectrometry handbook*. Oxford: Blackwell; 2005.

### **Annexe 3 : Protocole de purification de la résine CHELEX**

Le protocole appliqué pour l'étape de purification de la résine CHELEX est le suivant :

- 15 g de résine Chelex
- Mélanger dans 150 mL de 5% HNO<sub>3</sub>
- Agiter pendant 10 minutes et laisser décanter
- Répéter ce rinçage deux fois
- Rincer la résine avec de l'eau Milli Q
- Agiter et laisser décanter
- Récupérer la résine et la mettre à l'étuve pendant 10h à 100°C

### **Annexe 4 : Protocole des méthodes pour la détermination de la fraction massique d'eau**

#### - Titrage coulométrique par le système Karl Fisher

La détermination de l'eau dans un échantillon est effectuée avec le système Karl-Fischer (modèle 831 KF *Coulometer*, Metrohm, France) composé d'une électrode génératrice à diaphragme associée à un four (832 KF *Thermoprep*, Metrohm, France). Cette méthode coulométrique consiste à appliquer une différence de potentiel variable entre une électrode indicatrice et une électrode génératrice. La masse d'eau dosée est calculée à partir de la quantité de courant qui sert à produire l'iode. La procédure pour déterminer la fraction massique d'eau présente dans une matrice solide se déroule en trois étapes :

1/ Conditionnement du système,

2/ Détermination d'une valeur à blanc, qui devra être soustraite à la masse en eau dans la matrice solide,

3/ Détermination de la fraction massique d'eau dans la matrice solide.

Les déterminations de la fraction massique d'eau dans les blancs et les échantillons se font en utilisant plusieurs températures du four comprises entre 100 °C à 150 °C pour s'assurer de retrouver des valeurs similaires. Les prises d'essais d'échantillon d'étalon d'Hb sont comprises entre 5 et 10 mg.

#### - Séchage en eau d'une matrice solide au dessiccateur (sulfate de sodium anhydre, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Cette méthode consiste à éliminer les traces d'eau présente dans un échantillon en plaçant celui-ci dans un dessiccateur où un agent desséchant est présent. Cet agent doit avoir comme caractéristique de capter le plus possible les traces d'eau et d'agir rapidement. Le Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> est choisi pour être installé dans le fond du dessiccateur. Les prises d'essais d'étalon d'Hb mis au dessiccateur sont de l'ordre de 20 mg. La teneur finale de fraction massique d'eau est obtenue une fois que les pesées de l'échantillon soit constantes (environ 4 jours).



**Annexe 5 : Article de conférence sur la détermination de l'hémoglobine  
totale par dilution isotopique associée à l'ICPMS**

## Détermination de l'hémoglobine totale par dilution isotopique ICP-MS afin d'assurer la traçabilité métrologique en biochimie clinique.

Marie Palos<sup>1,2</sup>, Maria Estela Del Castillo Busto<sup>1</sup>, Florence Pannier<sup>2</sup>, Claudia Swart<sup>3</sup>, Christine Brauckman<sup>3</sup> et Paola Fiscaro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE), 1 rue Gaston Boissier, 75724 Paris Cedex 15, France, marie.palos@lne.fr, Paola.Fiscaro@lne.fr.

<sup>2</sup> Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (LCABIE), IPREM, Université de Pau et des Pays de l'Adour CNRS/UMR 5254, Hélio parc, 2 avenue du Président Angot, 64053 Pau Cedex 09, France.

<sup>3</sup> Physikalisch technische Bundesanstalt (PTB), Braunschweig, 38116, Allemagne.

**Abstract.** The main objective of this study is the development of reference measurement procedures for the determination of total haemoglobin (Hb) in blood based by ID-ICPMS. First of all, a characterization of a Hb standard is carried out via total iron analysis by double ID-ICPMS. This standard will be used as a primary calibration solution in order to ensure the traceability of the measurement results. The validation of this method was conducted by the analysis of the CRM JCCRM 912-1 (ReCCS) certified in total Hb and taking into account the stoichiometry of the molecule (4Fe(Hb)). Furthermore, elemental speciation strategies are carried out through the use of hybrid techniques (e.g. HPLC-ICPMS). The separation of Hb is performed by liquid chromatography using cation or anion exchange columns. The detection is conducted by measuring the iron contained in the haeme-group of the protein, using a sector field ICPMS at medium resolution. In order to develop a primary reference method, isotope dilution analysis is carried out for the determination of total Hb by species-specific mode. For that purpose, the synthesis of an isotopically labelled standard Hb (Hb-<sup>57</sup>Fe) is performed. This ID strategy is compared with the species-unspecific mode in terms of accuracy and precision.

### 1. Contexte de l'étude

L'hémoglobine (Hb) est une protéine contenant du fer présente dans les globules rouges chez les mammifères et d'autres animaux. Elle est responsable du transport et du stockage de l'oxygène. Sa structure est composée de deux chaînes  $\alpha$  et de deux chaînes  $\beta$  ainsi que de quatre groupement hème. Sa masse moléculaire est de 64 458 Da (anhydre), avec une fraction massique d'Hb-Fe de 0.00347 [1]. Il existe plusieurs types d'hémoglobine chez l'adulte : HbA (environ 97%,  $\alpha_2\beta_2$ ), HbA<sub>2</sub> (2,2% à 3,2%,  $\alpha_2\delta_2$ ) et une proportion d'HbF (<1%,  $\alpha_2\gamma_2$ ) [2]. L'hémoglobine est impliquée dans de nombreuses maladies cliniques, comme la leucémie, l'anémie et les maladies cardiaques. L'hémoglobine totale représente le principal biomarqueur pour le diagnostic de l'anémie [3]. A l'heure actuelle, aucune méthode de référence primaire n'existe pour la détermination de l'Hb. Pour compenser ce manque, l'ICSH (International Council for Standardization in Haematology) a établi la méthode HiCN (cyanohémiglobine) comme méthode de référence internationale consensuelle [4]. D'autres méthodes de référence peuvent néanmoins être proposées si elles ont préalablement été comparées aux résultats obtenus avec la méthode de référence.

La méthode HiCN est basée sur une détermination par spectrophotométrie de la cyanohémiglobine. Les dérivés de l'Hb sont convertis en HiCN après l'ajout de cyanure de potassium (KCN). Une gamme d'étalonnage en HiCN comprise entre 550 et 850 mg.L<sup>-1</sup> est utilisée. La mesure spectrophotométrique est effectuée à une longueur d'onde

de 540 nm. La détermination de la concentration de l'Hb se fait à partir de l'absorbance moléculaire. D'un point de vue métrologique, la méthode HiCN présente l'inconvénient d'utiliser un étalon international consensuel [5] qui ne respecte pas les exigences d'un étalon primaire. Cet étalon ICSH HiCN est préparé à partir de sang bovin lysé converti en HiCN, purifié, et certifié via une valeur consensuelle par des laboratoires de référence internationaux par spectrophotométrie d'absorption, qui n'est pas une méthode primaire. Ensuite, aucune information n'est disponible concernant les étalons utilisés et selon toute vraisemblance, les valeurs associées à ces étalons ne sont pas traçable aux unités SI. Par ailleurs, cette méthode présente l'inconvénient d'utiliser comme réactif de conversion le KCN, qui est interdit dans plusieurs pays due à sa toxicité. Enfin, il a été reporté une conversion incomplète des dérivés de l'Hb, ce qui est susceptible d'entraîner un biais négatif.

Notre objectif est donc de développer une méthode primaire pour la détermination de l'hémoglobine totale. En vue d'assurer la traçabilité métrologique, la dilution isotopique associée à la spectrométrie de masse à plasma induit (DI-ICP-MS) est idéale car elle est reconnue par le CCQM (Consultative committee for the metrology in chemistry) comme méthode potentiellement primaire. La majorité des études sur la détermination des métalloprotéines par ICP-MS ont employé des stratégies d'analyse de spéciation élémentaire [6]. Heumann et ses collaborateurs [7] ont établi les bases pour réaliser la dilution isotopique (DI) pour l'analyse de spéciation par

des techniques chromatographiques couplées à l'ICP-MS. Dans ce cas, l'ajout de l'étalon marqué peut être réalisé de deux manières: (a) avant les processus de séparation (mode *spécifique*) ou (b) à la sortie de la séparation d'intérêt doivent être parfaitement connues afin de choisir l'étalon marqué approprié. Une fois que l'équilibre entre l'étalon marqué et l'échantillon est atteint, les pertes ou les extractions non quantitatives seront corrigées. Ainsi, l'étalon marqué utilisé doit être analysé parallèlement aux échantillons afin de déterminer sa concentration exacte ainsi que son abondance isotopique. Dans ce cas, le mode *spécifique* fournit tous les avantages de la DI classique. Par contre, à l'heure actuelle il n'y a pas d'étalons marqués de métalloprotéines disponibles commercialement et il est donc nécessaire de les synthétiser. Ceci implique: (i) une connaissance de la stœchiométrie entre le métal et la protéine, (ii) une haute résolution dans la séparation des métalloprotéines, (iii) l'absence d'échange au niveau de la composition isotopique entre les espèces et (iv) d'absence de pertes ou de contaminations du métal d'intérêt avant d'ajouter l'étalon marqué [8]. En revanche, il existe un grand nombre d'applications relatives au dosage de métalloprotéines qui reposent sur le mode *non spécifique* en raison de sa mise en place plus simple. Dans le mode *non spécifique* ou *post-colonne*, l'ajout de l'étalon marqué est réalisé après la séparation complète des espèces de l'échantillon. Dans ce cas, l'étalon marqué est ajouté dans une forme chimique inorganique qui peut être différente des formes chimiques présentes dans l'échantillon. Ce mode est spécialement utile quand la structure et la composition de la molécule à analyser ne sont pas connues exactement et aussi quand l'étalon marqué n'est pas disponible ou difficile à synthétiser. Par contre, des pertes possibles ou des extractions non quantitatives avant l'ajout de l'étalon marqué (avant la séparation) ne seront pas corrigées.

L'objectif principal de cette étude est le développement d'une méthode de référence pour la détermination de l'Hb totale. Dans un premier temps, le développement d'une méthode basée sur la détermination de l'Hb à partir de sa teneur en Fe par simple minéralisation de l'échantillon à travers la DI-ICP-MS est effectuée. Puis, une méthode d'analyse de spéciation élémentaire par HPLC-ICP-MS est mise en place selon deux modes de dilution isotopique. Enfin, une caractérisation d'un étalon d'Hb totale est effectuée afin de l'utiliser comme étalon primaire.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Réactifs et matériels

L'étalon d'hémoglobine totale (H7379) utilisé se présente sous forme lyophilisée et provient de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Etats Unis). Le matériau de référence certifié en Hb total, servant pour la validation de la méthode, est fourni par ReCCS dans trois niveaux de concentrations (JCCRM 912-1 L,M,H; Japon). La préparation des étalons se fait à partir d'un matériau de référence certifié de haute pureté pour le fer, BNM-001 (LNE, (99,995 ± 0,004) % (k=2)). La préparation de la solution en étalon marqué  $^{57}\text{Fe}$  se fait à partir d'un métal enrichi provenant

chromatographique (mode *non spécifique* ou *post-colonne*). Dans le mode *spécifique*, l'étalon marqué est sous forme chimique équivalente à l'espèce à analyser. Par conséquent, la composition et la structure de l'espèce de chez Eurisotop (France). Les réactifs utilisés pour réaliser les phases mobiles sont: Tris(hydroxyméthyl)aminométhane, 99,9%; acétate d'ammonium pour la biologie moléculaire ( $\geq 98\%$ ); azoture de sodium,  $\text{NaN}_3$  (ReagentPlus<sup>®</sup>,  $\geq 99,5\%$ ) de Sigma et l'acide acétique glacial, HAC (100%, Merck, Allemagne). Pour effectuer un tampon citrate à pH 4,0, est utilisé: citrate de sodium (Biology grade, Calbiochem, France) et acide citrique anhydre (ultra  $\geq 99,5\%$ , Sigma). L'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) est de haute qualité (67-69%, Fisher chemical, Canada). L'eau ultrapure de 18,2 M $\Omega$ .cm est obtenue en utilisant le système Milli-Q<sup>TM</sup> (Millipore SAS, France). L'ultrafiltration est réalisée dans des tubes: Amicon Ultra-0,5mL 3K, Ultracel – 3K Membrane, regenerated cellulose 3,000 MWCO (Sigma). Les différents réactifs utilisés pour la digestion sont: trypsine (Trypsin sequence grade modified, Roche, France); dithiothreitol (DTT) et iodoacétamide de Sigma.

### 2.2. Instrumentation

Le système micro-ondes utilisé est le Discover SP-D (CEM, France). Le système Karl Fisher employé est le modèle 831 Karl Fisher Coulometer (Metrohm, France). L'ICP-MS utilisé pour effectuer les analyses est un ICP-MS haute résolution ELEMENT XR<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific, Allemagne). La séparation chromatographique se fait à l'aide de l'HPLC PDA Surveyor (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis). La colonne utilisée est une colonne échangeuse d'anions Source<sup>TM</sup> 15Q 4,6/100 PE (4,6x100 mm, 15 $\mu\text{m}$ , GE Healthcare, Suède).

### 2.3. Procédures

#### 2.3.1. Détermination de l'Hb par double (Fe)-DI-ICP-MS

Une quantité en échantillon et en étalon marqué ( $^{57}\text{Fe}$ ), d'environ 0,15 g à 0,30 g afin d'obtenir un rapport isotopique égal à 1 ( $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ ) est mise en présence de 2 mL d' $\text{HNO}_3$  pour subir une digestion acide assistée d'un système de micro-ondes. Les résidus de minéralisation sont ensuite repris dans 50 mL d'eau Milli-Q<sup>TM</sup> afin d'obtenir une concentration finale en fer comprise entre 5 ng.g<sup>-1</sup> et 15 ng.g<sup>-1</sup>. Les échantillons obtenus sont analysés par ICP-MS. Le tableau 1 présente les conditions opératoires utilisées.

Tableau 1. Conditions opératoires de l'ICP-MS

ICP-MS	ELEMENT XR <sup>TM</sup> HR ICP-MS
Puissance	1 550 W
Débit gaz auxiliaire	0,8 L.min <sup>-1</sup>
Débit gaz vecteur	1,06 L.min <sup>-1</sup>
Résolution	Haute résolution ( $\Delta m/m = 10000$ )
Mode d'acquisition	Intensités
Isotopes mesurés	$^{56}\text{Fe}$ , $^{57}\text{Fe}$
Temps d'intégration/point	0,05 s
Nombre de points/pic	20
Nombre de balayage	15
Répétition	5

Afin de mettre en place une double DI pour assurer le caractère primaire de la méthode, il est nécessaire de faire simultanément une caractérisation de l'étalon marqué en <sup>57</sup>Fe par dilution isotopique inverse. Pour cela, une quantité identique d'étalon marqué ainsi que d'un étalon de haute pureté en Fe est mise en solution acidifiée.

De plus, pour vérifier la présence ou l'absence de fer libre dans notre échantillon, une étape d'ultrafiltration avec un filtre à 3 kDa est réalisée. L'échantillon est pesé avec précision dans les tubes d'ultrafiltration et centrifugé à 14000 g, 4°C pendant 30 min. Après la centrifugation, chaque partie du filtre (fraction <3kDa et fraction >3kDa) est pesée avec précision. Les cycles de centrifugation sont répétés jusqu'à ce que les pesées soient constantes pour chaque fraction. Les différentes fractions sont ensuite analysées par double DI-ICP-MS selon le protocole décrit préalablement.

### 2.3.2. Détermination de l'Hb par HPLC-ICP-MS

Cette approche repose sur le couplage de l'HPLC avec l'ICP-MS. La quantification de l'Hb est réalisée par une chromatographie à échange d'anions utilisant la colonne Source™ 15Q associé à un gradient d'ammonium acétate de 0-500 mM sur 21 min (voir tableau 2) couplée à l'ICP-MS. Les conditions instrumentales et opératoires de l'HPLC sont répertoriées dans le tableau 2. Les conditions instrumentales de l'ICP-MS sont identiques à celles présentées dans le tableau 1, mis à part le mode d'acquisition (analyse chromatographique).

**Tableau 2.** Conditions opératoires de l'HPLC

Colonne	Source™ 15Q 4.6/100 PE
Phase A	10 mM Tris-Hac, pH 8,0
Phase B	A + 500 mM Acétate d'ammonium, pH 8,0
Débit	1,0 L.min <sup>-1</sup>
Volume injection	50 µL
Gradient	0-2 min, 100% A 2-9 min, 100% A à 100% B 9-16 min, 100% B 16-21 min, 100% A

### 2.3.3. Post-colonne DI-HPLC-ICP-MS

Pour l'analyse par post-colonne dilution isotopique, une solution d'étalon marqué en <sup>57</sup>Fe (50-100 ng.g<sup>-1</sup> Fe dans 25 mM citrate de sodium/acide citrique, pH 4,0) est ajouté en continu (flux 0,1 mL.min<sup>-1</sup>) avec une pompe péristaltique après la séparation chromatographique, afin d'obtenir un signal stable. Les paramètres instrumentaux sont présentés dans les tableaux 1 et 2. Pour la quantification de la solution d'étalon marqué en <sup>57</sup>Fe, une dilution isotopique inverse est effectuée en utilisant un étalon de haute pureté en Fe naturel.

### 2.3.4. Identification de l'Hb par nanoLC-MS/MS

Une digestion en solution par la trypsine est effectuée pour la caractérisation protéique d'étalon de l'Hb. Une solution de NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> à 25 mmol.L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> à 5 mmol.L<sup>-1</sup> et trypsine (à 6,25 ng.µl<sup>-1</sup>) est ajoutée à l'échantillon, après réduction au DTT à 10 mmol.L<sup>-1</sup> et alkylation par iodoacétamide à 55 mmol.L<sup>-1</sup>. La digestion s'effectue à 37°C pendant 16h. Le mélange peptidique est ensuite analysé directement en solution. La séparation est réalisée

sur une colonne C18 (15cm×75µm id) avec une chaîne nano-chromatographique Ultimate 3000 (Thermo scientific / Dionex). La détection est effectuée à l'aide d'un spectromètre de masse Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific). L'acquisition se fait sur une gamme m/z de 400 à 2000. Les recherches de protéines ont été réalisées comme suit:

-significance threshold: 0.01%  
-ion score: 10  
-filtres PD: rank 1, high confidence peptides; 2 peptides par protéines

-area: calculée par PD avec les 3 aires maximums

-empAI: calculé par Mascot

Le mode d'identification a été réalisé avec des critères de stringence élevé. Deux modes de quantification relative ont été réalisés afin de donner une idée grossière de l'abondance des protéines contaminants dans l'échantillon.

## 3. Résultats

### 3.1. Quantification de l'Hb par (Fe)-DI-ICP-MS

La validation de la méthode développée est réalisée par l'utilisation du matériau de référence certifié JCCRM 912-1 (ReCCS) certifié en Hb totale par la méthode de référence (trois niveaux de concentrations). La concentration d'Hb à travers sa teneur en fer est déterminée par double DI-ICP-MS en tenant compte de la stœchiométrie de la molécule (Hb(4Fe)). La préparation des échantillons doit tenir compte de la mise en œuvre de la dilution isotopique. L'étalon marqué doit être ajouté à l'échantillon le plus tôt possible lors du traitement. Toutes les étapes de préparation sont réalisées par gravimétrie jusqu'à l'ajout de l'étalon marqué (<sup>57</sup>Fe). De plus, la solution d'étalon marqué en <sup>57</sup>Fe est caractérisée en Fe en réalisant une dilution isotopique inverse et caractérisée en abondance isotopique: abondance <sup>56</sup>Fe = (1,39 ± 0,36 %) et abondance <sup>57</sup>Fe = (96,63 ± 0,40 %) avec k=2, sur une période de six mois. Les valeurs obtenues sont en accord avec les valeurs certifiées (voir le tableau 3).

**Tableau 3.** Détermination de l'Hb dans le MRC JCCRM 912 par double (Fe)-DI-ICPMS

	Fe mg.L <sup>-1</sup> (k=2)	Hb g.L <sup>-1</sup> (k=2)	Hb (certifiée) g.L <sup>-1</sup> (k=2)	E <sub>N</sub>
JCCRM 912-1L	287,2 ± 6,8	82,9 ± 2,0	80,7 ± 1,0	1,97 < 2
JCCRM 912-1M	474,4 ± 13,6	136,9 ± 3,9	136,7 ± 1,6	0,10 < 2
JCCRM 912-1H	628,6 ± 18,9	181,3 ± 5,4	185,7 ± 2,2	1,50 < 2

De plus, afin de vérifier la présence de fer libre (fer non lié à l'Hb) dans le matériau de référence certifié, la solution non traitée ainsi que les deux fractions obtenues après ultrafiltration sont analysées par double DI-ICP-MS. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

**Tableau 4.** Détermination de l'Hb dans les différentes fractions du MRC par double DI-ICPMS

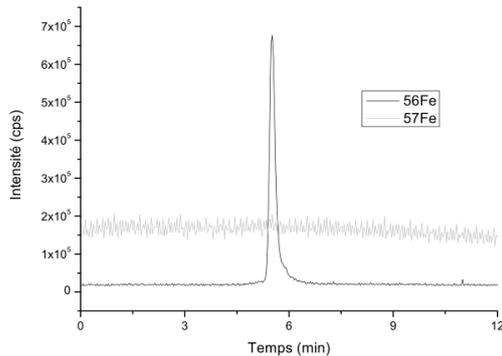
JCCRM 912-1L (n=4)	Fe mg.L <sup>-1</sup> (k=2)	Hb g.L <sup>-1</sup> (k=2)	Hb (certifiée) g.L <sup>-1</sup> (k=2)
Non traitée	287,2 ± 6,8	82,9 ± 2,0	80,7 ± 1,0
Fraction >3kDa	297 ± 15	85,7 ± 4,3	
Fraction <3kDa	< 1,0	< 0,2	

La valeur déterminée pour la fraction > 3kDa est en bonne concordance avec la valeur déterminée pour la solution non traitée ainsi que la valeur certifiée. Dans la fraction < 3 kDa, la valeur de Fe mesurée est inférieure à 1,0 mg.L<sup>-1</sup>. Au regard de ces résultats, il n'y a pas de fer libre dans le matériau de référence certifié soulignant le fait que le fer quantifié provient de l'Hb. En outre, la procédure d'ultrafiltration a permis d'éliminer de manière sélective le fer libre ainsi que de récupérer la totalité de l'échantillon après le traitement.

Cette méthode est une approche prometteuse pour assurer une justesse des résultats avec de faibles incertitudes (inférieures à 4%). Cependant, cette méthode est seulement applicable s'il n'y a pas de présence de fer libre ou de protéines contenant du fer autre que l'Hb dans notre échantillon. C'est pour cette raison qu'il est nécessaire de développer une méthode d'analyse de spéciation.

### 3.2. Quantification de l'Hb par HPLC-ICP-MS

L'approche développée dans cette partie est le mode *non spécifique* de la dilution isotopique par HPLC-ICP-MS. L'Hb est séparée par chromatographie échangeuse d'anions grâce à la présence de résidus d'acides aminés chargés. La figure 1 représente le chromatogramme d'intensités obtenue après analyse du matériau certifié JCCRM 912-1L à une concentration de 0,051 g.L<sup>-1</sup> Hb.



**Figure 1.** Chromatogramme d'intensités du MRC JCCRM 912-1L à 0,051 g.L<sup>-1</sup> Hb utilisant post-colonne DI-HPLC-ICP-MS.

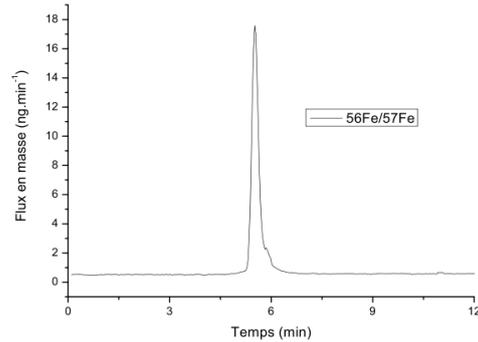
Afin d'obtenir la concentration en Hb, le chromatogramme d'intensités (cps) est transformé en chromatogramme de flux en masse (ng.min<sup>-1</sup> vs min) (figure 2) après l'application de l'équation 1 de la dilution isotopique post-colonne.

$$MF_{\text{échantillon}} = w_{sp} \cdot f_{sp} \cdot \frac{M_{\text{éch}}}{M_{sp}} \cdot \frac{(R_{A/B} \cdot k \cdot B_{sp} - A_{sp})}{(A_{\text{éch}} - R_{A/B} \cdot k \cdot B_{\text{éch}})} \quad (1)$$

- MF<sub>échantillon</sub> (µg Fe): flux en masse de l'élément,
- f<sub>sp</sub> (g.min<sup>-1</sup>): flux de la solution d'étalon marqué,
- w<sub>sp</sub> (µg.g<sup>-1</sup> Fe): concentration massique de l'élément dans la solution de l'étalon marqué,
- M<sub>éch</sub> (g.mol<sup>-1</sup>): masse atomique de l'élément dans l'échantillon,
- M<sub>sp</sub> (g.mol<sup>-1</sup>): masse atomique de l'élément dans l'étalon marqué,
- A<sub>sch</sub>(%): abondance naturelle de l'isotope A dans l'étalon primaire,
- B<sub>sch</sub>(%): abondance naturelle de l'isotope B dans l'étalon primaire,
- A<sub>sp</sub>(%): abondance de l'isotope A dans l'étalon marqué,
- B<sub>sp</sub>(%): abondance de l'isotope B dans l'étalon marqué,

- R<sub>A/B</sub> (-): rapport isotopique 56/57 du mélange,
- k (-): facteur de correction de dérive et de biais en masse

Le rapport isotopique R<sub>A/B</sub> (R<sub>56/57</sub>) est calculé et corrigé par un biais en masse utilisant un modèle linéaire. Comme le facteur de biais en masse (k) évolue légèrement dans le temps, une méthode de correction entre chaque série est appliquée. Ainsi, une solution de fer naturel (50 ng.g<sup>-1</sup> Fe) ou une solution étalon d'Hb est injectée entre chaque échantillon. La moyenne du biais en masse obtenue est de (1,039 ± 0,039) par unité de masse (pour une durée de 8h d'analyse).



**Figure 2.** Chromatogramme de flux en masse du MRC JCCRM 912-1L à 0,051 g.L<sup>-1</sup> Hb.

La fraction massique en fer dans l'échantillon est obtenue par intégration de l'aire du pic (à l'aide du logiciel Origin) divisée par la masse injectée (m<sub>injectée</sub>, g). Finalement, la concentration en Hb (C<sub>échantillon</sub>, g.L<sup>-1</sup>) dans l'échantillon est calculé à partir de l'équation 2 qui prend en compte les dilutions initiales de l'échantillon, la masse volumique de l'échantillon et la stœchiométrie de la molécule (Hb(4Fe)).

$$C_{\text{échantillon}} = \frac{\text{Aire}}{m_{\text{injectée}}} \cdot F_{\text{dilution}} \cdot \rho_{\text{échantillon}} \cdot \frac{M_{\text{Hb}}}{M_{\text{Fe}}} \cdot \frac{1}{4} \quad (2)$$

- C<sub>échantillon</sub> (g.L<sup>-1</sup> Hb): concentration en Hb de l'échantillon,
- m<sub>injectée</sub> (g): masse injectée,
- F<sub>dilution</sub>: facteur de dilution de l'échantillon,
- ρ<sub>échantillon</sub> (g.mL<sup>-1</sup>): masse volumique de l'échantillon,
- M<sub>Hb</sub> (Da): poids moléculaire de l'Hb = 64 458
- M<sub>Fe</sub> (amu): masse atomique du Fe = 55,8

De plus, différents paramètres sont évalués et déterminés:  
 -le flux de l'étalon marqué est étalonné par pesée (avant et après chaque analyse): (0,1069 ± 0,0015) g.min<sup>-1</sup>;  
 -la masse injectée est étalonnée par pesée: (0,04946 ± 0,00064) g;  
 -la détermination du fer dans la solution d'étalon marqué est quantifiée par DI inverse-ICP-MS: (0,0441 ± 0,0026) µg.g<sup>-1</sup> Fe.  
 Les analyses ont été effectuées sur deux niveaux de concentration du matériau certifié. Les résultats sont répertoriés dans le tableau 5.

**Tableau 5.** Détermination de l'Hb dans le MRC par post-colonne HPLC-DI-ICPMS

Fe mg.L <sup>-1</sup> (k=2)	Hb g.L <sup>-1</sup> (k=2)	Hb (certifiée) g.L <sup>-1</sup> (k=2)	Biais

JCCRM 912-1L (n=9)	0,191 ± 0,014	55,2 ± 4,1	80,7 ± 1,0	-32%
JCCRM 912-1M (n=3)	0,431 ± 0,013	124,4 ± 3,6	136,7 ± 1,6	-8%

Un biais de 32% est obtenu pour le premier niveau alors qu'une erreur de 8% est déterminée pour le deuxième niveau de concentration du MRC. Cela s'explique par un recouvrement incomplet du complexe (Hb(4Fe)).

Ces résultats mettent en avant la nécessité de développer une méthode de dilution isotopique *spécifique* HPLC-ICP-MS permettant de compenser et de corriger les pertes ou transformations durant la méthode analytique. Cette méthode consiste à quantifier l'Hb en utilisant un étalon marqué en <sup>57</sup>Fe d'Hb. Or, il n'existe pas d'étalon marqué en <sup>57</sup>Fe d'Hb. Il est donc nécessaire de synthétiser cet étalon marqué. Pour cela, il nous faut un étalon d'Hb totale dont on a connaissance de sa fraction massique afin d'assurer la traçabilité. Une étape de caractérisation de l'étalon d'Hb a donc été effectuée.

### 3.3. Caractérisation d'un étalon d'Hb totale

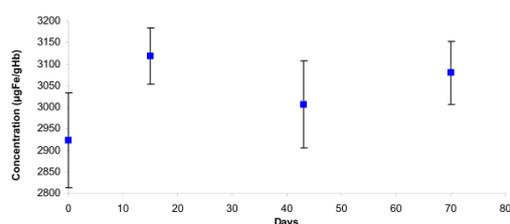
Une solution d'environ 1 g.L<sup>-1</sup> Hb est préparée dans 10 mM Tris-HAc à pH 8,0. Dans un premier temps, l'étalon d'Hb a été caractérisé en Fe par double DI-ICP-MS. Dans le tableau 6 est résumé les concentrations massiques de fer obtenues pour la solution d'Hb non traitée et pour les différentes fractions.

**Tableau 6.** Détermination du fer dans l'étalon d'Hb par double DI-ICPMS

Etalon Hb H7379	µg Fe/ g Hb (k=2)
Non traitée	3009 ± 109
Fraction >3kDa	3032 ± 89
Fraction <3kDa	75

La concentration en fer déterminée dans la solution d'étalon non traitée (3009 ± 109 µg Fe/ g Hb) est comparable à la valeur obtenue pour la fraction >3kDa (3032 ± 89 µg Fe/g Hb). Au regard de ces résultats, l'absence de fer libre dans la solution étalon d'Hb est prouvée.

En parallèle, une étude est réalisée pour s'assurer de la stabilité de la teneur en fer dans la solution étalon à -20°C. Comme on peut le remarquer sur la figure 3, on n'observe pas de différence significative de la concentration en fer sur une durée de 2 mois à -20°C. Cependant, il reste préférable de caractériser la solution étalon d'Hb en fer avant utilisation pour assurer la traçabilité.



**Figure 3.** Stabilité de la fraction >3kDa de la solution étalon d'Hb durant 2 mois.

Puis, la pureté de cette solution étalon a tout d'abord été déterminée en prenant en compte la quantité d'eau obtenue par les méthodes de Karl-Fisher et de sulfate de sodium comme agent de séchage. La pureté déterminée expérimentalement est de (92,00 ± 0,20) % (k=2, n=4). Enfin, l'analyse de la solution étalon après digestion trypsine par nanoLC-MS/MS a permis de faire une caractérisation protéique où l'anhydrase carbonique est présente à 1 %, ce qui est l'impureté majoritaire. Ces différentes impuretés représentent environ 2% de l'échantillon donc l'Hb reste largement majoritaire.

## 4. Conclusion

Le développement d'une méthode associant la double dilution isotopique à l'ICP-MS pour la détermination de l'Hb à partir de sa teneur en Fe a été validée par l'analyse d'un matériau de référence certifié en Hb (JCCRM 912-1) avec une incertitude inférieure à 4%.

Puis, la détermination de l'Hb par post-colonne-DI-HPLC-ICP-MS a montré des résultats prometteurs. Cependant, les écarts observés montrent la nécessité de développer le mode *spécifique* par DI-HPLC-ICP-MS. La mise en œuvre du mode *spécifique* nécessite la synthèse du spike d'Hb marqué en <sup>57</sup>Fe qui est en cours de réalisation. La première étape a été de caractériser l'étalon d'Hb qui est utilisé pour la synthèse. Une évaluation de sa pureté, en tenant compte de la teneur en eau ainsi que de la présence d'autres protéines, amène à une pureté d'environ 90%. De plus, une caractérisation en fer de l'étalon est réalisée en ayant au préalable vérifier l'absence de fer libre dans l'étalon d'Hb qui sera utilisé comme étalon primaire afin d'assurer la traçabilité.

## Références

- International committee for standardization in haematology, J. Clin. Pathol., **31**, 139-143 (1978).
- M.E. Del Castillo Busto, M. Montes-Bayón, A. Sanz-Medel, Analytica Chimica Acta, **634**, 1-14 (2009).
- J.T. Cao, H. Wang, Y.H. Chen, Y.M. Liu, Spectroscopy and spectral analysis, **34**, 241-245 (2014).
- International committee for standardization in haematology, J. Clin. Pathol., **49**, 271-274 (1996).
- B.H. Davis, B. Jungerius, Int. J. Lab. Hematol. **32**, 139-141 (2010).
- A. Sanz-Medel, Anal. Bioanal. Chem. **391**, 885-894 (2008).
- K.G. Heumann, Int. J. Mass Spectrom. Ion Process, **118/119**, 575-592 (1992).
- C. Swart, Anal Bioanal Chem **405**, 5697-5723 (2013).

- Annexes 6 : Présentations sous forme d'affiche :**
- **Spectr'atom 2014**
  - **Congrès International de Métrologie 2015**

# DÉTERMINATION DE MÉTALLOPROTÉINES PAR DILUTION ISOTOPIQUE ASSOCIÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE À PLASMA INDUIT (DI-ICPMS) AFIN D'ASSURER LA TRAÇABILITÉ MÉTROLOGIQUE EN BIOCHIMIE CLINIQUE



M. Palos<sup>1</sup>, ME. del Castillo Busto<sup>1</sup>, F. Pannier<sup>2</sup> et P. Fiscicaro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire National de Métrologie et d'Essais (LNE), 1 rue Gaston Boissier, 75724 Paris Cedex 15, FRANCE. e-mail: [marie.palos@lne.fr](mailto:marie.palos@lne.fr)

<sup>2</sup>Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (LCABIE), IPREM, Université de Pau et des Pays de l'Adour/CNRS UMR 5254, Héloparc, 2 avenue du président Angot, 64053 Pau Cedex 9, France.

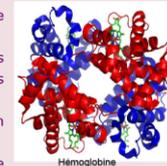


## INTRODUCTION

Les **métalloprotéines**, représentant environ 30% de l'ensemble du protéome, sont impliquées dans un grand nombre de processus biologiques. Elles jouent aussi un rôle très important dans le diagnostic médical. Par exemple, l'hémoglobine totale, protéine contenant des atomes de fer, est considérée comme le biomarqueur le plus important permettant de diagnostiquer l'anémie. Le principal objectif de ce travail est de développer une **méthode primaire de référence** afin d'analyser l'hémoglobine (Hb) dans des échantillons sanguins et d'améliorer la qualité des résultats de mesures d'échantillons de patients obtenus dans des laboratoires cliniques.

Dans une première approche, le fer total sera analysé dans un matériau certifié en hémoglobine totale (JCCRM 912-1) par dilution isotopique associée à la spectrométrie de masse à plasma induit (DI-ICP-MS).

Dans une seconde approche, la séparation de l'hémoglobine sera réalisée par chromatographie liquide (HPLC), en utilisant une colonne à échange de cations (Mono S<sup>TM</sup> 5/50 GL, GE Healthcare). La détection est effectuée par mesure du Fe contenu dans le groupe hème de la protéine, en utilisant la spectrométrie de masse à plasma induit (ICP-MS). Parallèlement, des mesures par VIS sont faites à 415nm (longueur d'onde caractéristique du groupe hème). Les deux méthodes seront comparées.

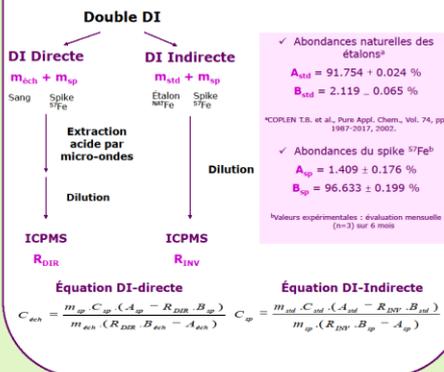


1 mole Hb → 4 atomes de Fe

## ANALYSE DU FER DANS LE SANG

### PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

**Fig. 1 : Détermination du Fe total contenu dans le sang par DI-ICPMS.** Les échantillons de sang, contenant du spike <sup>57</sup>Fe, ont subi une minéralisation. L'extrait obtenu a été analysé par ICPMS (DI-Directe). La concentration du spike <sup>57</sup>Fe a été calculée par DI-Inverse.



### QUANTIFICATION DU FER DANS LE SANG

⇒ Matériau de contrôle en fer dans du sang humain (Seronorm)

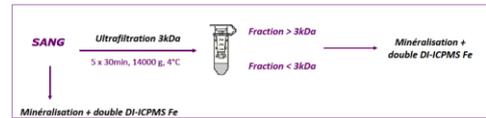
**Table 1 : Concentration moyenne en Fe obtenue dans le standard de contrôle de qualité.** L'échantillon a subi une minéralisation puis le Fe a été déterminé par Double-DI-ICPMS

	[Total Fe] Valeur certifiée	[Total Fe] Valeur obtenue	$E_N$
SERONORM (n=4)	305 ± 33 g.L <sup>-1</sup>	290 ± 2 mg.L <sup>-1</sup>	0.456 < 2

$$E_N = \frac{|\gamma - \gamma_{\text{ref}}|}{\sqrt{u_{\gamma}^2 + u_{\gamma_{\text{ref}}}^2}}$$

⇒ Matériau de référence certifié (MRC) en hémoglobine totale dans le sang humain (JCCRM 912)

**Fig. 2 : Schéma de l'ultrafiltration pour la quantification du Fe.** L'échantillon est ultrafiltré à 3kDa afin de séparer le Fe libre possible. Le sang, non traité ainsi que les différentes fractions ont subi une minéralisation. Le Fe extrait a été déterminé par Double-DI-ICPMS.



**Table 2 : Concentrations moyennes en Fe et Hb obtenues dans le matériau certifié.**

	[Total Fe] Valeur certifiée	[Total Hb]	$E_N$	[Total Hb] Valeur certifiée
MRC_Sans traitement (n=4)	288.9 ± 6.8 mg.L <sup>-1</sup>	82.7 ± 2.0 g.L <sup>-1</sup>	0.906 < 2	-
MRC_Fraction >3kDa (n=4)	303.5 ± 15.1 mg.L <sup>-1</sup>	85.6 ± 4.4 g.L <sup>-1</sup>	1.103 < 2	80.7 ± 1.0 g.L <sup>-1</sup>
MRC_Fraction <3kDa (n=4)	<1 mg.L <sup>-1</sup>	<0.2 g.L <sup>-1</sup>	-	-

Pas de présence de Fe libre dans le MRC  
 ↓  
**MRC\_Sans traitement = MRC\_Fraction >3kDa**

Les incertitudes ont été calculées à partir du logiciel Wincert V.3.11.2002.0115 (Implex, France, développé par LNE).

## DÉTERMINATION DE L'HÉMOGLOBINE TOTALE

⇒ Conditions expérimentales

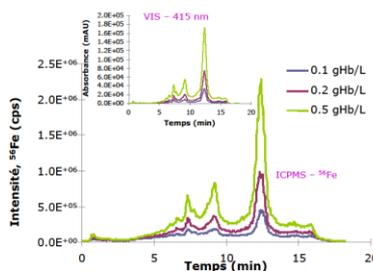
**Table 3 : Conditions opératoires en HPLC et ICPMS.** La séparation de l'hémoglobine est réalisée à l'aide d'une colonne échangeuse d'ions associée à la HPLC. La détection se fait par VIS et par ICPMS.

Colonne: Mono S<sup>TM</sup> 5/50 GL (5x50 mm, GE Healthcare)  
 Pré-colonne: 50% résine CHELEX, 50 % Silice C<sub>18</sub>  
 Phases mobiles:  
 (A) 10 mM Acide malonique + 0.2 g/L NaNa<sub>3</sub>  
 (B) A + 300 mM Acétate d'ammonium  
 pH 5.7  
 Gradient: 0-4 min, 60% B  
 6-8 min, 75% B  
 10-13 min, 100% B  
 Flux: 1 mL min<sup>-1</sup>  
 Volume d'injection: 50 µL  
 Détection VIS:  
 Instrument : Surveyor LC pump (Thermo Finnigan)  
 $\lambda = 415 \text{ nm}$   
 Détection ICPMS:  
 Instrument : Element XR (Thermo Fisher Scientific)  
 Isotopes mesurés : <sup>56</sup>Fe, <sup>57</sup>Fe  
 Résolution : 4500 (MR)  
 Flux échantillon : 1.070 L.min<sup>-1</sup>

⇒ Etalon primaire

- Etalon utilisé : Hemoglobin human lyophilized powder (H7379, Sigma Aldrich)
- Pureté expérimentale : 92% (évaluation à partir de l'extrait sec)

**Fig. 3 : Chromatogrammes d'hémoglobine totale obtenus par HPLC-ICPMS et HPLC-VIS.**

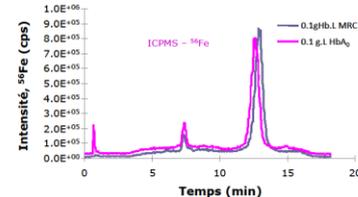


**Table 4 : Paramètres évalués par HPLC-ICPMS et HPLC-VIS**

Paramètres	ICPMS, <sup>56</sup> Fe	VIS, 415nm
Gamme de travail	0.1 à 0.5 gHb.L <sup>-1</sup>	
Linéarité	$R^2 = 0.9938$	$R^2 = 0.9896$
LD = $b_0 + 3*s(b_0)$	0.025 gHb.L <sup>-1</sup>	0.033 gHb.L <sup>-1</sup>
LQ = $3*LQ$	0.075 gHb.L <sup>-1</sup>	0.098 gHb.L <sup>-1</sup>
Précision -temps de rétention -aire des pics	RSD <sub>mo</sub> = 0.5 % RSD <sub>mo</sub> = 0.3 %	RSD <sub>mo</sub> = 0.5 % RSD <sub>mo</sub> = 1.3 %

⇒ Analyse d'échantillons

**Fig. 4 : Chromatogrammes obtenus par HPLC-ICPMS du MRC et d'HbA<sub>0</sub> pure (Sigma Aldrich)**



## CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

- ✓ Une méthode de double-DI-ICPMS a été développée pour la détermination du Fe dans le sang (Seronorm- Trace Elements Whole Blood L-1, JCCRM 912).
- ✓ La méthode développée permet aussi d'obtenir la concentration d'Hb totale à partir de la concentration en Fe (4 moles Fe → 1 mole Hb). Au préalable, la séparation du fer libre possible est réalisée par ultrafiltration. Cette procédure a été validée par l'analyse du MRC JCCRM 912, certifié en Hb totale.
- ✓ Les caractéristiques analytiques obtenues par HPLC-ICPMS (<sup>56</sup>Fe) et VIS (415 nm) pour la détermination de l'Hb sont similaires avec une meilleure performance de la détection atomique.
- ✓ Application de la méthode mise en place pour l'Hb totale sur des matrices biologiques.

Ce travail découle du JRP (Joint Research Project) "HLTOS Metallomics" (Metrology for metalloproteins) financé par l'EMRP (European Metrology Research Programme)

# Determination of total haemoglobin by isotope dilution ICP-MS to assess metrological traceability in clinical biochemistry



Marie Palos<sup>1,2</sup>, Maria Estela Del Castillo Busto<sup>1</sup>, Florence Pannier<sup>2</sup>, Claudia Swart<sup>3</sup>, Christine Brauckman<sup>3</sup> and Paola Fisicaro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire National de Métrologie et d'Essais (LNE), 1 rue Gaston Boissier, 75724 Paris Cedex 15, FRANCE. e-mail: [marie.palos@lne.fr](mailto:marie.palos@lne.fr)

<sup>2</sup>Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (LCABIE), IPREM, Université de Pau et des Pays de l'Adour/CNRS UMR 5254, Hélioparc, 2 avenue du président Angot, 64053 Pau Cedex 9, France.

<sup>3</sup>Physikalisch Technische Bundesanstalt (PTB), Braunschweig, 38116, Allemagne.



## Context

Haemoglobin (Hb), an **iron-metalloprotein**, is responsible for the transport and storage of oxygen in human blood. It is a tetrameric protein composed of **two different globin subunits** ( $\alpha$  and  $\beta$  chains), each of which non-covalently binds a **heme** molecule. It exists in different Hb variants: HbA ( $\approx 97\%$ ,  $\alpha_2\beta_2$ ); HbA<sub>2</sub> (2-3%,  $\alpha_2\beta_2$ ); HbF ( $< 1\%$ ,  $\alpha_2\gamma_2$ ). Haemoglobin has a relative **molecular mass of 64 458** (anhydrous). The mass fraction of Hb-Fe is then 0.003 47. It is considered the most important marker for **anemia** and its measurement is used to guide clinical decisions every day.



## Objectives

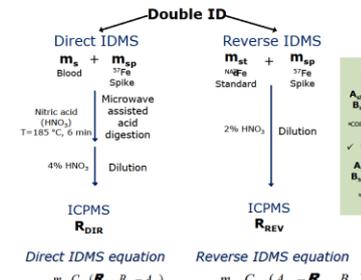
The main objective is the development of primary method for **haemoglobin** based on isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry (**ID-ICPMS**) to ensure traceability in clinical chemistry. →The development of a primary method for the determination of **Hb** by ID-ICPMS is performed. First, the determination of Hb in human blood is based on its **Fe content** by mineralization of the sample (**ID-ICPMS**). Then, an elemental speciation strategy is carried out through the use of a coupled technique HPLC and a post-column <sup>57</sup>Fe quantification approach (**ID-HPLC-ICPMS**). The separation of Hb is performed by liquid chromatography using an anion exchange column (**Source 15Q 4.6/100 PE**, GE Healthcare). The detection is conducted by measuring the iron contained in the haeme-group of the protein, using a sector field ICPMS at medium resolution. → A **characterization of Hb standard** (H7379, Sigma Aldrich, natural isotopic composition) is carried out via **total iron analysis** by double ID-ICPMS. This standard will be used as a primary calibration solution in order to ensure the traceability of the measurements results.

## Development of a primary method for the determination of Hb by ID-ICPMS

### 1) Determination of Hb in human blood by (Fe)-ID-ICPMS

#### Experimental protocol

Blood samples, containing a spike enriched in <sup>57</sup>Fe, were subjected to acid digestion. The extract was analyzed by ICP-MS (**Direct ID**). The concentration of the <sup>57</sup>Fe spike was calculated by **Reverse ID**.



✓ Standard natural abundances<sup>a</sup>  
A<sub>std</sub> = 91.754 ± 0.024 %  
B<sub>std</sub> = 2.119 ± 0.065 %  
<sup>a</sup>KORLEN T.B. et al., Pure Appl. Chem., Vol. 74, pp. 1897-2012, 2002.

✓ <sup>57</sup>Fe spike abundances<sup>b</sup>  
A<sub>sp</sub> = 1.409 ± 0.176 %  
B<sub>sp</sub> = 96.633 ± 0.199 %  
<sup>b</sup>Experimental values: monthly evaluation (n=3) 6 months

Blood samples (JCCRM 912-1, ReCCS), a certified reference material in Hb in 3 concentration levels (1L, 1M and 1H), were analyzed by double (Fe)-ID-ICPMS.

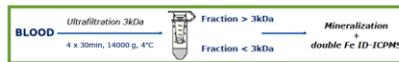
A – Analysis of the certified reference material in Hb at 3 concentration levels (1L, 1M and 1H)

	Fe <sub>exp</sub> (mg.L <sup>-1</sup> , k=2)	Hb <sup>cal</sup> (g.L <sup>-1</sup> , k=2)	Hb <sub>certifiedvalue</sub> (g.L <sup>-1</sup> , k=2)	E <sub>rel</sub>
JCCRM 912-1L	287.2 ± 6.8	82.9 ± 2.0	80.7 ± 1.0	1.97 < 2
JCCRM 912-1M	474.4 ± 13.6	136.9 ± 3.9	136.7 ± 1.6	0.10 < 2
JCCRM 912-1H	628.6 ± 18.9	181.3 ± 5.4	185.7 ± 2.2	1.50 < 2

<sup>a</sup>[Hb]<sub>cal</sub> = [Fe]<sub>exp</sub> \* M<sub>Hb</sub> / 4 \* M<sub>Fe</sub> = [Fe]<sub>exp</sub> \* 64458 / 4 \* 55.845

$$E_{rel} = \left| \frac{Y_p - Y_{ref}}{\sqrt{U_p^2 + U_{ref}^2}} \right|$$

B – Process of ultrafiltration by a 3kDa cutoff of the certified reference material JCCRM 912-1L



CRM JCCRM 912-1L (n=4)	Fe <sub>exp</sub> (mg.L <sup>-1</sup> , k=2)	Hb <sup>cal</sup> (g.L <sup>-1</sup> , k=2)	Hb <sub>certifiedvalue</sub> (g.L <sup>-1</sup> , k=2)	E <sub>rel</sub> %
Fraction > 3 kDa	297.0 ± 14.9	85.7 ± 4.3	80.7 ± 1.0	5.9
Fraction < 3 kDa	< 1.0	< 0.2	-	-

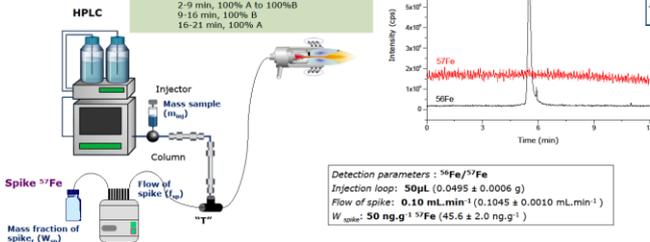
No Fe-species < 3 kDa in CRM JCCRM 912-1

Quantification of Hb by double ID-ICPMS is a **promising approach** to ensure accurate results with low uncertainty → But this developed methodology is **only applicable** if there is **no free iron or other iron-containing proteins**.

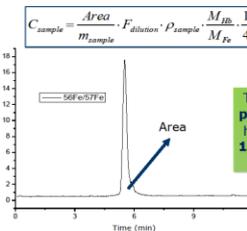
### 2) Determination of Hb by post-column Source™ 15Q-ID-HPLC-ICPMS

#### Experimental protocol

Column: Source™ 15Q 4.6/100 PE  
Phase A: 10 mM TRIS-HAC + 10.2 g.L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>, pH 8.0  
Phase B: A + 500 mM Ammonium acetate, pH 8.0  
Gradient: 0-2 min, 100% A  
2-9 min, 100% A to 100% B  
9-16 min, 100% B  
16-21 min, 100% A



#### Data processing



The quantification approach by **post-column ID-HPLC-ICPMS** has a **relative error of about 13%** as well as an **uncertainty of about 11%**.

#### Results

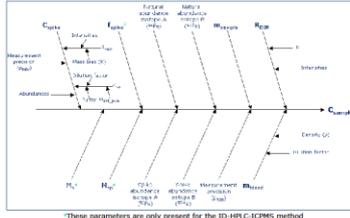
Hemolysate samples (JCCRM 912-1, ReCCS) from a certified reference material in Hb at 3 concentration levels (1L, 1M and 1H), were analyzed by ID-HPLC-ICPMS.

	Fe <sub>exp</sub> (mg.L <sup>-1</sup> , k=2)	Hb <sup>cal</sup> (g.L <sup>-1</sup> , k=2)	Hb <sub>certifiedvalue</sub> (g.L <sup>-1</sup> , k=2)	E <sub>rel</sub> %
JCCRM 912-1L	237.0 ± 29.8	71.1 ± 8.9	80.7 ± 1.0	- 12
JCCRM 912-1M	390.9 ± 41.8	117.2 ± 12.5	136.7 ± 1.6	- 14
JCCRM 912-1H	547.8 ± 45.6	164.2 ± 13.7	185.7 ± 2.2	- 12

### 3) Uncertainty budget

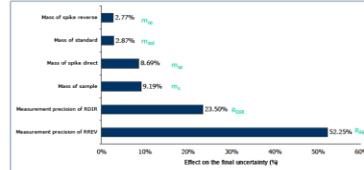
The figure represents an Ishikawa diagram for Hb determination in human blood. A complete uncertainty budget is described by combining the standard uncertainties associated with each parameter of the analytical procedure, following the GUM<sup>b</sup> (Wincert, V.3.11.2002, 0115, Implex, France, software developed at LNE).

<sup>a</sup>GUM, ISO/IEC Guide 98:1995, Guide to the expression of Uncertainty in Measurement.

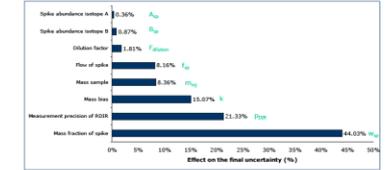


Contributions of predominant factors on Hb determination by ID-ICPMS and ID-HPLC-ICPMS are shown in the figures below.

#### A – (Fe)-ID-ICPMS



#### B – Post-column ID-HPLC-ICPMS



**Mass fraction of spike and measurement precision are the main contributions to the final uncertainty.**

## Characterization of Hb standard

Different characterisations have been conducted:

✓ Determination of total iron by ID-ICP-MS

Hb standard H7379	µg Fe / g Hb (k=2)
Total iron	3009 ± 109
Fraction > 3 kDa	3032 ± 89
Fraction < 3 kDa	75

⇒ Characterisation of the Hb standard based on its **iron concentration** (primary calibration)

✓ Determination of Fe-species < 3 kDa by ID-ICP-MS

⇒ No Fe-species < 3 kDa

✓ Determination of the mass fraction of water by Karl Fisher

⇒ 8 % H<sub>2</sub>O (92.00 ± 0.20 %, k=2, n=4)

✓ Proteins analysis by nanoLC-MS/MS

⇒ 2 % other proteins (as Carbonic Anhydrase)

**10% of impurity**

## Conclusions and perspectives

- The quantification approach by **double ID-ICPMS** has been successfully **validated** by the analysis of the CRM certified in Hb (JCCRM 912-1) with uncertainties values ≤ 5 %.

- A **post-column ID-HPLC-ICPMS** approach has been developed for the specific determination of total Hb in hemolysates providing traceable results (E<sub>rel</sub> ≈ 13 %).

- The **synthesis of an isotopically enriched standard** of Hb (<sup>57</sup>Fe-Hb) is necessary for the development of the species-specific ID-ICPMS quantification approach.