



UNIVERSITATEA
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA

Aimée Rodica Chiș

Alexandra Bendelic

Mirabela Romanescu

Silvia Stoia

Anda Alexa
Andrei Anghel
Diana Bontе
Georgeta Bujor
Ramona Buzatu
Marilena Dinuți

Alina Georgescu
Daniela Grecu
Camelia Gurban
Anca Marcu
Cătălin Marian
Diana Nitușcă

Flavia Petrașcu
Maria Sala-Cîrtog
Corina Samoilă
Edward Șeclăman
Felicia Sfrijan
Liviu Tămaș

Coordonateur: IOAN OVIDIU SÎRBU

BIOCHIMIE CLINIQUE

2^{ème} année, 1^{er} semestre

Notes de travaux pratiques

GHIDURI ȘI ÎNDRUMĂTOARE
DE LABORATOR

Editura “Victor Babeș”
Timișoara, 2026

Editura „Victor Babeș”

Piața Eftimie Murgu nr. 2, cam. 316, 300041 Timișoara

Tel./ Fax 0256 495 210

e-mail: evb@umft.ro

<https://www.umft.ro/ro/organizare-evb/>

Director: Prof. univ. dr. SORIN URSONIU

Colecția: GHIDURI ȘI ÎNDRUMĂTOARE DE LABORATOR

Coordonator colecție: Prof. univ. dr. ADRIAN VLAD

Referent științific: Prof. univ. dr. BOGDAN TIMAR

© 2026 Toate drepturile asupra acestei ediții sunt rezervate.

Reproducerea parțială sau integrală a textului, pe orice suport, fără acordul scris al autorilor este interzisă și se va sancționa conform legilor în vigoare.

ISBN 978-606-786-590-5

REMERCIEMENTS

Nous souhaitons exprimer notre sincère gratitude au personnel de laboratoire pour son soutien inestimable, son dévouement et son professionnalisme dans la préparation des travaux pratiques.

Mirela Antonescu

Paula Ciordaş

Cristiane Dragomir

Claudia Koch

Dana Tautzenberger

TABLE DES MATIÈRES

L1. Contrôle de la qualité dans le laboratoire clinique	5
L2. La PCR. Électrophorèse. Dépistage du SARS-COV-2	19
L3. Examen biochimique du sang.....	35
L4. Examen biochimique de l'urine	45
L5. Investigations biochimiques du système cardiovasculaire.....	69
L6. Détermination de la protéine C-réactive à haute sensibilité.....	81
L7. Implications cliniques de la Phosphatase Alcaline	91
L8. Implications cliniques du sérum α -Amylase et gamma-glutamyltransférase.....	105
L9. Investigations biochimiques pour le système endocrinien. Analyse des hormones thyroïdiennes	115
L10. Évaluation en laboratoire des hormones sexuelles.....	137
L11. Investigation de la fonction rénale. Dosage de la cystatine C.....	153
L12. Enzymologie clinique. Détermination cinétique de CK-MB dans le sérum.....	165
Références	171

L1. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ DANS LE LABORATOIRE CLINIQUE

OBJECTIFS D'APPRENTISSAGE

Définissez les trois phases du processus d'essais en laboratoire: pré-analytique, analytique et post-analytique.

Identifiez les mesures de contrôle qualité applicables à chaque phase des tests en laboratoire.

Calculer et interpréter les paramètres de précision: moyenne, écart-type et coefficient de variation (CV).

Évaluer la précision d'une méthode analytique en utilisant le calcul des biais, la régression linéaire et le test Student t.

Effectuez et interprétez une détermination manuelle de la glycémie en utilisant la méthode de la glucose oxydase.

POINTS CLÉS

Le contrôle qualité englobe toutes les activités garantissant que les résultats des tests sont exacts, précis et fiables tout au long du processus de test.

La phase pré-analytique est responsable de la majorité des erreurs de laboratoire; La préparation du patient, la collecte d'échantillons et le transport doivent être soigneusement contrôlés.

La précision (mesurée par CV) reflète la reproductibilité; La précision (mesurée par biais) reflète une proximité avec la valeur réelle. Les deux doivent remplir des critères d'acceptation définis.

L'évaluation de la méthode nécessite une évaluation de la précision, de l'exactitude, de l'étendue analytique, de l'interférence et de la comparaison avec une méthode de référence.

Objectifs de performance acceptables pour la détermination du glucose: $CV \leq 2,8 \%$; Biais aussi proche que possible de zéro.

Le laboratoire clinique est le lieu où des tests sont effectués sur des échantillons cliniques afin d'obtenir des informations sur la santé des patients. Les résultats (sous la forme d'un bulletin d'analyse) peuvent aider le médecin à dépister, diagnostiquer ou surveiller la maladie ou l'invalidité du patient.

Les analyses de laboratoire les plus demandées comprennent la détermination de la présence ou de la concentration d'un certain composé (appelé analyte ou marqueur) dans un échantillon clinique (échantillon biologique). Pour y parvenir, il est essentiel de sélectionner une méthode d'analyse appropriée, car la performance de la méthode impacte directement la précision des résultats. Cependant, les méthodes analytiques peuvent parfois être affectées par la variabilité et les erreurs. Par conséquent, il est crucial de vérifier régulièrement que la méthode choisie maintient ses performances dans le temps.

Le contrôle de la qualité implique un ensemble de mesures et de procédures conçues pour assurer une qualité constante dans le temps et minimiser les erreurs. Dans le cadre des essais en laboratoire, le contrôle de la qualité permet de s'assurer que la méthode analytique reste précise et fournit constamment des résultats fiables.

L'analyse d'un échantillon biologique comporte trois étapes principales, et un contrôle qualité doit être abordé à chaque étape pour garantir des résultats précis et fiables:

1. Phase (étape) préanalytique
2. Phase (étape) analytique
3. Phase (étape) post-analytique

I. ÉTAPE PRÉ-ANALYTIQUE

La phase préanalytique englobe toutes les activités qui doivent être réalisées avant l'analyse de l'échantillon biologique. À cette étape, le contrôle qualité consiste à minimiser les erreurs avant, pendant et après le prélèvement des échantillons.

Considérations importantes:

- *Documentation complète:* Chaque étape du processus doit être soigneusement documentée dans des registres appropriés pour assurer la traçabilité et la responsabilité.
- *Patients informés:* Le patient doit être bien informé sur les procédures qui sont sur le point d'être utilisées.
- *Personnel formé:* Le personnel médical ou de laboratoire doit être correctement formé concernant les procédures impliquées, assurant une bonne exécution et minimisant les erreurs.

Contrôle de la qualité:

- Avant le prélèvement de l'échantillon
 - *Restrictions alimentaires:* Informez les patients de toutes les restrictions alimentaires qui doivent être suivies avant le prélèvement d'échantillons (par exemple, les exigences de jeûne).
 - *Auto-prélèvement d'échantillons:* Éduquez le patient sur la façon et le moment de prélever des échantillons biologiques tels que des matières fécales, de l'urine ou des expectorations. Fournissez des instructions claires sur l'endroit et la façon de stocker les échantillons avant de les apporter au laboratoire.
 - *Identification du patient:* Confirmez l'identité du patient à l'aide d'une pièce d'identité avec photo.
 - *Exactitude des données:* Vérifiez les informations personnelles, le diagnostic, les tests demandés et assurez-vous que la signature du médecin prescripteur est présente.

- *Consentement éclairé*: Expliquez les manœuvres à utiliser pour le prélèvement d'échantillons. Utilisez des explications verbales et des documents écrits pour assurer la compréhension. Assurez-vous que le patient est à l'aise et qu'il signe un formulaire de consentement avant de procéder.
- Pendant le prélèvement de l'échantillon
 - *Positionnement approprié*: Placez le patient sur une chaise réglable en position clinostatique (allongée) ou orthostatique (debout/assise), selon le type d'échantillon.
 - *Exigences*: Identifier le type et la quantité d'échantillon biologique nécessaire. Sélectionner le type et le nombre appropriés de contenants de prélèvement.
 - *Étiquetage*: Étiquetez correctement les récipients avec les coordonnées du patient et les tests demandés.
- Après le prélèvement de l'échantillon
 - *Transport*. Les échantillons doivent être transportés rapidement (idéalement dans les 4 heures) du lieu de prélèvement au laboratoire clinique. Si nécessaire, assurez-vous de conditions de transport spéciales, telles que l'utilisation de conteneurs spéciaux ou la protection contre la chaleur ou la lumière.
 - *Traitement primaire*. À l'arrivée dans le laboratoire clinique, confirmer l'intégrité des contenants de collecte. Enregistrez les échantillons dans la base de données du laboratoire, y compris les données du patient et la date de prélèvement. Si nécessaire, effectuez le traitement initial, tel que le fractionnement du sang total par centrifugation pour séparer le plasma.
 - *Sources d'erreur*. Notez toute interférence, telle qu'une hémolyse, une lipémie ou une jaunisse, qui pourrait affecter négativement les résultats de l'analyse. Décider si l'échantillon peut être utilisé pour des analyses plus approfondies.
 - *Stockage*. En cas d'analyses différées ou d'utilisation à long terme, conservez les échantillons dans les conditions appropriées: température ambiante, réfrigérateur ou congélateur.

II. ÉTAPE ANALYTIQUE

Cette étape implique l'analyse proprement dite du biomarqueur (analyte) dans l'échantillon biologique: l'analyse peut être qualitative (identifie la présence de l'analyte) ou quantitative (mesure la concentration de l'analyte).

Considérations importantes:

- *Sélection des méthodes d'analyse*: Plusieurs méthodes sont généralement disponibles pour analyser le même biomarqueur. Le personnel du laboratoire doit sélectionner avec soin la méthode la plus appropriée en fonction de son aspect pratique et de sa fiabilité.
 - *Caractéristiques pratiques*. Ces facteurs déterminent si la méthode est réalisable et peut être mise en œuvre efficacement en laboratoire. Il s'agit notamment de l'équipement, de la charge de travail, de la manipulation des échantillons, de la taille de la série, des compétences du personnel, du coût par essai, des méthodes de normalisation et de contrôle de la qualité, des besoins en espace, des précautions de sécurité et des procédures requises pour une méthode spécifique.
 - *Caractéristiques de fiabilité*: Ces facteurs évaluent les performances analytiques et la fiabilité globale de la méthode. Cela comprend la précision, l'exactitude, la sensibilité analytique, la spécificité analytique, la récupération, les interférences, les lectures à blanc, l'interaction avec les échantillons, la stabilité des réactifs et la plage linéaire (Tableau 1, Tableau 2, Figure 1).

Tableau 1. Caractéristiques des méthodes analytiques

Caractéristique	Description
Plage analytique	Il s'agit de la plage de concentration ou d'une autre grandeur dans l'échantillon pour laquelle la méthode est applicable sans modification. Elle doit être suffisamment large pour inclure la majorité (95 %) des échantillons cliniques attendus sans dilution.
Sensibilité analytique	Mesure de la capacité d'une méthode analytique à détecter de petites quantités du composant mesuré. Par conséquent, la sensibilité est liée à la précision: (1) lorsque la préoccupation est la performance à des concentrations supérieures à la limite de détection, il est préférable de déterminer la précision à la concentration d'intérêt, et (2) lorsque la préoccupation est la performance à de très faibles concentrations, il est utile de déterminer la limite de détection.
Limite de détection	Est le résultat unique le plus petit qui, avec une probabilité déclarée (95 %), peut être distingué d'un blanc approprié. La limite peut être une concentration ou une quantité et définit le point auquel l'analyse devient tout juste réalisable.
Lectures à blanc	Sont les réponses observées par la procédure de mesure en raison des constituants du réactif et de l'échantillon, à l'exclusion de l'analyte souhaité.
Spécificité analytique	C'est la capacité d'une méthode analytique à déterminer uniquement le composant qu'elle souhaite mesurer.
Interférence	L'effet d'un composant, qui ne produit PAS par lui-même une lecture, sur la précision de mesure d'un autre composant est lié à la spécificité.
Récupération	C'est la capacité d'une méthode analytique à mesurer correctement un analyte pur lorsqu'il est ajouté aux échantillons analysés en routine. Il est lié à la précision et teste si la méthode analytique peut mesurer la substance souhaitée en présence de tous les autres matériaux apparaissant dans la matrice de l'échantillon réel.
Précision	C'est la proximité des résultats de laboratoire les uns par rapport aux autres.
Exactitude	C'est la proximité d'un résultat de laboratoire avec la valeur réelle.

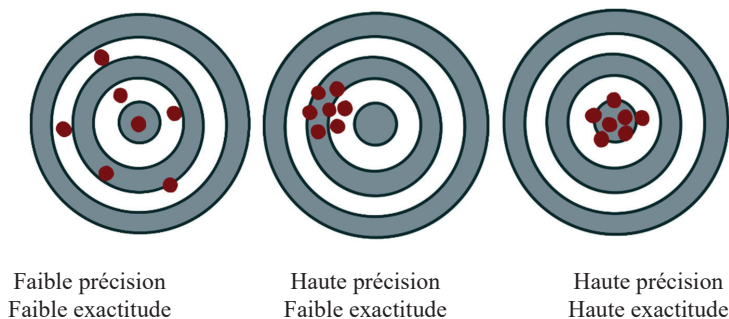


Figure 1. Précision et exactitude

Tableau 2. Différences entre la précision et l'exactitude

	<i>Précision</i>	<i>Exactitude</i>
Représente	La proximité des résultats de laboratoire les uns par rapport aux autres	La proximité d'un résultat de laboratoire avec la valeur réelle
Fait référence à la	COHÉRENCE des résultats	JUSTESSE des résultats
Dispositions	Variabilité statistique	Biais statistique
Degré de	Reproductibilité	Conformité
Déterminé par	Réalisation d'une expérience de réplication dans laquelle le même échantillon est analysé plusieurs fois (10 à 20 fois)	Comparaison avec l'étalon ou l'étalon (substance de composition connue)
Représenté par	Écart-type (ET) et coefficient de variation (CV)	Biais (déplacement)
Dépendance	Indépendant de l'exactitude (les valeurs précises peuvent être exactes ou non)	Dépendant de la précision (les valeurs exactes doivent être précises dans la plupart des cas)
Origine	Erreurs aléatoires	Erreurs systématiques

Contrôle de la qualité:

- Minimisation du risque d'erreurs (pour chaque détermination):
 - *Manipulation correcte des réactifs.* Utiliser des réactifs à la concentration appropriée, conservés dans des conditions adéquates (par exemple, température, exposition à la lumière), exempts de toute contamination et dont la date de péremption n'est pas dépassée.
 - *Équipement et espace appropriés.* Assurez-vous que l'environnement du laboratoire est propre et équipé des outils nécessaires, y compris des équipements de protection tels que des blouses de laboratoire et des gants, ainsi que des espaces de travail dédiés et exempts de contamination.
 - *Instruments fonctionnels.* Vérifier et entretenir régulièrement les instruments pour assurer l'étalonnage des machines pour des mesures précises, le bon fonctionnement des pipettes et autres outils, la propreté des récipients et des conteneurs utilisés pour l'analyse.
 - *Personnel formé.* Tout le personnel du laboratoire doit recevoir une formation adéquate sur les méthodes d'analyse choisies et suivre les procédures opérationnelles normalisées (PON).
- Contrôle régulier de la précision et de l'exactitude (sur une base quotidienne):
 - *Mesure des étalons et des produits de contrôle:* Utiliser des étalons ou des matériaux de contrôle (sérum, plasma, sang, souches microbiennes etc.). Étalons d'essai à diverses concentrations, au-dessous, au-dessus et à l'intérieur de l'intervalle de référence (plage normale). Effectuer de 10 à 20 essais individuels d'un étalon à la même concentration.
 - *Évaluer les résultats:* Comparer les valeurs d'essai individuelles à la concentration réelle de l'étalon. Déterminez des paramètres statistiques de précision, tels que la moyenne, l'écart-type (ET) et le coefficient de variation (CV).

III. ÉTAPE POST-ANALYTIQUE

La phase post-analytique couvre la période entre la fin des tests et l'interprétation des résultats. Le principal résultat de cette phase est la création d'un bulletin d'analyse, qui sert de rapport officiel de laboratoire.

Considérations importantes:

- Le bulletin d'analyse doit inclure:
 - *Données du patient*: Nom complet, identifiant ou tout autre identifiant unique. L'âge et le sexe (pour une bonne interprétation des résultats).
 - *Renseignements sur le laboratoire*: Nom et coordonnées du laboratoire. Identification de la personne qui a effectué l'analyse.
 - *Détails du test*: La méthode analytique et l'instrument utilisé.
 - *Résultats*: Les valeurs mesurées de chaque marqueur ou analyte.
 - *Intervalle de référence (plage normale)*: plage attendue pour chaque marqueur, en tenant compte de facteurs tels que le sexe et l'âge.

Contrôle de la qualité:

- *Validation des intervalles de référence*: confirmer que les intervalles de référence indiqués sont appropriés, en tenant compte des variations liées au sexe, à l'âge, à la grossesse, etc.
- *Utilisation des unités de mesure correctes*: veiller à ce que chaque marqueur soit rapporté avec son unité de mesure appropriée (mg/dl, mmol/l). La cohérence des unités est essentielle pour éviter toute mauvaise interprétation par les professionnels de santé.

ETAPES DE L'EVALUATION D'UNE METHODE ANALYTIQUE

1. Obtenir les réactifs, le kit, les instruments ainsi que tout le matériel et les fournitures nécessaires. Tester la méthode sur des étalons et des échantillons biologiques pendant plusieurs jours afin de se familiariser avec la procédure. Les échantillons doivent contenir différentes quantités de l'analyte ainsi que d'éventuelles substances interférentes (bilirubine, hémolyse, forte turbidité). Tout échantillon congelé doit être décongelé et soigneusement homogénéisé avant utilisation.

2. Déterminer la précision intra-série en analysant 10 à 20 aliquotes d'un matériau de contrôle ou d'un seul échantillon clinique. À défaut, effectuer des analyses en double sur une variété d'échantillons cliniques. Sélectionner des matériaux de contrôle dont les concentrations correspondent aux différents niveaux de décision d'intérêt. Chaque série de déterminations donnera des valeurs différentes en raison des erreurs produites au cours de la procédure. Pour évaluer la précision, il faut calculer la moyenne, l'écart-type (ET) et le coefficient de variation (CV) pour chaque série de données.

Il a été déterminé expérimentalement que la distribution des valeurs suit une courbe de Gauss (en cloche) (Figure 2 - gauche). Comme ET est une mesure de la dispersion des valeurs de test, elle est inversement proportionnelle à la précision des résultats. Plus ET est élevée, plus la différence entre les résultats individuels est grande et moins la méthode analytique est précise. Les limites acceptables utilisées par la plupart des laboratoires sont de $\pm 2ET$ (95,5 %). En général, la performance minimale acceptable pour une méthode non enzymatique est de 5 % CV, tandis que pour les électrolytes elle est de 3 % CV, et pour les méthodes enzymatiques, de 10 % CV. Lorsque ET et CV augmentent de manière significative par rapport aux valeurs cumulées, il convient d'examiner d'éventuels problèmes dus à des erreurs aléatoires.

Moyenne	Écart-type (ET)	Coefficient de variation (CV)
$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$	$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$	$CV = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100$
<i>X_i</i> -valeurs individuelles; <i>n</i> -nombre de valeurs; Σ-sommation des valeurs individuelles	<i>n</i> -1 représente les degrés de liberté	
est une mesure de la moyenne des valeurs	est la mesure de la dispersion (variation) des valeurs individuelles par rapport à la moyenne	est une autre façon utile d'exprimer la variabilité des résultats
est calculé en additionnant les valeurs et en divisant par le nombre total de valeurs	est calculée comme la racine carrée de la variance	est une expression mathématique permettant de citer l'écart-type en pourcentage de la moyenne

Le concept d'erreur totale fait référence à tous les types d'erreurs qui produisent des écarts par rapport à la valeur réelle du composé à déterminer (Figure 2 - à droite). Il existe deux principaux types d'erreurs:

Erreurs systématiques	Erreurs aléatoires
- faire en sorte que la valeur moyenne soit différente de la valeur réelle - peut être dû à un étalonnage incorrect de l'instrument, à une température de dosage incorrecte ou à de mauvais réactifs - affecter l'exactitude des résultats	- entraîner une dispersion des valeurs autour de la valeur réelle; Les valeurs sont différentes de manière aléatoire de la valeur réelle - Peut être dû à des erreurs de personnel (pipetage, mesure) - affecter la précision des résultats

3. Déterminer la plage analytique en analysant un ensemble d'étalons ou une série de dilutions de matériaux de contrôle ou d'un bassin d'échantillons élevé. Tracez les valeurs observées en fonction des concentrations des échantillons ou des dilutions relatives pour la série d'échantillons et estimez la plage analytique.

4. Déterminez la récupération en ajoutant des quantités connues de l'analyte (C) sous forme concentrée à des échantillons cliniques réels pour préparer un nouvel échantillon de test (T). Ajouter le même volume de solvant sans analyte pour obtenir un nouvel échantillon de référence.

$$\bar{R} = \frac{T - M}{C} \cdot 100$$

5. Tester l'interférence de substances courantes telles que la bilirubine, l'hémoglobine, les lipides, les anticoagulants et les médicaments courants, ainsi que de substances spécifiques connues pour causer des problèmes dans la détermination de l'analyte particulier mesuré. Le brouillage peut être testé par une expérience analogue à l'expérience de récupération, sauf que la matière ajoutée est la substance brouilleuse suspectée plutôt que l'analyte à déterminer. Les résultats peuvent être

exprimés en termes de différence de concentration entre l'échantillon contenant l'interfèrent et l'échantillon de référence.

Brouillage = $\overline{y} - \overline{x}$

$\overline{y}$ - Moyenne des résultats avec interférence

$\overline{x}$ - Moyenne des résultats sans interférence

6. Comparer les résultats obtenus par la méthode d'essai avec ceux obtenus par une méthode analytique de référence. Des échantillons provenant de 40 à 200 patients doivent être analysés. La comparaison avec une méthode analytique de référence mesure en fait l'erreur systématique $|x-\mu|$ de la méthode en ce qui concerne la valeur vraie. Les données obtenues peuvent être traitées par l'une des méthodes suivantes:

- a) Coefficient de corrélation
- b) Régression linéaire ou analyse des moindres carrés
- c) Test T (étudiant)

a) *Coefficient de corrélation*

Le coefficient de corrélation peut être utile pour évaluer la fiabilité des estimations de régression linéaire de la pente et de l'ordonnée à l'origine.

Il peut être calculé à partir de l'équation:

$$r = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2] \cdot [n \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

Idéalement, la valeur de r devrait être de 1,00. Les valeurs inférieures à 1,00 sont dues à des erreurs aléatoires à l'intérieur ou entre les méthodes, tandis que les erreurs systématiques n'ont aucun effet sur r. Pour les valeurs supérieures à 0,95, les estimations de la pente et de l'ordonnée à l'origine ne sont pas très affectées par la variabilité de la méthode comparative.

b) *Méthode de régression linéaire*

Pour décrire le tracé des valeurs de test en fonction des valeurs de référence de l'expérience de comparaison des méthodes, la meilleure ligne droite à travers les données peut être déterminée à partir de la régression linéaire ou de l'analyse des moindres carrés.

Une droite est donnée par une équation de la forme (la droite de régression décrivant comment les estimations des valeurs de la méthode d'essai (y) sont liées aux valeurs de la méthode de référence (x)): $y = a + bx$

Ordonnée à l'origine (a)	Pente (B)	Écart-type par rapport à la droite de régression ($S_{x/y}$)
$a = \overline{y} - b\overline{x}$	$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$	$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - Y_i)^2}{n - 2}}$

a = l'ordonnée à l'origine; b = la pente; y_i = la valeur observée pour un échantillon par la méthode d'essai; Y_i = la valeur calculée à partir de l'équation de régression, compte tenu de la valeur par la méthode de référence (x_i); n-2 = degrés de liberté.

Idéalement:

- pente = 1,00
- ordonnée à l'origine = 0,0
- $S_{x/y}$ = 0,0

Les écarts par rapport à ces valeurs idéales sont causés par différents types d'erreurs analytiques:

- Les erreurs proportionnelles provoquent des changements dans la pente
- Les erreurs constantes provoquent des changements dans l'ordonnée à l'origine
- Erreurs aléatoires font augmenter $S_{x/y}$

Exemple:

La droite calculée à partir de l'équation: $y = 1,2 + 0,982x$

- Une erreur constante de 1,2 mg % (ordonnée à l'origine)
- Une erreur proportionnelle de 1,8 mg % (1-0,982)
- Écart-type = 4,2 mg %, => on s'attend à ce que 95 % des points de données se trouvent à moins de 8,4 mg % ($\pm 2S$) de la droite

Pour juger de l'acceptabilité de l'exactitude ou de l'erreur systématique, il est préférable de déterminer l'ampleur de l'erreur aux niveaux critiques de la décision médicale. Si l'erreur admissible était de 5,0 mg % à un niveau de décision de 100 mg %, l'erreur systématique devrait être calculée pour une concentration de 100 mg %. Par conséquent, $Y_{100} = 1,2 + 0,982 \cdot 100 = 99,4$.

La différence entre $Y_c - X_c = |99,4 - 100| = 0,6$ fournit une estimation de l'erreur systématique à la concentration critique. Parce que $0,6 < 5$ la méthode est acceptable.

En appliquant une régression linéaire aux données d'une expérience de comparaison de méthodes, il est important de représenter graphiquement les données pour l'inspection visuelle et de calculer le coefficient de corrélation r dont la valeur doit être supérieure à 95.

c) Test T (étudiant)

L'hypothèse nulle testée est qu'il n'y a pas de différence systématique entre les deux méthodes d'analyse.

Le résultat d'une détermination sera $x = \bar{x} \pm S_x t_p$ où t_0 est le facteur t (étudiant), un facteur qui, multiplié par l'écart-type, déterminera une certaine mesure à tomber (avec une probabilité P) dans l'intervalle énoncé par l'équation $x = \bar{x} \pm S_x t_p$.

La valeur de t peut être calculée à partir de l'équation:

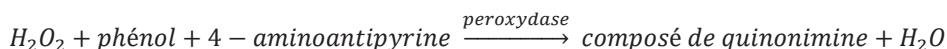
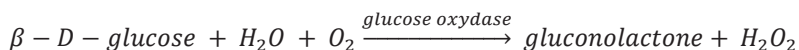
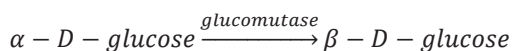
$$t = \frac{|\bar{x} - \bar{y}| \sqrt{n}}{\sqrt{\frac{\sum [(x_i - \bar{x}) - (\bar{y} - \bar{x})]^2}{n - 1}}},$$

Généralement, $p = 95\%$. Si la valeur de t calculée pour $n-1$ degrés de liberté correspond ou si elle est inférieure à la valeur correspondante de $P=95\%$ des tables, alors l'hypothèse nulle est vérifiée. Si la valeur de t est supérieure, il existe des différences significatives entre les deux méthodes, la méthode testée étant inexacte par rapport à la méthode de référence.

En conclusion, la précision de la méthode mesure les erreurs aléatoires résultant de la détermination répétée du même échantillon, tandis que la précision de la méthode mesure les erreurs systématiques par des expériences de récupération, de linéarité et de comparaison de la méthode analytique testée.

TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX

Évaluation de la précision et de l'exactitude de la détermination manuelle du glucose à l'aide de la méthode de la glucose oxydase



Réactifs

- Réactif de travail: tampon phosphate 0,5 mol/l (pH 7,50), phénol 7,5 mmol/l, glucose oxydase 12000 U/l, peroxydase 660 U/l, 4-aminoantipyrine 0,4 mmol/l. Le réactif est stable 3 mois à 2-8°C ou 3 semaines à 20-25°C.
- Étalon de glucose, 100 mg %

Procédure

- Pipeter dans 3 tubes à essai comme suit:

Réactifs, µl	Échantillon	Standard	Blanc
Réactif de travail	1000	1000	1000
Sérum dilué	100	-	-
Étalon dilué	-	100	-
Eau distillée	-	-	100

- Incuber les tubes à température ambiante pendant 30 minutes.
- Lire l'absorbance de l'échantillon et de l'étalon à $\lambda=546$ nm, en mettant le spectrophotomètre à zéro contre le blanc. La couleur est stable pendant 60 minutes. La réponse est linéaire jusqu'à une concentration de glucose de 400 mg %.

Calcul

- Calculez la concentration de glucose sérique à l'aide de la formule:

$$C_{\text{échantillon}} (\text{mg}/100\text{mL}) = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{standard}}} \times C_{\text{standard}} = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{standard}}} \times 100$$

- Déterminez la précision en calculant la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation. Selon www.westgard.com/biodatabase1.htm, le CV optimal $\leq$ de 2,8 % pour la détermination de la glycémie
- Déterminez la précision en fonction du biais (déplacement). Le biais (D) représente la différence entre la valeur moyenne de la chaîne de données de contrôle et la valeur réelle de la concentration de glucose dans le sérum (la valeur réelle dans notre cas est de 100 mg/dL). Le biais est calculé selon la formule (selon www.westgard.com/biodatabase1.htm, le D optimal $\leq$ 2,34 % pour la détermination de la glycémie):

$$D\% = \frac{x-a}{a} \times 100, \text{ où } x - \text{moyenne de la chaîne de données de commande; } a - \text{la valeur réelle}$$

Travaux expérimentaux complémentaires

Nous déterminons deux séries de 10 taux de glucose sérique (dans le même sérum) en obtenant 10 valeurs. Ces valeurs seront utilisées pour la détermination de la précision ($\bar{x}$, S et CV), en considérant qu'une valeur de CV < 5 % est acceptable. La précision de la méthode sera calculée à l'aide du test t.

N° de détective Glycémie	I			II		
	X_I	$X_I - \bar{x}_I$	$(x_I - \bar{x}_I)^2$	X_{II}	$X_{II} - \bar{x}_{II}$	$(x_{II} - \bar{x}_{II})^2$
1	96	-2	4	98	-1	1
2	102	4	16	101	2	4
3	95	-3	9	99	0	0
4	104	6	36	102	3	9
5	99	1	1	98	-1	1
6	95	-3	9	99	0	0
7	99	1	1	97	-2	4
8	98	0	0	101	2	4
9	96	-2	4	98	-1	1
10	96	-2	4	97	-2	4
Total	980		84	990		28

1. Calcul de précision.

Paramètre statistique	Formule	Méthode I	Méthode II
Moyenne	$\bar{x}_I = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$	$\bar{x}_I = \frac{980}{10} = 98$	$\bar{x}_{II} = \frac{990}{10} = 99$
Écart type	$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$	$S_I = \sqrt{\frac{84}{9}} = 3,05$	$S_{II} = \sqrt{\frac{28}{9}} = 1,76$
Coefficient de variation	$CV = \frac{S}{\bar{x}_I} \cdot 100$	$CV_I = \frac{3,05 \cdot 100}{98} = 3,11$	$CV_{II} = \frac{1,76 \cdot 100}{99} = 1,78$

Discussion:

- les deux séries de détermination ont un CV < 5 % => bonne précision
- la distribution des valeurs $x \pm 2S$ c'est:
 - I. $98 \pm 2 \cdot 3,05 = 98 \pm 6,1$;
 - II. $99 \pm 2 \cdot 1,76 = 99 \pm 3,52$.

2. Calcul de précision.

Nous comparons la précision de la méthode I par rapport à la méthode de référence II. Supposons comme hypothèse nulle que les moyennes des deux ensembles de données soient identiques. Calculez t et comparez-le à une valeur t tabulée au niveau de confiance souhaité et à $n_1 + n_2 - 2$ degrés de liberté. Si le t calculé est supérieur à la valeur t de la table, rejetez l'hypothèse nulle.

$$n_1 = n_2 = 10 \quad \bar{x}_I = 98 \quad \bar{x}_{II} = 99 \quad S_1 = 3,05 \quad S_2 = 1,76$$

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{S} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} \quad S = \sqrt{\frac{S_1^2(n_1 - 1) + S_2^2(n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}}$$

$$S = \sqrt{\frac{3,05^2 \cdot 9 + 1,76^2 \cdot 9}{10 + 10 - 2}} = 2,49 \quad t = \frac{|98 - 99|}{2,49} \sqrt{\frac{100}{10 + 10}} = 0,89$$

Nous regardons dans le tableau $p = 95 \%$ et les degrés de liberté $n_1 + n_2 - 2 = 10 + 10 - 2 = 18$, obtenant une valeur pour $t = 1,73$. La valeur calculée de t étant de 0,89 et parce que 0,89 est $< 1,73$, nous pouvons conclure qu'il n'y a pas de différences significatives entre les deux méthodes, et que la méthode testée est comparable à la méthode de référence.

Pour évaluer les performances qualitatives des systèmes analytiques à l'aide de la méthode de régression linéaire et du coefficient de variation, nous considérons qu'entre deux variables, il existe une corrélation énoncée par une équation de régression. L'intensité de la corrélation entre les variables est mesurée par le coefficient de corrélation.

N° d'échantillon	-	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Valeur glycémique Méthode testée	y	12	17	31	42	48	63	69	77	92
Valeur glycémique Méthode de référence	x	10	20	30	40	50	60	70	80	90

3. Calcul du coefficient de corrélation.

$$r = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2] \cdot [n \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

$$r = \frac{9 \cdot 28520 - 451 \cdot 450}{\sqrt{(9 \cdot 28500 - 202500)(9 \cdot 28500 - 203401)}} = \frac{53730}{53931,956} = 0,996$$

$r > 0,95 \Rightarrow$ Très bon rapport qualité-prix

4. Calcul de la ligne de régression.

$$y = a + bx \quad a = \bar{y} - b\bar{x} \quad b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$y = 0,36 + 0,995x.$$

Pour le calcul de l'erreur à la valeur critique de diagnostic:

- $x = 100 \text{ mg \%}$
- $y = 99,86 \text{ mg \%}$
- l'erreur $x - y = 100 - 99,86 = 0,14 \text{ mg \%}$.

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L2. La PCR. ÉLECTROPHORÈSE. DÉPISTAGE DU SARS-CoV-2

OBJECTIFS D'APPRENTISSAGE

Décrivez les composants structurels et les étapes procédurales de la réaction en chaîne par polymérase (PCR).

Distinguez entre la PCR en point finale, la PCR quantitative en temps réel (qPCR), RT-PCR et la RT-qPCR.

Identifier les méthodes de laboratoire directes et indirectes utilisées pour la détection du SARS-CoV-2.

Expliquez le principe de l'électrophorèse sur gel d'agarose et interprétez les motifs de bandes électrophorétiques.

Préparez et faites passer un gel d'agarose pour visualiser les fragments d'ADN.

POINTS CLÉS

La PCR amplifie des séquences d'ADN spécifiques par des cycles répétés de dénaturation (95°C), d'hybridation d'amorces (50-65°C) et d'extension (72°C).

La qPCR permet la surveillance en temps réel de l'amplification à l'aide de colorants fluorescents (SYBR Green) ou de sondes spécifiques à la séquence (TaqMan), permettant la quantification sans électrophorèse en gel.

La RT-PCR et la RT-qPCR convertissent d'abord l'ARN en ADNc, permettant l'amplification et la quantification des cibles d'ARN, y compris les génomes viraux tels que le SARS-CoV-2.

Le SARS-CoV-2 est diagnostiqué par RT-qPCR (référence pour l'infection active); les tests antigéniques rapides détectent une infection active; Les tests d'anticorps indiquent une infection passée.

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN par taille; les fragments plus petits migrent plus rapidement vers l'électrode positive.

ASPECTS GENERAUX

- Le SARS-CoV-2 est un virus à ARN simple brin de sens positif appartenant à la famille des *Coronaviridae*
- Le SARS-CoV-2 est l'agent causal de la maladie respiratoire COVID-19 (Coronavirus Disease 2019)
- Les principales protéines structurales du virus sont les protéines Spike (S), de membrane (M), d'enveloppe (E), de nucléocapside (N) et d'hémagglutinine-estérase (HE)

TESTS DE DÉPISTAGE DU SARS-CoV-2

Les échantillons suivants sont pertinents pour les tests biologiques du SARS-CoV-2:

- Échantillons des voies respiratoires supérieures: écouvillon nasopharyngé, écouvillon oropharyngé (gorge)
- Échantillons des voies respiratoires inférieures: expectorations, aspiration trachéale/lavage broncho-alvéolaire
- Sang total, sérum et plasma

Les méthodes utilisées pour les tests SARS-CoV-2 sont les suivantes:

- Méthodes directes:
 - détecter la présence de structures du SARS-CoV-2 (acide nucléique/protéines) dans l'échantillon biologique (généralement des échantillons respiratoires)
 - la technique PCR (tests moléculaires) est l'étalon-or pour détecter la présence d'ARN du SARS-CoV-2
 - la présence d'antigènes (protéines) du SARS-CoV-2 peut être détectée à l'aide de dispositifs à flux latéral, soit par les prestataires de soins de santé, soit sous forme de tests au point de service (tests rapides)
 - Ces méthodes vérifient la présence d'infections actives
- Méthodes indirectes:
 - inclure la détection d'anticorps (IgM, IgG) anti-SARS-CoV-2, représentant la réponse immunitaire humorale du patient au virus
 - sont généralement réalisés sur des échantillons de sang obtenus par piqûre au doigt (tests sérologiques)
 - il peut s'agir de tests au point de service avec des dispositifs à flux latéral ou de tests de laboratoire tels que ELISA (dosage immuno-enzymatique) ou CIA (dosage immuno-chimiluminescent)
 - Ces méthodes vérifient les infections passées

RÉACTION EN CHAÎNE PAR POLYMÉRASE

En 1984, un biochimiste américain, Kary Mullis, a découvert une méthode appelée réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour amplifier des séquences d'ADN spécifiques. Cette technique a révolutionné le monde de la biologie moléculaire. Le concept était simple: reproduire dans un tube de laboratoire le processus de réplication de l'ADN qui a lieu dans les cellules, le résultat étant pareil: la formation de nouveaux brins d'ADN complémentaires (ADNc) à partir des brins parents.

Composants PCR

- **ADN matrice (matrice PCR, ADN à amplifier)**
 - L'ADN peut être de l'ADN génomique (ADNg), de l'ADNc et de l'ADN plasmidique.
 - L'ADN matrice contient la séquence cible (entourée de 2 séquences flanquantes), représentant la séquence à amplifier.
- **ADN polymérase**
 - Toutes les réactions PCR nécessitent une ADN polymérase active à haute température. La Taq polymérase est l'une des enzymes les plus utilisées, fonctionnant de manière optimale à 70 °C - 72 °C. La Taq polymérase a été isolée à partir de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* trouvée dans les sources chaudes. Il convient à la PCR standard sans exigences particulières.
 - Afin d'améliorer les performances de réaction, de nouvelles générations de polymérases sont en cours de conception. Par exemple, certaines enzymes ne sont activées qu'à des températures élevées pour réduire l'amplification non spécifique au début de la réaction.
 - L'ADN polymérase synthétise le nouveau brin dans la direction 5' à 3'.
- **Amorces**
 - Les amorces sont de l'ADN simple brin, court (environ 15 à 30 bases), complémentaire aux séquences flanquantes de l'ADN cible.
 - Afin d'initier l'amplification, les ADN polymérases ont besoin d'une courte séquence de nucléotides (les amorces/ "primers") pour indiquer le point de départ de la réaction.
 - Les séquences d'amorces doivent être soigneusement choisies de manière à ne cibler que l'ADN d'intérêt, évitant ainsi la possibilité de se lier à une autre séquence.
 - Les amorces se fixent à l'extrémité 3' du brin parent.
- **Désoxynucléotides triphosphates (dNTP)**
 - Les dNTP agissent comme les éléments constitutifs nécessaires à la synthèse des nouveaux brins d'ADN et comprennent les quatre nucléotides de base de l'ADN: dATP, dTTP, dCTP et dGTP. Pour une incorporation de base optimale, les dNTP sont généralement ajoutés à la réaction PCR en quantités équimolaires.
- **Tampon PCR**
 - le tampon garantit que des conditions optimales sont maintenues tout au long de la réaction PCR. Les principaux composants des tampons PCR comprennent le chlorure de magnésium (utilisé comme cofacteur de l'ADN polymérase), le tris-HCl et le chlorure de potassium (maintien d'un pH stable pendant la réaction).

Étapes de la PCR

Le cycle d'amplification par PCR comprend trois étapes: la dénaturation (séparation des brins), l'hybridation (fixation des amorces) et l'élongation (synthèse de l'ADN).

- **Dénaturation/séparation des brins**

- Chauffer la solution à 95°C pendant quelques secondes (environ 15 s), en séparant les deux brins de l'ADN parent lorsque les liaisons hydrogène sont rompues.

- **Hybridation d'amorces**

- La solution est ensuite brusquement refroidie à 54 °C, ce qui permet à chaque amorce de s'hybrider en un brin d'ADN. Les températures d'hybridation sont généralement de 50 à 65 °C. Cependant, la température optimale dépend de la séquence et de la longueur des amorces.
- Une amorce s'hybride à l'extrémité 3' de la séquence cible sur un brin, tandis que l'autre amorce s'hybride à l'extrémité 3' de la séquence cible complémentaire.
- Les duplex d'ADN parents pourraient se réunir à cette température, mais ne le font pas, car les amorces sont présentes en grand excès.

- **Extension/synthèse d'ADN**

- La solution est ensuite chauffée à 72 °C (74 °C), la température de travail idéale pour les polymérases thermostables.
- La polymérase allonge les deux amorces, synthétisant de nouveaux brins d'ADN, dans la direction de la séquence cible, car la synthèse de l'ADN a lieu dans la direction 5' à 3'.
- La synthèse de l'ADN se produit sur les deux brins mais s'étend au-delà de la séquence cible.

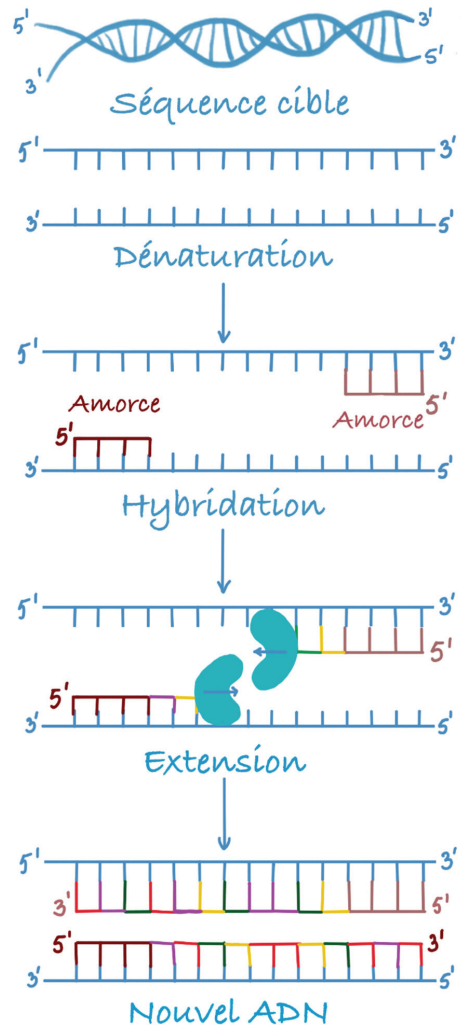


Figure 1. Étapes de la PCR

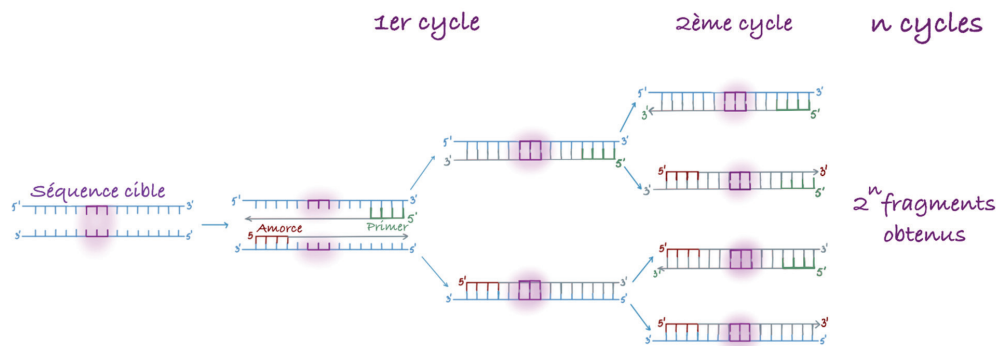


Figure 2. Cycles de PCR

Ces trois étapes (dénaturation, hybridation, extension) constituent un cycle de l'amplification de la PCR et peuvent être effectuées de manière répétitive simplement en modifiant la température. La thermostabilité de la polymérase permet d'effectuer une PCR dans un récipient fermé, sans ajout de réactifs après le premier cycle. Quatre duplex contenant la séquence cible ont été générés après l'achèvement du deuxième cycle. Les cycles suivants amplifieront la séquence cible de manière exponentielle. Idéalement, après n cycles, la séquence souhaitée est amplifiée 2^n fois.

Caractéristiques de la méthode PCR:

- Il n'est pas nécessaire de connaître la séquence de la cible elle-même; Mais, il est nécessaire de connaître les séquences flanquantes afin de pouvoir concevoir des amorces complémentaires.
- La cible peut être beaucoup plus grande que les amorces.
- Il n'est pas nécessaire que les amorces soient parfaitement adaptées aux séquences flanquantes pour amplifier les cibles.
- La méthode est hautement spécifique en raison de la rigueur de l'hybridation à une température relativement élevée. La rigueur (stringence) correspond au degré de correspondance requis entre l'amorce et la séquence cible.
- La PCR est très sensible; une seule molécule d'ADN peut être amplifiée et détectée.

Pour déterminer si l'amplification a réussi, les produits de PCR peuvent être visualisés à l'aide de l'électrophorèse sur gel, ce qui peut indiquer la présence ou l'absence de l'amplicon, sa taille et son abondance approximative. Selon l'objectif, il peut s'agir du point final (déterminer si un gène est présent ou non), ou le produit PCR peut être le point de départ d'investigations en aval plus complexes telles que le séquençage.

Types de PCR

- **PCR en point final**
 - En général, toute méthode basée sur la PCR en point final nécessite une étape supplémentaire d'analyse physique. Les secondes étapes les plus couramment utilisées sont l'électrophorèse sur gel, le séquençage de l'ADN ou les micropuces à ADN (DNA microarrays).
- **PCR quantitative en temps réel (qPCR)**
 - La qPCR est une technique quantitative qui permet de suivre en temps réel le processus d'amplification et de détecter les produits de PCR.
 - Elle peut être utilisée pour déterminer la concentration initiale de l'ADN cible, éliminant ainsi, dans la plupart des cas, le besoin de recourir à l'électrophorèse sur gel.

- Ce résultat est obtenu grâce à l'inclusion de l'un des éléments suivants:
 - o Colorants intercalants fluorescents non spécifiques, tels que SYBR Green, qui émettent une fluorescence lorsqu'ils se lient à l'ADN double brin.
 - o Sondes oligonucléotidiques fluorescentes spécifiques de séquence, telles que les sondes TaqMan, qui se lient spécifiquement aux séquences cibles d'ADN au sein de l'amplicon. Elles produisent une fluorescence grâce au couplage d'une molécule fluorescente à une extrémité et d'un extingueur (quencher) à l'autre extrémité; lors de la polymérisation, la sonde est clivée, libérant la molécule fluorescente (reporter), dont le signal n'est alors plus absorbé par l'extingueur.
- Pour les colorants fluorescents et les sondes, à mesure que le nombre de copies de l'ADN cible augmente, le niveau de fluorescence augmente proportionnellement, ce qui permet une quantification en temps réel.
- La qPCR utilise des thermocycleurs spécialisés contenant des systèmes de détection fluorescente qui surveillent le signal fluorescent pendant l'amplification.

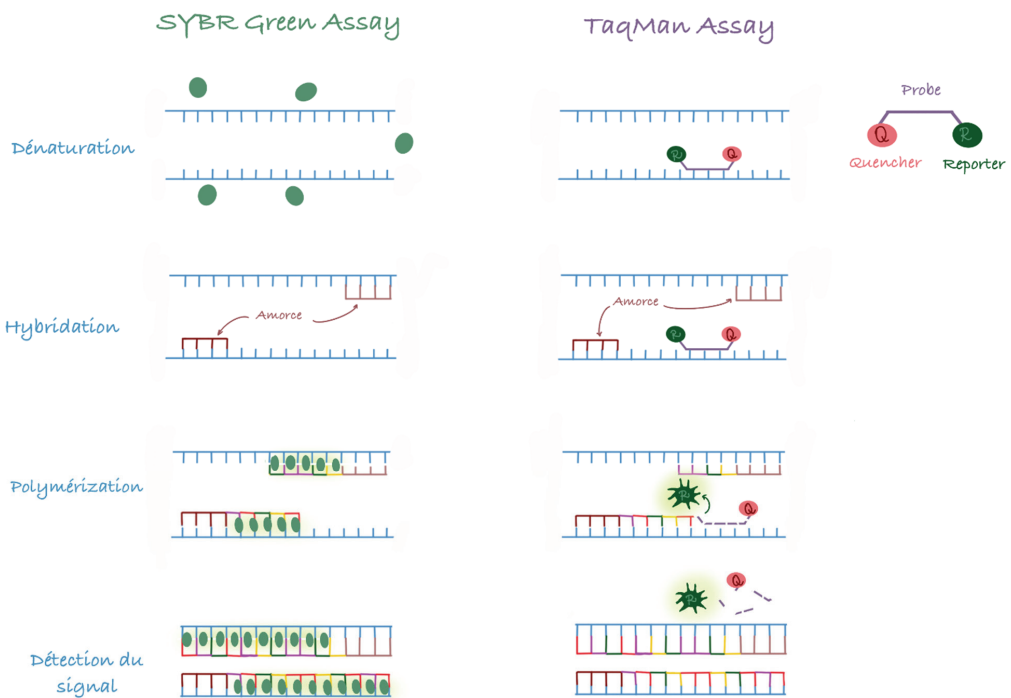


Figure 3. PCR - Colorants fluorescents SYBR Green et TaqMan

- **Transcription inverse-PCR (RT-PCR)**

- La transcription inverse est le processus de fabrication d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'ARN matrice simple brin
- La première étape de la réaction RT-PCR consiste à synthétiser un hybride ADN/ARN entre la matrice d'ARN et une amorce oligonucléotidique d'ADN.
- L'enzyme qui catalyse la réaction est appelée transcriptase inverse et a une activité RNase qui peut dégrader la partie ARN de l'hybride.

- Par conséquent, une molécule d'ADN simple brin est synthétisée par l'activité ADN polymérase de la transcriptase inverse.
- Pour une RT-PCR réussie, il est essentiel d'avoir un ARN de haute qualité et de pureté.
- **Transcription inverse-PCR quantitative (RT-qPCR)**
 - Cette méthode est utilisée pour la quantification de l'ARN dans des échantillons biologiques (soit des transcrits d'ARN, soit dérivés de génomes d'ARN viraux). Le processus de transcription inverse décrit ci-dessus peut servir de première étape de la qPCR.
 - Deux approches peuvent être utilisées lors de la réalisation de la RT-qPCR: la RT-qPCR en une étape et la RT-qPCR en deux étapes. Dans les deux cas, l'ARN est d'abord transcrit inversement en ADNc, qui est utilisé comme matrice pour l'amplification par qPCR. Dans l'approche en une étape, la réaction RT et la réaction PCR se produisent dans le même tube, tandis que dans la méthode en deux étapes, les deux réactions sont effectuées séparément et séquentiellement, comme deux expériences distinctes.
 - La transcription inverse (RT)-PCR et la RT-qPCR sont deux variantes couramment utilisées de la PCR permettant l'analyse de la transcription génique et la quantification de l'ARN viral, tant en clinique qu'en recherche.

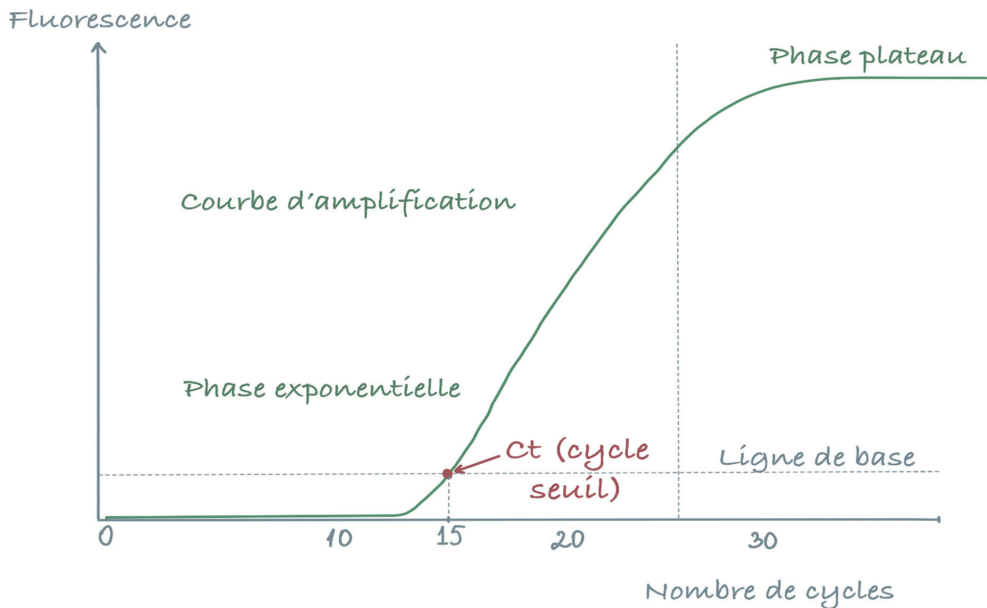


Figure 4. PCR - Courbe d'amplification

Applications de la PCR

- **Médecine et recherche biomédicale**
 - Tests diagnostiques pour les mutations génétiques associées à des maladies
 - Identification d'agents infectieux (bactéries, virus) à l'aide d'amorces spécifiques
 - Tests génétiques prénataux; Peut identifier les anomalies chromosomiques et les mutations génétiques chez le fœtus.
 - Une méthode prometteuse pour la détection précoce de certains cancers; peut également être très informatif dans le suivi de la chimiothérapie anticancéreuse

- **Médecine légale et médecine légale**
 - Tests de paternités
 - Des enquêtes médico-légales pour identifier les sources des échantillons (de petits échantillons d'ADN isolés sur une scène de crime peuvent être comparés à une base de données d'ADN ou à l'ADN des suspects).
- **Microbiologie environnementale et salubrité des aliments**
 - La détection d'agents pathogènes, non seulement dans les échantillons des patients, mais aussi dans les aliments ou l'eau, peut être essentielle pour diagnostiquer et prévenir les maladies infectieuses.
- **Recherche génétique**
 - L'analyse de la transcription de gènes, visant à évaluer la présence ou l'abondance de transcrits de gènes particuliers
 - Élucider les fonctions des gènes
 - En génotypage, la PCR peut être utilisée pour détecter les variations de séquence des allèles dans des cellules ou des organismes spécifiques. Génotypage d'organismes transgéniques, tels que les *souris knock-out* et *souris knock-in*. Le génotypage des plantes en agriculture aide les sélectionneurs, à affiner et à améliorer leur cheptel.
- **Séquençage**
 - La PCR peut être utilisée pour enrichir l'ADN matrice pour le séquençage
 - Dans le séquençage de Sanger, les fragments amplifiés par PCR sont ensuite purifiés et utilisés dans une réaction de séquençage
 - Dans le séquençage de nouvelle génération (NGS), la PCR est utilisée à l'étape de la préparation de la librairie, où les échantillons d'ADN sont enrichis par PCR afin d'augmenter la quantité initiale d'ADN.

ÉLECTROPHORÈSE

L'électrophorèse est une technique utilisée pour séparer et parfois purifier les macromolécules, en particulier les protéines et les acides nucléiques, qui diffèrent par leur taille, leur charge ou leur conformation. En tant que telle, c'est l'une des techniques les plus utilisées en biochimie et en biologie moléculaire.

Lorsque des molécules chargées sont placées dans un champ électrique, elles migrent vers le pôle positif ou négatif en fonction de leur charge. Contrairement aux protéines, qui peuvent avoir une charge positive nette ou négative, les acides nucléiques ont une charge négative constante conférée par leur squelette phosphate et migrent vers l'anode. Les protéines et les acides nucléiques sont séparés au sein d'une matrice ou « gel ». Le plus souvent, le gel est coulé sous la forme d'une plaque mince, avec des puits pour le chargement de l'échantillon. Le gel est immergé dans un tampon d'électrophorèse qui fournit des ions pour transporter un courant et un certain type de tampon pour maintenir le pH à une valeur relativement constante.

Gels d'électrophorèse

Le gel lui-même est composé d'agarose ou de polyacrylamide, chacun ayant des attributs adaptés à des tâches particulières:

- *L'agarose* = un polysaccharide extrait d'algues. Il est généralement utilisé à des concentrations de 0,5 à 2 %. Plus la concentration d'agarose est élevée, plus le gel est « rigide ». Les gels d'agarose sont extrêmement faciles à préparer: il suffit de mélanger la poudre d'agarose avec une solution tampon, de la faire fondre en la chauffant et de verser le gel. Il est également non toxique. Les gels d'agarose ont une large gamme de séparation, mais un pouvoir de résolution relativement faible. En faisant varier la concentration d'agarose, des fragments d'ADN d'environ 200 à 50 000 pb peuvent être séparés à l'aide de techniques électrophorétiques standard.
- *Le polyacrylamide* est un polymère réticulé de l'acrylamide. La longueur des chaînes de polymères est dictée par la concentration d'acrylamide utilisée, qui est généralement comprise entre 3,5 et 20 %.

La préparation des gels de polyacrylamide est nettement plus complexe que celle des gels d'agarose. Parce que l'oxygène inhibe le processus de polymérisation, ils doivent être versés entre des plaques de verre (ou des cylindres).

L'acrylamide est une neurotoxine puissante et doit être manipulé avec précaution ! Portez des gants jetables lors de la manipulation de solutions d'acrylamide et un masque lors de la pesée de poudre. Le polyacrylamide est considéré comme non toxique, mais les gels de polyacrylamide doivent également être manipulés avec des gants en raison de la présence possible d'acrylamide libre.

Les gels de polyacrylamide ont une plage de séparation assez petite, mais un pouvoir de résolution très élevé. Dans le cas de l'ADN, le polyacrylamide est utilisé pour séparer des fragments de moins de 500 pb environ. Cependant, dans des conditions appropriées, les fragments d'ADN dont la longueur diffère par une seule paire de bases sont facilement résolus. Contrairement à l'agarose, les gels de polyacrylamide sont largement utilisés pour séparer et caractériser les mélanges de protéines.

Préparation et utilisation de gels d'ADN d'agarose standard

L'équipement et les fournitures nécessaires à la réalisation de l'électrophorèse sur gel d'agarose sont relativement simples et comprennent:

- *Chambre d'électrophorèse* et *alimentation électrique*
- *Plateaux de coulée de gel*, disponibles dans une variété de tailles et composés de plastique transparent aux UV. Les extrémités ouvertes des plateaux sont fermées avec du ruban adhésif pendant que le gel est coulé, puis retirées avant l'électrophorèse.
- *Rayons d'échantillons*, autour desquels l'agarose fondue est versée pour former des puits d'échantillon dans le gel.
- *Tampon d'électrophorèse*, généralement Tris-acétate-EDTA (TAE) ou Tris-borate-EDTA (TBE).
- *Un tampon de chargement*, qui contient quelque chose de dense (par exemple, glycérol) pour permettre à l'échantillon de « tomber » dans les puits, et un ou deux colorants de suivi, qui migrent dans le gel et permettent un suivi visuel de l'état d'avancement de l'électrophorèse.
- *Le bromure d'éthidium*, un colorant fluorescent utilisé pour colorer les acides nucléiques. REMARQUE: Le bromure d'éthidium est un mutagène connu et doit être manipulé comme un produit chimique dangereux - portez des gants lors de la manipulation.
- *Transilluminateur* (boîte à lumière ultraviolette), qui est utilisé pour visualiser l'ADN coloré au bromure d'éthidium dans les gels. REMARQUE: portez toujours des lunettes de protection lorsque vous observez l'ADN sur un transilluminateur pour éviter d'endommager les yeux à cause de la lumière UV.

Pour verser un gel, la poudre d'agarose est mélangée avec un tampon d'électrophorèse à la concentration souhaitée, puis chauffée dans un four à micro-ondes jusqu'à ce qu'elle soit complètement fondue. Le plus souvent, le bromure d'éthidium est ajouté au gel (concentration finale de 0,5 g/ml) à ce stade pour faciliter la visualisation de l'ADN après l'électrophorèse. Après avoir refroidi la solution à environ 60 °C, elle est versée dans un plateau de coulée contenant un peigne d'échantillon et laissée se solidifier à température ambiante.

Une fois le gel solidifié, le peigne est retiré, en prenant soin de ne pas déchirer le fond des puits. Le gel, toujours dans son plateau en plastique, est inséré horizontalement dans la chambre d'électrophorèse et juste recouvert d'un tampon. Les échantillons contenant de l'ADN mélangé à un tampon de chargement sont ensuite pipetés dans les puits d'échantillons, le couvercle et les fils d'alimentation sont placés sur l'appareil et un courant est appliqué. Vous pouvez confirmer que le courant circule en observant les bulles qui se détachent des électrodes. L'ADN migrera vers l'électrode positive, qui est généralement de couleur rouge.

La distance à laquelle l'ADN a migré dans le gel peut être jugée en surveillant visuellement la migration des colorants de suivi. Les colorants au bleu de bromophénol et au cyanol de xylène migrent à travers les gels d'agarose à peu près au même rythme que les fragments d'ADN double brin de 300 et 4000 pb, respectivement. Lorsque la migration adéquate s'est produite, les fragments d'ADN sont visualisés par coloration au bromure d'éthidium. Ce colorant fluorescent s'intercale entre les bases de l'ADN et de l'ARN. Il est souvent incorporé dans le gel de sorte que la coloration se produit pendant l'électrophorèse, mais le gel peut également être coloré après l'électrophorèse en le trempant dans une solution diluée de bromure d'éthidium. Pour visualiser l'ADN ou l'ARN, le gel est placé sur un transilluminateur ultraviolet. Sachez que l'ADN se diffusera dans le gel au fil du temps, et l'examen ou la photographie doit avoir lieu peu de temps après l'arrêt de l'électrophorèse.

Migration des fragments d'ADN dans l'agarose

Des fragments d'ADN linéaire migrent à travers des gels d'agarose avec une mobilité inversement proportionnelle au $\log_{10}$ de leur poids moléculaire. En d'autres termes, si vous tracez la distance entre les fragments d'ADN et le $\log_{10}$ de leur poids moléculaire ou de leur nombre de paires de bases, une ligne à peu près droite apparaîtra.

Les formes circulaires de l'ADN migrent dans l'agarose différemment des ADN linéaires de même masse. En règle générale, les plasmides non coupés semblent migrer plus rapidement que le même plasmide lorsqu'ils sont linéarisés. De plus, la plupart des préparations de plasmide non coupé contiennent au moins deux formes d'ADN topologiquement différentes, correspondant à des formes super enroulées et à des cercles entaillés.

Plusieurs facteurs supplémentaires ont des effets importants sur la mobilité des fragments d'ADN dans les gels d'agarose et peuvent être utilisés à votre avantage pour optimiser la séparation des fragments d'ADN. Les principaux de ces facteurs sont les suivants:

- **Tension:** Lorsque la tension appliquée à un gel augmente, les fragments plus gros migrent proportionnellement plus vite que les petits fragments. Pour cette raison, la meilleure résolution des fragments de plus de 2 kb environ est obtenue en n'appliquant pas plus de 5 volts par cm au gel (la valeur en cm est la distance entre les deux électrodes, et non la longueur du gel).
- **Tampon d'électrophorèse:** Plusieurs tampons différents ont été recommandés pour l'électrophorèse de l'ADN. Les plus couramment utilisés pour l'ADN duplex sont le TAE (Tris-acétate-EDTA) et le TBE (Tris-borate-EDTA). Les fragments d'ADN migreront à des rythmes quelque peu différents dans ces deux tampons en raison des différences de force ionique. Les tampons établissent non seulement un pH, mais fournissent des ions pour soutenir la conductivité. Si vous utilisez par erreur de l'eau au lieu d'un tampon, il n'y aura pratiquement aucune migration de l'ADN dans le gel ! À l'inverse, si vous utilisez un tampon concentré (par exemple une solution mère 10X), suffisamment de chaleur peut être générée dans le gel pour le faire fondre.
- **Concentration d'agarose:** En utilisant des gels avec différentes concentrations d'agarose, on peut résoudre différentes tailles de fragments d'ADN. Des concentrations plus élevées d'agarose facilitent la séparation des petits ADN, tandis que de faibles concentrations d'agarose permettent la résolution des ADN plus gros.
- **Bromure d'éthidium:** Le bromure d'éthidium est un colorant fluorescent qui s'intercale entre les bases des acides nucléiques et permet une détection très pratique des fragments d'ADN dans les gels. Comme décrit ci-dessus, il peut être incorporé dans des gels d'agarose ou ajouté à des échantillons d'ADN avant le chargement pour permettre la visualisation des fragments à l'intérieur du gel. Comme on pouvait s'y attendre, la liaison du bromure d'éthidium à l'ADN modifie sa masse et sa rigidité, et donc sa mobilité.

Autres considérations

Les gels d'agarose, comme nous l'avons vu ci-dessus, constituent le moyen le plus couramment utilisé d'isoler et de purifier des fragments d'ADN, ce qui est une condition préalable à la construction de tout type de molécule d'ADN recombinant.

En variant la composition du tampon et les conditions de fonctionnement, l'utilité des gels d'agarose peut être étendue. En voici quelques exemples:

- L'électrophorèse en champ pulsé est une technique dans laquelle la direction du flux de courant dans la chambre d'électrophorèse est périodiquement modifiée. Cela permet le fractionnement de morceaux d'ADN allant de 50 000 à 5 millions de pb, ce qui est beaucoup plus grand que ce qui peut être résolu sur des gels standard.
- Les gels d'agarose alcaline sont préparés et utilisés dans des tampons contenant de l'hydroxyde de sodium. De telles conditions alcalines sont utiles pour l'analyse de l'ADN simple brin.

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

Électrophorèse sur gel d'agarose de fragments d'ADN

Le principe de la méthode

Les fragments d'ADN migrent différenciellement dans le champ électrique à travers une matrice de gel d'agarose, à pH alcalin, en fonction de leur taille. Les résultats de l'électrophorèse sont différentes bandes électrophorétiques qui peuvent être visualisées dans la lumière UV en utilisant le bromure d'éthidium comme marqueur fluorescent qui est intercalé entre les 2 brins d'un ADN double brin.

Étapes

- *Préparation du gel d'agarose*
 - Fixez le plateau de gel
 - Poids 0,1 g d'agarose dans un bécher de 50 mL
 - Ajouter 20 mL de tampon de travail TAE
 - Réchauffez l'agarose à ébullition; Pour arrêter l'évaporation, couvrez le bécher avec une verre de montre. Faites bouillir le mélange jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissoute
 - Lorsque la dissolution est terminée, le bécher est introduit dans le bain-marie à 60 °C
 - Ajouter 3 µL de bromure d'éthidium au gel d'agarose et mélanger.
 - Après plusieurs minutes, lorsque la solution a atteint 60 °C, elle est transférée très soigneusement dans le plateau fixe pour ne pas former de bulles dans le gel
 - Fixez le peigne dans le gel pour créer les puits pour l'échantillon
 - Conservez le gel à température ambiante 20 min pour polymériser
 - Après 20 min, retirez le peigne
 - Retirez le plateau de gel du support
- *Préparation des échantillons*
 - 5 µL d'échantillon d'ADN sont mélangés avec 1 µL de solution de chargement 6x dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL
 - Pour comparer la taille des fragments, une échelle d'ADN est utilisée. Pour la préparation d'échantillons en échelle, mélanger 5 µL de DNA Marker sont mélangés avec 1 µL 6x solution de chargement dans des tubes Eppendorf de 0,7 ml
- *Chargement d'échantillons et exécution de l'électrophorèse*
 - Dans les chambres d'électrophorèse, ajouter 300 ml de 1x solution tampon TAE
 - Le plateau de gel est fixé dans la chambre d'électrophorèse avec les puits orientés vers l'électrode négative (électrode rouge)
 - Chargez 10 µL de chaque échantillon dans chaque puits à l'aide d'une micropipette en changeant la pointe à chaque fois après chaque échantillon
 - Fermez le couvercle de la chambre d'électrophorèse
 - Connectez la chambre d'électrophorèse à l'alimentation électrique
 - L'alimentation électrique est connectée au réseau électrique puis est fixée à 75V
 - Allumez l'alimentation électrique
 - Le processus de migration prend 20 à 30 min
 - Lorsque la migration est terminée (le bleu de brom-phénol est presque à la fin du gel), coupez l'alimentation électrique
- *Visualisation UV*
 - Retirez le gel du plateau de la chambre d'électrophorèse et essuyez-le avec du papier filtre
 - Insérez le plateau de gel sous l'écran de protection du transilluminateur UV
 - Allumez le transilluminateur
 - Comparez la taille du fragment du produit PCR avec le marqueur d'ADN pour confirmer la taille du produit et le succès de la réaction PCR.

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L3. EXAMEN BIOCHIMIQUE DU SANG

OBJECTIFS D'APPRENTISSAGE

Décrivez la composition et les principaux composants du sang (plasma et éléments formés).

Différenciez le sang total, le sérum et le plasma, et identifiez les usages cliniques appropriés pour chacun.

Reconnaître les sources courantes d'erreur pré-analytique (hémolyse, lipémie, ictère) et comprendre leurs effets sur les résultats des tests.

Expliquez le rôle des anticoagulants et l'utilisation appropriée des différents tubes de collecte sanguine.

Effectuez et interprétez une détermination rapide de la glycémie globale.

POINTS CLÉS

Le sang est constitué d'une phase liquide (plasma, 50-60 %) contenant des protéines, électrolytes et métabolites, et d'une phase solide (érythrocytes, leucocytes, thrombocytes).

Le sérum est « un plasma » sans facteurs de coagulation; Le plasma conserve tous les facteurs de coagulation grâce à l'anticoagulant ajouté lors de la collecte.

L'hémolyse, la lipémie et l'ictère sont les trois principales interférences pré-analytiques pouvant falsifier les résultats des tests biochimiques par des effets spectraux, chimiques ou dilutionnels.

Le choix de l'anticoagulant dépend du test: EDTA pour l'hématologie, citrate pour les études de coagulation, fluorure pour la conservation du glucose.

La glycémie (déterminée par la méthode de la glucose oxydase) est le marqueur central du métabolisme des glucides et le test biochimique le plus fréquemment demandé.

ASPECTS GENERAUX

Le sang relie toutes les cellules du corps, et des changements dans sa composition peuvent indiquer un état pathologique ou physiologique. Le sang représente 6 à 8 % du poids corporel total, et un adulte en bonne santé en consomme environ 5 litres.

Le sang est le principal échantillon biologique analysé en laboratoire. Un examen biochimique sanguin est nécessaire pour établir le diagnostic positif, le diagnostic différentiel ainsi que pour le suivi du traitement et de l'évolution de la maladie. Plusieurs étapes sont nécessaires pour les analyses de sang.

COMPOSITION DU SANG

Il est considéré comme un tissu liquide et hétérogène, composé de deux composants principaux:

- Phase liquide: Représentée par le plasma, une solution aqueuse de protéines, de sels minéraux et tamponnée à un pH de 7,35-7,45. Le plasma représente 50 à 60 % du volume sanguin. Le plasma est un liquide transparent, légèrement jaunâtre, composé de:
 - Eau
 - Substances inorganiques (telles que le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium, le phosphate, le chlorure, le zinc, le fer et le bicarbonate),
 - Les substances organiques azotées (comme les protéines, l'urée, la créatinine, la bilirubine), et
 - Substances organiques non azotées (telles que le glucose, le cholestérol, les triglycérides, les acides gras libres et les phospholipides).
- Phase solide: représentée par les éléments formés, qui sont en suspension dans la phase liquide. Les cellules sanguines représentent 40 à 45 % du volume sanguin et sont constituées de globules rouges (érythrocytes), de globules blancs (leucocytes) et de plaquettes (thrombocytes).

PRÉLÈVEMENT DE SANG

Selon le site de prélèvement (parties du système circulatoire), les échantillons de sang peuvent être capillaires, veineux ou artériels. Chaque type d'échantillon sert à des fins spécifiques dans le diagnostic médical, car il fournit des informations variables sur la santé du corps.

- *Sang capillaire*: Recueilli dans les capillaires du bout du doigt (pour les adultes) ou du talon (pour les nourrissons). Généralement obtenu par une méthode de piqûre au doigt, même dans les lieux de soins. Ce type de sang est généralement utilisé pour les tests rapides, comme les mesures de glucose.
- *Sang artériel*: Prélevé dans une artère (souvent l'artère radiale) pour des tests qui mesurent les gaz sanguins, tels que les niveaux d'oxygène et de dioxyde de carbone, et le pH.
- *Sang veineux*: Prélevé dans une veine (souvent la veine cubitale, mais aussi dans les veines jugulaires chez les enfants et dans les fontanelles chez les nourrissons), c'est le type le plus couramment utilisé pour un large éventail de tests, y compris les tests plasmatiques et sériques.

Actuellement, le sang utilisé dans les analyses est obtenu à jeun. Le taux de sodium, de potassium, de calcium, de chlorure, d'urée, de créatinine, d'acide urique, de protéines totales, de cholestérol, d'amylase, de phosphatase alcaline, de transaminase et de cholinestérase reste inchangé dans le sang même dans le cas d'un petit-déjeuner léger, mais l'utilisation du sang après 8 à 10 heures de jeûne est recommandée.

La position du corps pendant le processus de prise de sang pourrait augmenter la valeur des protéines sériques totales de 6,6 g/dl en position clinostatique à 7,6 g/dl en position orthostatique.

ÉCHANTILLONS DE SANG

Il existe plusieurs types d'échantillons de sang couramment prélevés pour les tests de laboratoire, selon le type de test requis. Les principaux types comprennent:

- *Sang total:*

- Le sang total est prélevé sans séparer le plasma ou les cellules.
- Le sang total n'est utilisé pour différentes déterminations que dans le cas où la concentration de ces composés analysés est égale dans les érythrocytes et le plasma (le glucose en est un exemple).
- Il est généralement utilisé pour des tests tels que la formule sanguine complète (FSC), le groupe sanguin et certains tests métaboliques.

- *Sérum:*

- Le sérum est obtenu à partir de sang qu'on a laissé coaguler, à partir de sang prélevé sans anticoagulant.
- Pour obtenir du sérum, l'échantillon de sang peut être centrifugé. Le sérum représente la phase surnageante, tandis que la phase inférieure est le coagulum (caillot).
- Le coagulum se forme également si le sang reste pendant 30 à 60 minutes à température ambiante ou 15 à 20 minutes à 37°C. Le coagulum est un réseau de fibrine contenant des éléments figuratifs sanguins.
- Le sérum ne contient pas les facteurs de coagulation sanguine.
- Le sérum est couramment utilisé pour les tests biochimiques, immunologiques et sérologiques.

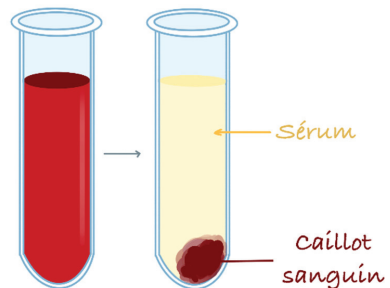


Figure 1. Séparation du sérum

- *Plasma:*

- Le plasma est obtenu à partir de sang prélevé sous anticoagulant (fluorure, oxalate, citrate, EDTA, héparine, etc.).
- Pour obtenir du plasma, l'échantillon de sang est centrifugé, les éléments figuratifs du sang restant sous forme de pastille au fond du tube et le plasma étant récupéré en tant que surnageant.
- Contrairement au sérum, le plasma contient les facteurs de coagulation.
- Le plasma est utilisé pour des tests nécessitant la mesure de facteurs de coagulation, d'électrolytes, d'hormones et de certaines protéines.

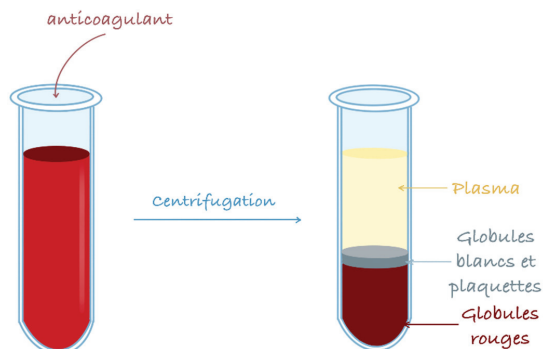


Figure 2. Séparation du plasma

Il n'y a pas de différence entre les concentrations sériques et plasmatiques, à l'exception de certaines enzymes (phosphatase acide, LDH, aldolase) qui sont libérées des thrombocytes pendant le processus de coagulation sanguine.

Les dosages biochimiques dans le plasma ainsi que dans le sérum doivent être effectués dans l'intervalle de 4 heures à compter de la prise de sang dans le cas d'un stockage du sang à température ambiante et sans séparation des globules rouges. Si les globules rouges sont séparés, le sérum et le plasma pourraient être conservés à 4 °C toute la nuit. Les dosages effectués après 24 h nécessitent la conservation du sérum et du plasma par congélation.

Les anticoagulants sont des substances qui s'ajoutent au sang collecté pour arrêter le processus de coagulation. Les anticoagulants agissent en liant le calcium (EDTA, citrate, oxalate - forment des sels de calcium insolubles) ou en interférant avec d'autres étapes de la cascade de coagulation (héparine – se lie à la thrombine). Des exemples de coagulants sont:

- **L'EDTA, éthylènediaminetétraacétate** (sels de sodium ou de potassium) est l'anticoagulant privilégié pour les procédures d'hématologie (vacutainer violet) car il ne déforme pas la morphologie cellulaire et ne produit pas d'artefacts cellulaires. Il n'est pas recommandé pour les dosages du calcium, des électrolytes et de la phosphatase alcaline.
- **L'oxalate** (sels de sodium, de potassium ou de lithium) n'est pas indiqué dans les dosages des électrolytes (ions sodium ou potassium), du calcium et des enzymes (LDH)
- **Le citrate** (sels de sodium ou de potassium) est utilisé pour prévenir la coagulation pour les études de coagulation (vacutainer bleu) ou la détermination de la vitesse de sédimentation des érythrocytes (vacutainer noir). Il présente les mêmes inconvénients que l'oxalate.
- **L'héparine** (sels de sodium ou de lithium) est un polysaccharide qui empêche la coagulation sanguine par inactivation des produits chimiques de coagulation sanguine thrombine et thromboplastine (tube vert). C'est le meilleur anticoagulant pour les études cytogénétiques, les tests hématologiques spéciaux (fragilité osmotique et hémoglobine plasmatique). L'héparine étant l'anticoagulant physiologique, elle réserve le mieux les propriétés physiques et chimiques du sang. Avec l'héparine d'ammonium, tous les métabolites, électrolytes et enzymes ont pu être évalués, à l'exception de l'ammonium et de la phosphatase acide.
- **Le fluorure** (sels de sodium ou de potassium) est utilisé dans les déterminations de glucose car il inhibe le processus de glycolyse, ce qui est utile dans le cas où les déterminations de glucose sont effectuées après plus de 4 heures (vacutainer gris).
- **La solution ACD** contient de l'acide citrique, du citrate de sodium et du glucose dans de l'eau distillée (vacutainer jaune). Il est utilisé pour la conservation du sang donné.

Sources d'erreur

L'aspect normal du sérum et du plasma est jaune pâle et clair. L'analyse sérique et plasmatique doit être évitée lorsque l'aspect normal est modifié. Il y a trois modifications majeures qui peuvent conduire à des interférences:

- **Sérum ou plasma hémolysé (couleur rose à rouge)**
 - L'hémolyse est généralement un artefact *in vitro* dû à une mauvaise technique de ponction veineuse, à la congélation d'échantillons de sang total, à une séparation retardée du sérum ou du plasma des cellules ou à une soumission tardive des échantillons.
 - L'hémolyse peut également se produire *in vivo* notamment lorsque la concentration intracellulaire des composés analysés est supérieure à leur concentration sérique (LDH, ALAT, ASAT, potassium).
 - Les interférences de l'hémolyse avec les tests biochimiques sont les suivantes:
 - Augmentation de l'absorbance: La libération d'hémoglobine augmente l'absorbance dans la plage spectrale de l'hémoglobine. Cela peut interférer avec la détermination de la bilirubine ou du cholestérol

- Inhibition des réactions: L'hémoglobine libérée peut inhiber directement les réactions chimiques.
- Libération d'analytes: La libération d'analytes trouvés à des concentrations élevées dans les globules rouges augmentera faussement les valeurs de ces analytes.
- Libération d'enzymes: libération d'enzymes qui participent à des réactions chimiques, par exemple l'adénylate kinase
- Libération d'eau: La libération d'eau des globules rouges dilue les analytes.
- *Sérum ou plasma ictérique (couleur brun orangé)*
 - Le sérum ou le plasma ictérique se produit lorsque le sang est fortement concentré en bilirubine, dans la jaunisse
 - Les interférences de l'hyperbilirubinémie avec les tests biochimiques sont les suivantes:
 - Absorbance modifiée: Les propriétés spectrales de la bilirubine pourraient interférer de manière significative avec les déterminations colorimétriques à 400-500 nm.
 - Liaison chimique: La bilirubine a la capacité de réagir avec d'autres réactifs.
- *Sérum ou plasma lactescent (aspect trouble/laiteux)*
 - La lipémie (lactescence) est causée par une augmentation de la concentration de triglycérides (sous forme de chylomicrons ou de lipoprotéines de très basse densité) dans le sang
 - Les interférences de l'hémolyse avec les tests biochimiques sont les suivantes:
 - Diffusion de la lumière: Entraîne une augmentation erronée de l'absorbance de certains analytes tels que la bilirubine totale.
 - Déplacement de volume: Cela diminue faussement les valeurs de certains analytes tels que les électrolytes.
 - Hémolyse: La lyse des érythrocytes est renforcée en présence de lipémie.

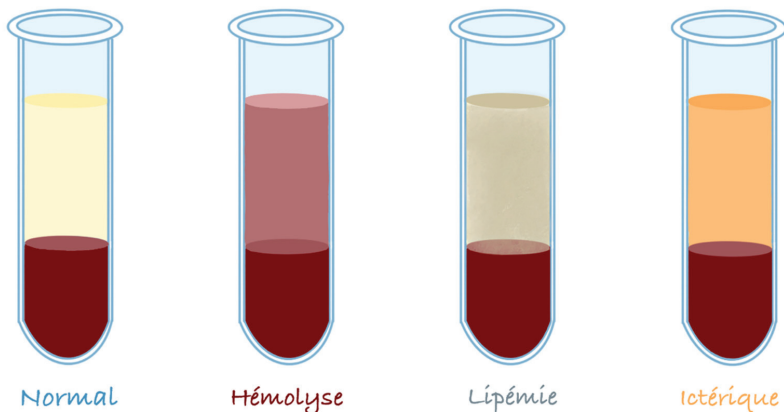


Figure 3. Erreurs de collecte de sérum/plasma

EXAMEN BIOCHIMIQUE DU SANG

L'examen biochimique du sang vise à étudier les métabolismes du glucose, des lipides et des protéines ainsi que certains systèmes et appareils du corps humain.

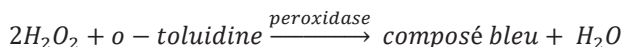
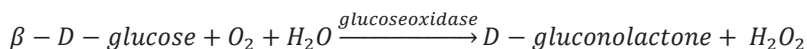
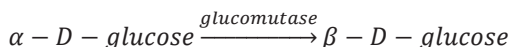
- *L'examen biochimique du métabolisme du glucose:*
 - Détermination de la glycémie (la plus fréquemment utilisée)
 - Test de tolérance au glucose pour trouver les cas de diminution de la tolérance au glucose qui apparaissent avant l'installation du diabète sucré.
 - Hémoglobine glyquée (test d'hémoglobine A1c) qui donne des informations sur le taux de glucose de 6 à 8 semaines avant l'analyse.
- *L'examen biochimique du métabolisme des lipides:*
 - Taux de cholestérol total: Souhaitable - Moins de 200 mg/dL, Risque limite élevé - 200 à 239 mg/dL, Risque élevé - 240 mg/dL et plus
 - HDL et LDL-cholestérol. Cette détermination est utilisée dans le diagnostic de l'hyperlipoprotéinémie primaire et secondaire.
 - Détermination des triglycérides sériques. Contrairement aux taux de cholestérol qui sont constants, les taux de triglycérides fluctuent considérablement quotidiennement et sont les plus élevés 1 à 4 heures après les repas.
- *L'examen biochimique du métabolisme des protéines:*
 - Déterminations des protéines totales à partir du sérum (qui permettent d'étudier le fonctionnement des organes – foie, rein)
 - Électrophorèse des protéines. Permet d'analyser le rapport entre les fractions protéiques (albumines, globulines, fractions de globulines).
- *L'examen biochimique du métabolisme minéral (détermination des ions sériques):*
 - Cations sériques: sodium, potassium, calcium, magnésium, fer
 - Anions sériques: phosphate, chlorure
- *L'examen biochimique de l'équilibre acido-basique:*
 - Réserve alcaline
 - pH sanguin
- *L'examen biochimique de l'appareil digestif:*
 - ALT = alanine transaminase (GPT = glutamate-pyruvate transaminase)
 - AST = aspartate transaminase (GOT = glutamate-oxaloacétate transaminase)
 - Gamma glutamyl transpatase/transpeptidase (GGT)
 - Phosphatase alcaline (ALP)
 - Cholinestérase
 - Amylase
 - Lipase
- *L'examen biochimique du système cardiovasculaire:*
 - Créatine kinase ou créatine phosphokinase (CPK, CPK-MB)
 - Lactate déshydrogénase (LDH)
 - Aspartate transaminase (AST)
- *L'examen biochimique de l'appareil réno-urinaire:*
 - Urée
 - Créatinine; Clairance de la créatinine endogène
 - Cystatine C
 - Acide urique*

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

Test rapide pour la détermination de la glycémie

Principe de la méthode

Le β -D-glucose est oxydé enzymatiquement par le glucose oxydase en présence d'eau et d'oxygène en guconolactone et en peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène résultant de cette réaction est décomposé, produisant de l'eau et de l'oxygène atomique qui oxydent l'o-tolidine en un composé de couleur bleue.



Déterminations de la glycémie

Le glucose sert de source d'énergie primaire pour la plupart des cellules du corps, en particulier pour le cerveau et les globules rouges, qui dépendent presque entièrement de la glycémie pour produire de l'énergie. Le cerveau a besoin que la glycémie reste dans une plage spécifique pour fonctionner normalement; des concentrations inférieures à 30 mg/dL ou supérieures à 300 mg/dL peuvent entraîner de la confusion ou une perte de conscience. La glycémie est généralement de 10 à 15 % plus élevée que la glycémie totale, avec une différence encore plus grande après le repas.

Les glucomètres à domicile (tests rapides) mesurent la glycémie totale, tandis que les tests de laboratoire évaluent généralement la glycémie. La méthode rapide de détermination de la glycémie est particulièrement utile pour évaluer l'efficacité des traitements du diabète à domicile ou dans des contextes médicaux aux ressources limitées où des évaluations rapides sont nécessaires. La surveillance de sa glycémie à l'aide d'un glucomètre est communément appelée autosurveillance de la glycémie, ou **ASG**.

Les tests rapides utilisent des bandes de plastique avec des réactifs immobilisés à une extrémité, permettant les réactions requises. En piquant le doigt avec une lancette stérile et en plaçant une goutte de sang dans la zone réactive de la bandelette, la réaction se produit. Un photomètre portable mesure l'absorbance du produit coloré résultant, affichant le résultat en mg/dL. Les lecteurs étalonnés au plasma convertissent les lectures de sang total en valeurs équivalentes au plasma, conformément à la norme utilisée par les professionnels de la santé.

Certains glucomètres permettent de tester à partir d'autres sites, tels que le haut du bras, l'avant-bras, la base du pouce ou la cuisse. Bien que pratiques, ces sites alternatifs peuvent produire des résultats qui diffèrent des lectures du bout des doigts en raison de changements de glycémie plus lents dans ces zones. Cet écart est dû à des différences physiologiques plutôt qu'à la précision du compteur.

Tests de tolérance au glucose par voie orale

Dans le test de tolérance au glucose oral (TTGO), la glycémie est mesurée deux heures après que le patient a consommé 75 grammes de glucose. Une lecture de 200 mg/dL ou plus (après 2 heures) indique un diabète.

Hémoglobine glyquée (test HbA1c)

Avec ce test, une variation de 1 % de l'HbA1c correspond à une variation d'environ 30 mg/dL (1,67 mmol/L) de la glycémie moyenne. Par exemple, une HbA1c de 6 % correspond à un taux de glucose moyen de 135 mg/dL (7,5 mmol/L), tandis qu'une HbA1c de 9 % correspond à un taux de glucose moyen de 240 mg/dL (13,5 mmol/L). Le maintien d'une HbA1c proche de 6 % indique un bon contrôle du diabète et minimise le risque de complications. Des taux plus élevés d'HbA1c sont associés à une augmentation des complications.

ÉTUDE DE CAS

1. Patient: C.-B., sexe: F, 70 ans

Le patient présente les symptômes suivants: fatigue générale, obésité, mauvaise vue (mauvaise vision), eczéma, dysurie, pollakiurie. Le médecin recommande d'effectuer l'analyse biochimique suivante; Comparez ces valeurs avec les valeurs normales et établissez un diagnostic éventuel.

Examen biochimique du sang

Dénomination	Résultat	Plage de référence	Dénomination	Résultat	Plage de référence
Glycémie à jeun	240 mg/dl	75 à 115 mg/dl	Bilirubine directe	0,4 mg/dl	<0,2 mg/dl
HbA1c	9 %	4-6 %	Bilirubine totale	1,5 mg/dl	<1 mg/dl
L'ALAT	20 U/l	F: 10-22 U/l M: 10-29 U / l	Protéines totales	5,5 g/dl	6,2 à 8 g/dl
ASAT	19 U/l	F: 10-21 U/l M: 10-25 U / l	Hémoglobine	13,6 g/dl	F: 12-16 g/dl M: 14-18 g/dl
Urée	55 mg/dl	15 à 45 mg/dl	hsCRP	6 mg/l	<1 mg/l de risque CV faible 1-3 mg/l risque CV moyen >3 mg/l de risque CV élevé
Créatinine	1,7 mg/dl	F<0,9 mg/dl M<1,1 mg/dl	cTnI	0,09 ng/ml	0,01 à 0,40 ng/ml
Clairance de la créatinine	90 ml/min	95 à 150 ml/min	Cystatine C	1,30 mg/l	0,49 à 1,13 mg/l
Acide urique	5 mg/dl	F: 2,5-7 mg/dl M: 3-9 mg/dl	Réserve alcaline	22 mEq/l	22 à 27 mEq/l
Amylase	77 U/l	50 à 100 U/l	Na+	135 mEq/l	135 à 145 mEq/l
Cholestérol total	255 mg/dl	140- 200 mg/dl	K+	5,4 mEq/l	3,8 à 5,4 mEq/l
Cholestérol HDL	10 mg/dl	F:45-65 mg/dl M: 35 à 55 mg/dl	TSH	3,1 mU/ml	0,27 à 4,20 µUI/ml
Triacylglycérols	300 mg/dl	F: 40-140 mg/dl M:60-165mg/dl	ft3	2,9 pg/ml	2,2 à 5,5 pg/ml
La LDH	209 U/l	F:135-215 U/l M: 135-225 U / l	ft4	1,8 ng/dl	0,7 à 2,2 ng/dl
CKMB	5 U/l	2-10 U/l	GGT	22 U/l	F: 5-40 U/l M: 8-61 U/l
			Phosphatase alcaline	180 U/l	F: <240 U/l M:<270 U/l

Examen biochimique de l'urine

Dénomination	Résultat	Plage de référence
Densité	1.030	1.015- 1.025
pH	9.0	6.5
Protéine	+(30mg/dl)	Négatif
Glucose	+(100mg/dl)	Négatif
Corps cétoniques	+(15mg/dl)	Négatif
UBG	normal	normal
bilirubine	Négatif	Négatif
Nitrites	+	Négatif
Leucocytes	+(25/µl)	Négatif
Globules rouges	Négatif	Négatif

2. Patient: CD, sexe: M, 18 ans

Le patient présente les symptômes suivants: fatigue, anorexie, nausées, vomissements, haleine d'acétone, déshydratation, perte de poids, polyurie. Le médecin recommande d'effectuer l'analyse ci-dessous. Comparez ces valeurs avec les valeurs normales et établissez un diagnostic éventuel.

Examen biochimique du sang

Dénomination	Résultat	Plage de référence	Dénomination	Résultat	Plage de référence
Glycémie à jeun	400 mg/dl	75 à 115 mg/dl	Bilirubine directe	0,2 mg/dl	<0,2 mg/dl
HbA1c	10 %	4-6 %	Bilirubine totale	0,9 mg/dl	<1 mg/dl
L'ALAT	25 U/l	F: 10-22 U/l M: 10-29 U / l	Protéines totales	7,0 g/dl	6,2 à 8 g/dl
ASAT	20 U/l	F: 10-21 U/l M: 10-25 U / l	Hémoglobine	14,6 g/100 ml	F: 12-16 g/dl M: 14-18 g/dl
Urée	50 mg/dl	15 à 45 mg/dl	hsCRP	5 mg/l	<1 mg/l de risque CV faible 1-3 mg/l risque CV moyen >3 mg/l de risque CV élevé
Créatinine	1,1 mg/dl	F<0,9 mg/dl M<1,1 mg/dl	cTnI	0,1 ng/ml	0,01 à 0,40 ng/ml
Clairance de la créatinine	100 ml/min	95 à 150 ml/min	Cystatine C	0,89 mg/l	0,49 à 1,13 mg/l
Acide urique	5 mg/dl	F: 2,5-7 mg/dl M: 3-9 mg/dl	Réserve alcaline	18 mEq/l	22 à 27 mEq/l
Amylase	73 U/l	50 à 100 U/l	Na+	125 mEq/l	135 à 145 mEq/l
Cholestérol total	150 mg/dl	140- 200 mg/dl	K+	7,9 mEq/l	3,8 à 5,4 mEq/l
Cholestérol HDL	40 mg/dl	F:45-65 mg/dl M: 35 à 55 mg/dl	TSH	3,1 mU/ml	0,27 à 4,20 µUI/ml
Triacylglycérols	100 mg/dl	F: 40-140 mg/dl M:60-165mg/dl	ft3	2,9 pg/ml	2,2 à 5,5 pg/ml
La LDH	222 U/l	F:135-215 U/l M: 135-225 U / l	ft4	1,8 ng/dl	0,7 à 2,2 ng/dl
CKMB	8 U/l	2-10 U/l	GGT	19 U/l	F: 5-40 U/l M: 8-61 U/l
			Phosphatase alcaline	188 U/l	F: <240 U/l M:<270 U/l

Examen biochimique de l'urine

Dénomination	Résultat	Plage de référence
Densité	1.030	1.015- 1.025
pH	5.0	6.5
Protéine	Négatif	Négatif
Glucose	+++ (1000mg/dl)	Négatif
Corps cétoniques	++ (40mg/dl)	Négatif
UBG	normal	normal
bilirubine	Négatif	Négatif
Nitrites	Négatif	Négatif
Leucocytes	Négatif	Négatif
Globules rouges	Négatif	Négatif

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L4. EXAMEN BIOCHIMIQUE DE L'URINE

OBJECTIFS D'APPRENTISSAGE

Décrivez la composition et les propriétés physiques et chimiques normales de l'urine.

Choisissez la méthode de prélèvement d'urine appropriée pour un diagnostic donné.

Effectuer et interpréter une analyse urinaire macroscopique, y compris l'évaluation de la couleur, de la clarté et de la densité spécifique.

Identifier et interpréter les résultats d'un test biochimique de bandelettes urinaires.

Examinez et interprétez l'apparence microscopique des éléments sédimentaires urinaires.

POINTS CLÉS

L'urine normale est composée d'environ 95 % d'eau et de composés hydrosolubles: urée, acide urique, créatinine et électrolytes. La composition varie selon l'alimentation, l'hydratation et la fonction rénale.

La méthode de prélèvement d'urine (aléatoire, urine du premier matin, 24h/24, cathéter) doit être adaptée à l'exigence analytique spécifique et correctement documentée.

L'examen macroscopique évalue la couleur, la transparence, l'odeur et la densité spécifique (plage normale: 1,005-1,030).

L'examen biochimique fournissent des résultats rapides et semi-quantitatifs pour les protéines, le glucose, les cétones, le sang, la bilirubine, l'urobilinogène, l'estérase leucocytaire et les nitrites.

L'examen microscopique des sédiments identifie les éléments cellulaires (érythrocytes, leucocytes, cellules épithéliales), les moulages et les cristaux, et guide l'interprétation clinique.

ASPECTS GENERAUX

- L'urine est un fluide biologique, un sous-produit liquide du métabolisme
- la production d'urine implique un processus composé de 3 étapes (Figure 1):
 - Filtration glomérulaire
 - Réabsorption
 - Sécrétion
- Après la production, l'urine est excrétée du corps dans un processus connu sous le nom de miction, où l'urine se déplace dans la direction suivante: reins → uretères → vessie → urètre
- Par la miction, certaines substances riches en azote sont éliminées de la circulation sanguine (le catabolisme des acides aminés génère l'ion ammoniac NH_4^+ , un produit neurotoxique, qui doit être converti en urée avant d'être excrété)
- L'urine joue un rôle dans le cycle de l'azote de la Terre (engrais du sol et promoteur de croissance chez les plantes)

COMPOSITION DE L'URINE

- Dans l'état physiologique, l'urine a une composition spécifique
- La composition dépend de plusieurs facteurs tels que: l'alimentation, le métabolisme intermédiaire, la fonctionnalité des différents organes (rein, foie) et les médicaments
- L'urine est composée d'eau (environ 95 %) et de composés hydrosolubles:
 - Composés organiques: urée, acide urique, créatinine, urobilinogène, acides aminés et autres composés conjugués à l'acide sulfurique, à l'acide glucuronique et à la glycine
 - Composés inorganiques: cations (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+), anions (Cl^- , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-})

PRÉLÈVEMENT D'URINE

Dans la plupart des cas, l'urine est recueillie par le patient lors de la miction. Parfois, l'urine peut être obtenue par le médecin par cathétérisme ou aspiration sus-pubienne. Les conditions de prélèvement de l'urine sont différentes selon l'analyte et le test requis (tableau 1).

Considérations importantes:

- 50 mL d'urine suffisent pour toutes les analyses
- Les échantillons d'urine doivent être prélevés dans des contenants propres et couverts
- Pour les examens bactériologiques, les récipients doivent être stériles
- Les récipients doivent être bruns ou enveloppés dans une feuille d'aluminium si les analytes souhaités sont susceptibles de se détériorer sous l'effet de l'exposition à la lumière (bilirubine)
- Les échantillons d'urine doivent porter l'identification appropriée du patient ainsi que le jour et l'heure du prélèvement pour s'assurer qu'un résultat approprié sera délivré

Tableau 1. Méthodes de collecte d'urine

Type d'urine	Heure de collecte	Tests requis	Tests non recommandés
Échantillon d'urine « à mi-jet »	1ère urine recueillie le matin	- Examen bactériologique - Tests courts à l'aide de bandelettes réactives - test pour mettre en évidence la présence de nitrites dans l'urine recueillie chez les receveurs stériles - Examen macroscopique des sédiments urinaires - protéines urinaires semi-quantitatives - Autres déterminations qualitatives biochimiques	- détermination quantitative de tous les composés biochimiques (qui n'est pas indiquée dans toutes les situations où l'urine spontanée est utilisée)
	2ème urine recueillie le matin	- Examens d'urine à l'aide de bandelettes réactives - Dosage semi-quantitatif des protéines urinaires et du glucose	- test pour mettre en évidence la présence de nitrites dans l'urine
	Urine aléatoire	- Dosage postprandial semi-quantitatif de la glycémie urinaire	- Examen bactériologique - Examen microscopique des sédiments urinaires
Aspiration sus-pubienne	-	- Examen bactériologique	- Analyse quantitative de tous les composants biochimiques
Urine pendant une période de temps spécifique	Généralement pendant 24 h (ou 12 h pour certaines déterminations)	- Détermination quantitative de tous les composants biochimiques - Test d'Addis-Hamburger (n° d'Addi)*	- Examen bactériologique - Examen microscopique des sédiments urinaires

*Estimation quantitative de l'excrétion cellulaire urinaire. Méthode de comptage des sédiments (plâtres et cellules) dans un échantillon d'urine de 12 heures (15: 24 heures)

ÉCHANTILLONS D'URINE

- *La première urine de l'échantillon du matin:*
 - Est utilisé pour des analyses qualitatives (protéines, glucose, bilirubine, urobilinogène)
 - Est le moins influencé par l'alimentation et l'effort physique
 - Est plus concentrée que l'urine recueillie pendant la journée, ce qui signifie que certains composants traces peuvent être mieux détectés
 - N'est pas recommandé pour les patients recevant un traitement diurétique intensif (dilution massive)
 - Instructions à suivre:
 - Pour prélever des échantillons non contaminés, le lavage des mains et l'hygiène locale sont essentiels
 - Prélever l'échantillon dès le réveil d'une nuit de sommeil (d'autres périodes de 8 heures peuvent également être utilisées pour s'adapter au mode de vie du patient)
 - Prélever à partir du milieu du jet, car la première partie du jet urinaire peut être contaminée par des cellules ou des bactéries de l'urètre ou des organes génitaux (cependant, le premier jet peut être nécessaire pour voir certains troubles urétraux)
- *Échantillon d'urine de 24 heures:*
 - est utilisé pour les analyses quantitatives (protéines urinaires totales, glucides, électrolytes)
 - Instructions à suivre:

- La procédure commence à 8 heures du matin, mais la première urine recueillie le matin n'est pas conservée
- Les fractions urinaires recueillies pendant le jour et la nuit sont stockées dans le même récipient
- L'urine doit être conservée au réfrigérateur ou dans un endroit frais pendant la période de collecte
- Seulement 50 ml doivent être envoyés au laboratoire (mais il est nécessaire d'étiqueter le récipient avec le volume total recueilli pendant la procédure)
- L'urine recueillie à 8 heures le lendemain matin est stockée dans un autre récipient (son volume sert à la détermination de la diurèse)
- *L'échantillon aléatoire (ponctuel):*
 - Peut être collecté à tout moment du jour ou de la nuit
- *L'échantillon chronométré:*
 - Est prélevé à un moment précis au cours de la période de 24 heures (14 h à 16 h: urobilinogène) ou à un autre moment précis en relation avec une autre activité (2 heures après avoir mangé pour tester la glycémie)

Tableau 2. Échantillons d'urine

<i>Spécimen</i>	<i>Raison</i>	<i>Utiliser</i>
Première matinée ou 8 heures	Excrétion d'urine la plus concentrée	Analyse protéique, nitrite, microscopique
Prises à mi-parcours/propres	Évite la contamination de l'échantillon	Culture de bactéries et analyse au microscope
Aléatoire (spot)	Commodité	Analyse d'urine de routine
Jeûne	État métabolique	Glycémie pour le dépistage du diabète
Chronométré	Le taux d'excrétion est déterminé 24 h	Analyse chimique quantitative

CONSERVATION DE L'URINE

Idéalement, les échantillons d'urine sont examinés immédiatement après le prélèvement (maximum 2 à 3 heures après le prélèvement), afin de maintenir les caractéristiques de l'urine. Cependant, cela n'est pas toujours possible, et des mesures appropriées de préservation sont nécessaires (tableau 3):

- conservation de l'échantillon au réfrigérateur (4-8°C) pendant 24-36 heures
- stockage de l'échantillon au réfrigérateur (-20°C) pendant une période prolongée
- Ajout de conservateurs
 - les conservateurs sont spécifiques aux paramètres analysés (Annexe 1)
 - Certains conservateurs généraux sont:
 - azoture de sodium - pour la détermination des protéines, du glucose, de l'amylase, de la créatinine, de l'urée et de l'acide urique
 - HCl 6 mM ou thymol 1 % - pour le dosage du phosphate inorganique
 - Toluène, xylène, chloroforme (5-10 ml)
 - Les conservateurs peuvent interférer avec certains tests (le chloroforme ne doit pas être utilisé si l'on veut déterminer le glucose ou les corps cétoniques)
 - La bouteille doit porter une étiquette indiquant la présence de tout agent de conservation utilisé

Tableau 3. Méthodes de conservation de l'urine

<i>Méthode</i>	<i>Utiliser</i>	<i>Désavantage</i>
Réfrigération	Conservation de toutes les urines pendant 24 heures	Insatisfaisant pendant de longues périodes
Congélation	Pour un stockage prolongé	Détruit les cellules
Formol	Bon pour la conservation des cellules et des plâtres	Interfère avec l'urobilinogène et l'estérase leucocytaire sur les tests de bandelettes réactives et la culture bactérienne
Chlorhexidine	Conservateur pour le glucose	Interfère avec le test de protéines sur la bandelette de réactif
Pastilles de conservation	Analyse d'urine de routine et cellules	Interfère avec les études de densité, de sodium, de potassium et d'hormones

URINE

L'analyse d'urine est le processus d'examen de l'urine à l'aide d'un ensemble de tests chimiques et microscopiques. Il offre des informations utiles sur le métabolisme intermédiaire ou la fonctionnalité des organes. L'analyse d'urine peut être utilisée pour dépister:

- Infections des voies urinaires
- Maladies rénales
- Maladies d'autres organes qui entraînent l'apparition de métabolites anormaux (produits de décomposition) dans l'urine

L'examen d'urine sommaire comprend:

1. Examen macroscopique (examen physique)
2. Examen biochimique
3. Examen microscopique

1. EXAMEN MACROSCOPIQUE

a) Volume

- *Valeurs normales*: 1500 mL chez l'homme et 1200 mL chez la femme
 - Diurèse = quantité normale d'urine éliminée en 24 heures
 - A des valeurs plus élevées pendant la journée (3/4) que pendant la nuit (1/4)
 - A des valeurs plus élevées en position debout (clinostatisme) qu'en position de repos (orthostatisme)
 - Est influencé par l'ingestion de liquides, l'alimentation, la température, la masse corporelle et des facteurs émotionnels
- *Corrélations cliniques*:
 - Le volume ne peut être déterminé que sur des échantillons d'urine de 24 heures
 - La détermination du volume n'est pas incluse dans l'examen sommaire de l'urine
 - Variations du volume d'urine excrété en 24 heures: polyurie, oligurie, anurie
 - Variations du rythme d'excrétion urinaire en 24 heures: nycturie, opsiurie

- Polyurie
 - Définition: excrétion de plus de 2000 mL d'urine / 24 h
 - *Conditions physiologiques* (absence de nycturie): froid, émotions, ingestion de grandes quantités de liquides ou de légumes riches en eau, consommation excessive de café, certains médicaments (diurétiques)
 - *États pathologiques* (absence de nycturie): hyperthyroïdie, après une crise de douleur (angor pectoris = douleur thoracique, coliques, crampes intensives), après une crise d'épilepsie, diabète sucré, diabète insipide, glomérulonéphrite
- Oligurie
 - Définition: excrétion de moins de 1000 mL d'urine / 24h
 - *Conditions physiologiques*: ingestion de petites quantités de liquides pendant la journée, perte excessive d'eau par la sueur, déshydratation
 - *États pathologiques*: insuffisance cardiaque, déshydratation par vomissements, diarrhée, hémorragies, hypothyroïdie, calculs rénaux
- Anurie
 - Définition: excrétion de moins de 150 mL d'urine par 24 h (les reins perdent la capacité de produire de l'urine)
 - *États pathologiques*: toutes les maladies qui produisent l'oligurie, si les facteurs impliqués sont plus agressifs ou de plus longue durée
- Nycturie
 - Définition: Excrétion d'urine pendant la nuit
 - Conditions physiologiques: Vieillesse
 - *États pathologiques*: hypertrophie bénigne de la prostate, tumeurs de la prostate, infections de la vessie, diabète sucré, prolapsus de la vessie, prolapsus utérin
- Opsiuria
 - Définition: Retard de l'excrétion urinaire après l'ingestion d'eau
 - *États pathologiques*: maladie d'Addison

b) Couleur

- *Valeurs normales*: jaune pâle
- *Modifications physiologiques*:
 - Couleur plus intense: urine acide et urine excrétée pendant la nuit
 - Couleur faible: traitement diurétique
 - Bleu-vert: ingestion de bleu de méthylène
 - Rouge: aspirine, betterave
- *Modifications pathologiques*:
 - Couleur faible: diabète rénal, sclérose rénale, insuffisance rénale associée à la polyurie
 - Jaune-orange: fièvre aiguë, sueurs abondantes
 - Rouge: hématurie, hémoglobinurie, porphyrie
 - Gris: méthémoglobinémie, sarcome, intoxication au phénol
 - Brun: syndromes ictériques.
 - Vert-Rouge: néphrites aiguës
 - Noir: Alkaptonurie

c) Aspect

- *Valeurs normales*: clair, transparent
- *Modifications physiologiques*:
 - Après quelques heures, un dépôt peut apparaître et il est formé par la desquamation des cellules des voies urinaires (également des cellules vaginales chez les femmes)

- L'urine alcaline/neutre peut être peu claire même après l'élimination, en raison des phosphates alcalins
- Pour faire la distinction entre l'urine normale et l'urine pathologique, certaines méthodes peuvent être utilisées
- *Modifications pathologiques:*
 - Maladies rénales dans lesquelles des érythrocytes, des leucocytes, du mucus ou des plâtres peuvent être observés
 - L'urine trouble ne doit être analysée qu'après avoir été éliminée par sédimentation
 - Dans les maladies qui associent la polyurie, l'urine est très claire et ne montre pas de sédiments

d) Odeur

- *Valeurs normales:* odeur vague, d'amandes amères, qui est donnée par les acides volatils
- *Modifications physiologiques:*
 - Odeur plus intense: lorsqu'elle est concentrée
 - Odeur désagréable: ingestion d'ail, d'asperges, de raifort
- *Modifications pathologiques:*
 - L'odeur de l'ammoniac dans les maladies infectieuses ou les tumeurs au niveau rénal
 - Odeur de putrescine (pourrie) dans les infections bactériennes anaérobies
 - L'odeur des pommes aigres dans le diabète sucré

2. EXAMEN BIOCHIMIQUE

L'examen biochimique de l'urine se fait à l'aide de bandelettes urinaires. Ces bandelettes réactives d'analyse d'urine sont simples et faciles à utiliser pour la détection de marqueurs chimiques diagnostiques clés dans l'urine humaine. Les tests à l'aide de bandelettes sont importants en médecine générale en tant que méthode de dépistage pour identifier les maladies à un stade naissant; De plus, les bandelettes sont utilisées pour le suivi du traitement et l'orientation des stratégies thérapeutiques.

Ils facilitent les analyses semi-quantitatives de plusieurs composés tels que: l'urobilinogène, la bilirubine, les corps cétoniques, l'acide ascorbique, le glucose, les nitrites, les leucocytes et analysent également le pH ou la densité urinaire (gravité). La bande contient plusieurs zones distinctes, chacune d'entre elles correspondant à un paramètre à tester.

Lorsque la bandelette est introduite dans l'urine, chaque zone se colore spécifiquement. Les couleurs obtenues seront comparées à une échelle étalon fournie par le test; Il fait les liens entre la concentration du paramètre analysé et la modification de la couleur. Une bande se compose de 4 couches: une couche protectrice en nylon, un papier sur lequel sont fixés des tampons réactifs chimiquement spécifiques, une couche de papier absorbant et un support en plastique.

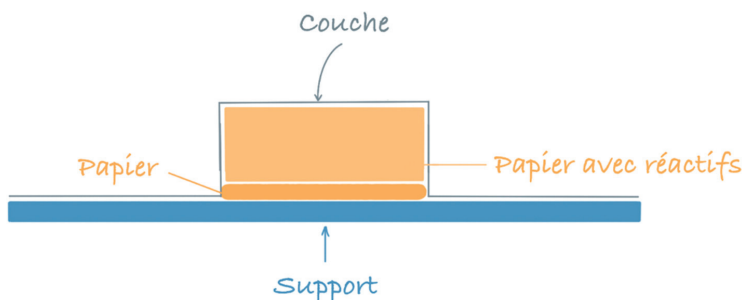


Figure 1. Composants de la bandelette urinaire

Les tampons de réactifs réagissent avec l'urine de l'échantillon pour fournir une réaction de couleur visible standardisée en 30 secondes à une minute selon l'écran du panneau spécifique. La couleur est ensuite comparée visuellement au nuancier inclus pour déterminer le niveau de chaque facteur chimique. Les résultats des tests peuvent fournir des informations utiles sur le métabolisme des glucides (diabète), la fonction rénale, l'équilibre acido-basique, la bactériurie, le sang occulte, l'élévation des leucocytes (infection) et d'autres conditions de santé globale.

L'utilisation de bandelettes urinaires est recommandée:

- Dans les maladies de l'appareil rénal et de l'appareil urogénital lorsque ces maladies sont asymptomatiques pendant une longue période (par exemple, l'insuffisance rénale est le stade terminal de différentes néphropathies)
- Dans les maladies métaboliques (en particulier le diabète sucré de type 2), le glucose et les corps cétoniques sont analysés
- Dans les maladies hépatiques et l'anémie lorsque l'urobilinogène et la bilirubine sont analysés.

Procédure:

- | | | | | | | |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| LEU | — | +1 | +2 | +3 | | |
| NIT | — | + | | | | |
| URO | N | +1 | +2 | +3 | +4 | |
| PRO | — | +1 | +2 | +3 | | |
| pH | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | |
| BLO | — | +1 | +2 | +3 | | |
| DS | 1.000 | 1.005 | 1.010 | 1.015 | 1.020 | 1.025 |
| CET | — | +1 | +2 | +3 | | |
| BIL | — | +1 | +2 | +3 | | |
| GLU | — | +1 | +2 | +3 | +4 | |

Figure 2. Test de bandelette

a) pH

- *Valeurs normales et:* 5-7
- *Corelations cliniques:*
 - Normalement, l'urine est un liquide biologique acide, dont le pH est principalement déterminé par le rapport entre les phosphates alcalins et acides de l'urine
 - dans le plasma $\text{NaH}_2\text{PO}_4:\text{Na}_2\text{HPO}_4=1:5$ (pH=7.4), tandis que dans l'urine $\text{NaH}_2\text{PO}_4:\text{Na}_2\text{HPO}_4=5:1$
 - par rapport au sang, l'urine a une gamme de pH plus large
- *Modifications physiologiques:*
 - Le pH de l'urine est influencé par la nutrition:
 - Une nutrition riche en viande correspondra à une urine acide (5.2-5.3)
 - Une nutrition à base de légumes correspondra à une urine alcaline (7,0-7,5)
 - Une alimentation mixte entraînera une urine faible et acide
 - Les bicarbonates et l'eau minérale conduiront à une urine alcaline
 - Le pH de l'urine est influencé par le rythme nyctéméral (circadien)
 - L'urine la plus acide est éliminée à minuit
 - le plus alcalin le matin
- *Modifications pathologiques:* (indépendantes de la nutrition)
 - pH bas: inanition, intoxications, insuffisance rénale, acidocétose diabétique
 - pH élevé: vomissements abondants, infections des voies urinaires (urétrite, cystite, pyélie, pyélonéphrite), hypokaliémie sévère, intoxication, fièvre

b) Densité

- *Valeurs normales:* 1,015 - 1,025 g/cm³
- *Corrélations cliniques:*
 - Normosthénurie = densité urinaire normale
 - La densité varie directement proportionnellement à la quantité de substances dissoutes dans l'urine et à l'intensité de la couleur et inversement proportionnelle à la quantité d'urine émise
 - À une densité inférieure à 1,010 g/cm³, les leucocytes et les érythrocytes sont lysés, ce qui peut donner des résultats faussement négatifs lors de l'analyse du sédiment urinaire
- *Modifications physiologiques:*
 - Faible densité: ingestion d'une grande quantité de liquides
 - Haute densité: déshydratation, transpiration excessive
- *Modifications pathologiques:*
 - Hypersthénurie (densité > 1,025): diabète sucré, protéinurie, déshydratation, fièvre
 - Hyposthénurie (densité < 1,015): diabète insipide, hyperhydratation
 - Isosthénurie (densité = 1,002): insuffisance rénale sévère, montrant l'incapacité du rein à concentrer ou à diluer l'urine

c) Leucocytes

- *Valeurs normales:* Absent
- *Corrélations cliniques:*
 - Les leucocytes dans l'urine représentent un indicateur important des processus inflammatoires des reins et des voies urinaires: infections bactériennes, infections non bactériennes causées par des virus, infections parasitaires, intoxications
 - Dans la plupart des cas, le test positif pour les leucocytes indique une infection bactérienne des voies urinaires
 - Cependant, la présence de leucocytes dans l'urine pourrait être causée par une contamination par les sécrétions de l'appareil génital
 - Parfois, dans les inflammations chroniques, une forte réaction des leucocytes pouvait être détectée en l'absence de bactéries. Cette situation est un symptôme unique de pyélonéphrite chronique, de tuberculose ou de différentes tumeurs.
- *Modifications pathologiques:*
 - Leucocyturie: processus inflammatoires aigus des voies urinaires (infections bactériennes et infections non bactériennes causées par des virus ou des parasites - urétrite, cystite, pyélite, pyélonéphrite), intoxications, inflammations chroniques = leucocyturie abactérienne (pyélonéphrite chronique, tuberculose ou autres tumeurs)

d) Nitrites

- *Valeurs normales:* Absent
- *Corrélations cliniques:*
 - Dans des conditions normales, l'urine ne contient pas de nitrites. L'urine exempte de bactéries ne contient pas de nitrite.
 - La présence de nitrate dans l'urine est un indicateur spécifique de bactériurie et, lorsqu'elle est positive, doit être prise au sérieux
 - Un résultat négatif ne donne aucune assurance qu'il n'y a pas d'infection importante. Il se peut que l'urine n'ait pas été retenue dans la vessie assez longtemps pour que les bactéries aient réduit les nitrates, et ce sera invariablement le cas lorsqu'une sonde urinaire est en place. De plus, certains agents pathogènes, tels que *Streptococcus faecalis*, ne réduisent pas du tout les nitrates.
 - L'administration de nitrites contenant un traitement n'entraîne pas l'excrétion de nitrites dans l'urine

- Après des antibiotiques ou une chimiothérapie, le métabolisme enzymatique et la population microbienne sont inhibés, de sorte que le résultat du test sera négatif. C'est la raison pour laquelle tout traitement antimicrobien doit être interrompu au moins 3 jours avant le test.
- *Modifications pathologiques:*
 - nitriturie: infections bactériennes des voies urinaires

e) Érythrocytes (GR)

- *Valeurs normales:* Absent
- *Corrélations cliniques:*
 - Même de petites augmentations du nombre de globules rouges dans l'urine sont significatives. De nombreuses maladies des reins et des voies urinaires, ainsi que des traumatismes, des médicaments, le tabagisme ou des exercices intenses, peuvent provoquer une hématurie (globules rouges dans l'urine) ou une hémoglobinurie (hémoglobine dans l'urine).
 - Ce test ne peut pas déterminer la gravité de la maladie (en d'autres termes, une grande quantité de sang dans l'urine ne signifie pas que la maladie est plus avancée, ni une faible quantité de sang dans l'urine ne signifie pas que la maladie est moins avancée).
 - Ce test ne peut pas non plus identifier d'où provient le sang. Par exemple, la contamination de l'urine par du sang provenant d'hémorroïdes ou de saignements vaginaux ne peut pas être distinguée d'un saignement des voies urinaires.
- *Modifications physiologiques:*
 - Pseudo hématurie: une urine rose ou rougeâtre peut être produite par une consommation excessive de betteraves, de baies ou de rhubarbe; colorants alimentaires; et certains laxatifs et analgésiques
- *Modifications pathologiques:*
 - Selon la gravité du saignement:
 - Hématurie *macroscopique*: il y a suffisamment de sang pour colorer l'urine en rouge ou en brun
 - Hématurie *microscopique*: l'urine est visuellement de couleur normale, mais l'analyse chimique ou l'évaluation microscopique révèle que l'urine contient du sang.
 - Selon le site du saignement:
 - Hématurie *glomérulaire*: les globules rouges urinaires ont une distribution de taille irrégulière et ont tendance à être plus petits que les globules rouges périphériques. Les érythrocytes d'origine glomérulaire ont tendance à être déformés avec des variations de taille et de forme. On pense que cela résulte du passage des globules rouges à travers le néphron.
 - Hématurie *non glomérulaire*: les globules rouges urinaires sont plus uniformes dans la distribution granulométrique et ont un volume moyen plus élevé, le volume maximal étant supérieur à celui des globules rouges périphériques
 - Selon le moment où le saignement se produit:
 - Début de la miction (hématurie initiale) - urètre ou prostate (hommes)
 - Tout au long de la miction (hématurie totale) - vessie, uretère ou reins
 - Fin de la miction (hématurie terminale) - vessie ou prostate (hommes)
 - Causes de l'hématurie:
 - Maladie parenchymateuse primitive telle que la glomérulonéphrite (associée à une protéinurie et à l'hypertension), la polykystose rénale, les calculs rénaux, les infections des voies supérieures ou inférieures (cystite ou prostatite), les tumeurs des voies urinaires
 - Réactions médicamenteuses (par ex. pénicilline, aminoglycosides, AINS)
 - Traumatisme (l'hématurie du joggeur résulte de secousses répétées de la vessie pendant le jogging ou la course de fond)

- Les symptômes peuvent indiquer le site et/ou la cause du saignement:
 - Douleur abdominale - Inflammation du rein ou de l'uretère causée par un traumatisme, une infection ou une tumeur
 - Diminution de la force urinaire, hésitation ou miction incomplète - voies urinaires inférieures, hyperplasie bénigne de la prostate, tumeur
 - Fièvre - infection, généralement une infection rénale ou une infection de l'uretère
 - Douleur au flanc - traumatisme rénal ou tumeur
 - Urgence, douleur ou fréquence urinaires - cancer de la vessie

f) Protéine

- *Valeurs normales:* Absent
- *Corrélations cliniques:*
 - De petites quantités d'albumine sont normalement filtrées au niveau du glomérule et réabsorbées par le tubule proximal. La protéine qui échappe à la réabsorption ne dépasse pas 150 mg/24 heures, de sorte qu'une protéinurie supérieure à cette quantité est considérée comme pathologique.
 - La protéinurie « fonctionnelle » est un terme appliqué à la protéinurie transitoire qui accompagne la fièvre, l'exercice ou l'insuffisance cardiaque congestive et qui est probablement médiée hémodynamiquement dans le rein. La protéinurie dépasse rarement 500 mg/24 h et se résout lorsque l'événement initiateur est inversé.
 - En cas de protéinurie persistante, une analyse d'urine complète comprenant une inspection minutieuse du sédiment urinaire est obligatoire. Les plâtres de globules rouges et les corps adipeux ovales doivent être recherchés avec soin; la présence de globules rouges ou de plâtres de globules rouges indique une maladie glomérulaire; Les cellules tubulaires chargées de lipides (corps adipeux ovales) se trouvent dans le syndrome néphrotique de diverses causes. Les critères diagnostiques du syndrome néphrotique comprennent une protéinurie sévère ou néphrotique, une hypoalbuminémie, un œdème, une hyperlipidémie et une lipidurie. Des études de la fonction rénale, y compris l'azote uréique du sang, la concentration sérique de créatinine et la clairance de la créatinine, doivent être effectuées.
- *Modifications physiologiques:*
 - *Protéinurie bénigne:* est due à un orthostase prolongé, une lordose, une déshydratation, un stress émotionnel et physique, de la fièvre, des lésions dues à la chaleur, un processus inflammatoire. La protéinurie bénigne a un pronostic bénin et n'est associée qu'à un degré mineur de protéinurie. Cette protéinurie peut apparaître chez des personnes en bonne santé de moins de 30 ans, sans maladie rénale. Le test de protéinurie orthostatique consiste en un prélèvement d'urine le soir, suivi d'un confinement au lit jusqu'au lendemain matin, où un échantillon couché est obtenu. Le patient est ensuite laissé marcher pendant quelques heures et un troisième échantillon est obtenu. La présence de protéines dans le premier et le troisième échantillon avec absence dans le second confirme le diagnostic de protéinurie orthostatique.
- *Modifications pathologiques:*
 - En fonction de l'étiologie
 - *Protéinurie pré-rénale:* se produit lorsque des concentrations accrues de protéines de faible poids moléculaire présentes dans le plasma dépassent la capacité de résorption tubulaire. Peut être trouvé dans les coliques, les crises d'épilepsie, les crises cardiaques, les accidents vasculaires cérébraux, les traumatismes crâniens, les postopératoires. Dans ce cas, la protéinurie disparaît une fois que l'affection sous-jacente est résolue.
 - *Protéinurie rénale:* insuffisance rénale, glomérulonéphrite, syndrome néphrotique, néphrite, rein polykystique et certaines maladies inflammatoires, infectieuses et métaboliques.
 - *Protéinurie post-rénale:* survient en raison de processus inflammatoires/infectieux dans la vessie ou la prostate, ou en raison d'une hémorragie.

- En fonction du mécanisme
 - *Protéinurie glomérulaire*: La maladie glomérulaire est la cause la plus fréquente de protéinurie pathologique. Plusieurs anomalies glomérulaires modifient la perméabilité de la membrane basale glomérulaire, entraînant une perte urinaire d'albumine et d'immunoglobulines. Le dysfonctionnement glomérulaire peut entraîner d'importantes pertes de protéines; Une excrétion urinaire de plus de 2 g par 24 heures est généralement le résultat d'une maladie glomérulaire.
 - *Protéinurie tubulaire*: se produit lorsque la maladie tubulo-interstitielle empêche le tubule proximal de réabsorber les protéines de faible poids moléculaire (partie de l'ultrafiltrat glomérulaire normal). Lorsqu'un patient souffre d'une maladie tubulaire, moins de 2 g de protéines sont généralement excrétés en 24 heures. Les maladies tubulaires comprennent la néphrosclérose hypertensive et la néphropathie tubulo-interstitielle causée par des anti-inflammatoires non stéroïdiens.
 - *Protéinurie par débordement*: les protéines de faible poids moléculaire submergent la capacité des tubules proximaux à réabsorber les protéines filtrées. Le plus souvent, cela est le résultat de la surproduction d'immunoglobulines qui se produit dans le myélome multiple. Les fragments d'immunoglobulines à chaîne légère qui en résultent (protéines de Bence Jones) produisent un pic monoclonal dans le profil électrophorétique de l'urine.

Tableau 4. Types de protéinurie basés sur le mécanisme pathogène

Type	Cause	Caractéristiques physiopathologiques
Glomérulaire	Glomérulopathie primitive ou secondaire	Augmentation de la perméabilité capillaire glomérulaire aux protéines
Tubulaire	Maladie tubulaire ou interstitielle	Diminution de la réabsorption des protéines dans le filtrat glomérulaire
Déborder	Gammopathie monoclonale, leucémie	Augmentation de la production de protéines de faible poids moléculaire

g) Glucose

- *Valeurs normales*: Absent
- *Corrélations cliniques*:
 - Moins de 0,1 % du glucose normalement filtré par les glomérules apparaît dans l'urine, et moins de 130 mg devraient apparaître dans l'urine sur une période de 24 heures. Le glucose est présent dans le filtrat glomérulaire mais est réabsorbé par le tubule proximal du rein. Si la glycémie dépasse la capacité des tubules à réabsorber tout le glucose présent dans le filtrat glomérulaire, le seuil rénal est atteint et le glucose se déverse dans l'urine.
 - La découverte d'une glycosurie indique que la personne est hyperglycémique ou qu'elle a un seuil rénal abaissé pour le glucose. Le seuil rénal de glucose est d'environ 160 à 190 mg/dl de sang; Le glucose n'apparaît pas dans l'urine jusqu'à ce que la glycémie dépasse ce niveau.
- *Modifications physiologiques*:
 - Glycosurie: après avoir mangé un repas copieux ou en période de stress émotionnel
 - Pendant la grossesse, le seuil rénal de glucose peut être abaissé de sorte que de petites quantités de glycosurie peuvent être présentes
- *Modifications pathologiques*:
 - *Glycosurie dans le diabète sucré*: Les tests de glycémie urinaire sont utilisés pour dépister le diabète, pour confirmer un diagnostic de diabète ou pour surveiller le contrôle du diabète. Le test postprandial de glycosurie est plus efficace pour identifier le diabète sucré que le test effectué avec la première urine du matin.

- *Glycosurie rénale*: affection rare caractérisée par l'élimination de glucose dans les urines malgré une glycémie normale ou basse. Elle résulte d'un dysfonctionnement des tubules rénaux. Chez la plupart des patients, elle est asymptomatique et sans gravité. Lorsqu'elle survient isolément, sans atteinte de la fonction rénale, elle est généralement transmise sur un mode autosomique récessif.

h) Corps cétoniques

- *Valeurs normales*: Absent
- *Corrélations cliniques*:
 - Les cétones sont des produits finaux métaboliques du métabolisme des acides gras. Chez les individus en bonne santé, les cétones se forment dans le foie et sont complètement métabolisées, de sorte que seules des quantités négligeables apparaissent dans l'urine. Cependant, lorsque les glucides ne sont pas disponibles ou ne peuvent pas être utilisés comme source d'énergie, les lipides deviennent le carburant prédominant au lieu des glucides et des quantités excessives de cétones se forment comme sous-produit métabolique. La présence de cétones dans l'urine indique que le corps utilise les graisses comme principale source d'énergie.
 - Trois corps cétoniques qui apparaissent dans l'urine lorsque les graisses sont brûlées pour obtenir de l'énergie (acétone, acide acétoacétique et acide bêta-hydroxybutyrique). Normalement, l'urine ne devrait pas contenir suffisamment de cétones pour donner une lecture positive. Comme pour les tests de glucose, l'acétone peut être testée à l'aide d'une bandelette réactive. Les résultats sont rapportés sous forme de petites (valeur inférieure à 20 mg/dl), modérées (de 30 à 40 mg/dL) ou grandes (80 mg/dL ou plus) quantités d'acétone.
 - Le dépistage de la cétonurie est effectué fréquemment chez les patients gravement malades, les patients préopératoires et les femmes enceintes. Tout patient diabétique qui a des taux élevés de glucose dans le sang et l'urine doit être testé pour les cétones urinaires. De plus, lorsque le traitement du diabète passe de l'insuline à des hypoglycémiant oraux, l'urine du patient doit être surveillée pour détecter la cétonurie. Le développement d'une cétonurie dans les 24 heures suivant le sevrage de l'insuline indique généralement une faible réponse aux agents hypoglycémiant oraux. Les patients diabétiques qui utilisent des agents hypoglycémiant oraux doivent faire analyser régulièrement leur urine pour le glucose et les cétones, car les hypoglycémiant oraux, contrairement à l'insuline, ne contrôlent pas le diabète lorsqu'une infection aiguë ou une autre maladie se développe.
 - Dans les conditions associées à l'acidose, les cétones urinaires sont testées pour évaluer la gravité de l'acidose et pour surveiller la réponse au traitement. Les cétones urinaires apparaissent avant qu'il n'y ait une augmentation significative des cétones dans le sang; Par conséquent, la mesure des cétones urinaires est particulièrement utile dans les situations d'urgence.
 - Pendant la grossesse, la détection précoce de la cétonurie est essentielle car l'acidocétose est un facteur associé à la mort intra-utérine.
 - Chez les personnes non diabétiques, la cétonurie peut survenir lors d'une maladie aiguë ou d'un stress sévère. Environ 15 % des patients hospitalisés peuvent souffrir de cétonurie, même s'ils ne sont pas diabétiques. Chez un patient diabétique, les corps cétoniques dans l'urine suggèrent que le patient n'est pas correctement contrôlé et que des ajustements de médicaments, de régime alimentaire ou des deux doivent être effectués rapidement. Chez le patient non diabétique, la cétonurie reflète un métabolisme glucidique réduit et un métabolisme excessif des graisses.
- *Modifications physiologiques*:
 - Cétonurie: famine, jeûne, régimes riches en protéines ou pauvres en glucides, vomissements prolongés et anorexie, grossesse, allaitement

- *Modifications pathologiques:*
 - Anomalies métaboliques telles que le diabète, la glycosurie rénale, la glycogénoplasie, l'hyperthyroïdie, la fièvre

i) Bilirubine

- *Valeurs normales:* Absent
- *Corrélations cliniques:*
 - La bilirubine liée à l'albumine (bilirubine indirecte) n'est pas soluble dans l'eau et n'apparaîtra jamais dans l'urine
 - La bilirubine conjuguée (avec de l'acide glucuronique ou sulfurique) est soluble dans l'eau et peut apparaître dans l'urine (en situation pathologique)
 - Si les voies biliaires sont obstruées, la bilirubine directe s'accumulera à un niveau suffisamment élevé pour qu'une partie s'échappe du foie dans le sang
 - La présence de bilirubine conjuguée en quantités détectables (supérieures à 0,2 mg/dL) ne permet pas de distinguer avec certitude l'ictère hépatocellulaire de l'ictère obstructif, mais ne se produit pas fréquemment lorsque l'hyperbilirubinémie est consécutive à une hémolyse
 - Les tests d'urobilinogène et de bilirubine, pris ensemble, aident à distinguer l'hémolyse, la maladie hépatocellulaire et l'obstruction biliaire (tableau 5)
- *Modifications pathologiques:*
 - Hyperbilirubinurie: sténoses biliaires, cirrhose, calculs biliaires des voies biliaires, hépatite avec obstruction biliaire associée, traumatisme chirurgical affectant les voies biliaires, tumeurs du foie ou de la vésicule biliaire

Tableau 5. Taux d'urobilinogène et de bilirubine dans l'urine

	<i>Santé</i>	<i>Hémolyse</i>	<i>Maladie hépatique</i>	<i>Obstruction biliaire</i>
Urobilinogène urinaire	Normal	Augmenté	Augmenté	Faible/Absent
Bilirubine urinaire	Négatif	Négatif	Positif/Négatif	Positif

j) Urobilinogène

- *Valeurs normales:* Présentes à des concentrations de 0,1 à 1,0 mg/dL ou d'environ 0,5 à 2,5 mg/24 heures
- *Corrélations cliniques:*
 - L'urobilinogène est un sous-produit de la dégradation (réduction) de la bilirubine conjuguée
 - Lorsque la bilirubine conjuguée atteint l'intestin, l'action bactérienne produit de l'urobilinogène (et d'autres mésobilinogènes et stercobilinogènes), qui est partiellement réabsorbé dans la circulation porte (~20 % est absorbé dans la circulation et excrété par les reins)
 - Les trois composés de ce groupe, le mésobilinogène, le stercobilinogène et l'urobilinogène, sont incolores. Lorsqu'ils sont oxydés à leurs bilines correspondantes, ils contribuent à la couleur des selles et de l'urine.
- *Modifications physiologiques:*
 - L'urobilinogène n'est pas présent chez les nouveau-nés parce que les bactéries qui réduisent la bilirubine en urobilinogène n'existent pas chez les nouveau-nés comme elles le font chez les adultes
 - L'utilisation d'antibiotiques chez les enfants et les adultes peut entraîner une diminution des taux d'urobilinogène

- *Modifications pathologiques:*
 - Augmentation de l'urobilinogène dans l'urine: hémolyse (augmentation de la production de bilirubine), dysfonctionnement hépatocellulaire (diminution de la clairance hépatique de l'urobilinogène de la circulation porte)
 - Diminution de l'urobilinogène dans l'urine: obstruction biliaire (diminution de l'administration de bilirubine conjuguée dans l'intestin)

3. EXAMEN MICROSCOPIQUE DU SÉDIMENT URINAIRE

Dans le cadre d'une analyse d'urine, les sédiments urinaires sont centrifugés et examinés au microscope à la recherche de cristaux, de plâtres, de globules rouges, de globules blancs et de bactéries ou de levures. Parce que l'examen des sédiments urinaires fournit un échantillonnage direct de la morphologie des voies urinaires, il fournit des informations importantes utiles à la fois pour le diagnostic et le pronostic. L'examen microscopique des sédiments urinaires est généralement effectué en plus des procédures de routine. Bien qu'il existe des colorants commerciaux pour mettre en évidence les éléments cellulaires, l'examen de l'urine non colorée est généralement adéquat.

Cet examen nécessite un certain degré de compétence acquis par la pratique sous la supervision immédiate d'un technicien expérimenté. L'échantillon utilisé pour l'examen microscopique doit être aussi frais que possible. Les globules rouges et de nombreux solides formés ont tendance à se désintégrer au point debout, en particulier si l'échantillon est chaud ou alcalin.

L'interprétation correcte de l'analyse d'urine microscopique dépend de la collecte et de la préparation appropriées des échantillons. Le patient doit être instruit sur la technique appropriée pour recueillir de l'urine propre. Ne présumez pas que le patient sait quoi faire d'après son expérience antérieure. Passez en revue la façon de nettoyer les organes génitaux et demandez au patient de prélever un échantillon à mi-parcours.

1. Versez 5 à 10 ml d'urine dans un tube à essai. Les tubes à essai à fond conique sont préférés car ils permettent une meilleure formation de granulés.
2. Placez le tube dans la centrifugeuse et équilibrez-le avec un deuxième tube rempli d'eau (ou d'un autre échantillon d'urine) de volume égal. Faites tourner l'urine pendant environ 10 minutes à 2000 tr/min (rotations par minute).
3. Retirez le tube et décantez le surnageant dans l'évier.
4. Remettez en suspension le sédiment dans l'urine résiduelle qui s'accroche au fond du tube en tapotant le tube contre une surface dure à plusieurs reprises.
5. Placez une goutte du sédiment remis en suspension sur une lame de microscope en verre de 76 x 26 mm à l'aide d'une pipette ou en tenant le tube à l'envers et en tapotant soigneusement la lame jusqu'à ce qu'une goutte tombe sur la lame.
6. Placez une lamelle de 20 x 20 mm sur la goutte et placez-la sous le microscope.
7. Placez la glissière sous la lunette et commencez l'examen à faible puissance. Assurez-vous d'utiliser une source de faible luminosité (ajustez l'iris et le condenseur). Trop de lumière rend les éléments cellulaires et cristallins plus difficiles à voir. Scannez la diapositive sous une faible puissance (20X) pour localiser les zones d'intérêt.
8. Recherchez des plâtres juste à l'intérieur du périmètre de la lamelle.
9. Ensuite, passez à un grossissement sec élevé (40X) et examinez dix champs aléatoires dans la partie centrale de la lamelle. Comptez le nombre de globules rouges et de globules blancs dans chacun d'eux et signalez la gamme des résultats. Si le champ est couvert de cellules, déclarez comme « TNTC » (trop nombreuses pour être comptées) ou « emballé ».
10. Ajoutez au rapport une estimation de la densité bactérienne, des moulages et des autres structures notés.

Exemple de rapport d'analyse d'urine microscopique: 5-10 GR/HPF, 15-25 GB/HPF, peu de bactéries, plâtre hyalin occasionnel, pas de cellules épithéliales.

Composants des sédiments urinaires

- Sédiments urinaires organisés
 - Cellules des sédiments urinaires
 - Leucocytes
 - Érythrocytes
 - Cellules épithéliales: Cellules épithéliales tubulaires rénales, Cellules épithéliales transitionnelles (cellules urothéliales), Cellules épithéliales squameuses
 - Jette
- Sédiments urinaires non organisés
 - Cristaux
 - Oxalate de calcium
 - Acide urique
 - Triples phosphates (phosphate d'ammonium et de magnésium)
 - Cristaux de cystine
 - Bactéries

a) Cellules des sédiments urinaires

Leucocytes (globules blancs)

Les leucocytes désignent toutes les cellules sanguines libres d'hémoglobine. Ces cellules appartiennent au système réticulo-endothélial. Les globules blancs dans l'urine ont des noyaux lobés et des granules cytoplasmiques réfractaires. En fonction de leur aspect nucléaire, les globules blancs peuvent être divisés en deux catégories: les cellules mononucléées et les cellules polynucléaires. Les lymphocytes et les monocytes sont les principales cellules mononucléées et les cellules polynucléaires sont subdivisées en cellules neutrophiles, éosinophiles et basophiles.

Dans le sédiment urinaire, le terme leucocyte est généralement interprété comme désignant les polynucléaires, principalement les neutrophiles, car ceux-ci sont de loin les plus abondants dans l'urine. Dans un échantillon normal, on peut observer jusqu'à 5 neutrophiles par champ à fort grossissement (40X). Une augmentation du nombre de neutrophiles est généralement associée à un processus inflammatoire.

Les leucocytes mononucléés sont observés plus rarement. Leur augmentation est souvent liée à une pathologie hématologique entraînant une infiltration des voies urinaires. En microscopie en lumière blanche, sans coloration, l'identification précise des différents types de globules blancs est quasiment impossible. Le terme leucocytes est donc utilisé pour la microscopie de routine. Les sous-classes de leucocytes peuvent être distinguées par des colorations spécifiques, comme la coloration de Wright ou la coloration PAP, dont l'efficacité dépend fortement de l'état de conservation des cellules. Ces techniques nécessitent toutefois un travail supplémentaire, non justifié pour les échantillons de routine.

Érythrocytes (globules rouges)

L'hématurie est définie comme un nombre élevé de globules rouges urinaires maintenu sur trois échantillons prélevés à des jours différents en raison de lésions glomérulaires, de tumeurs qui érodent les voies urinaires n'importe où sur sa longueur, de traumatismes rénaux, de calculs urinaires, d'infarctus rénaux, de nécrose tubulaire aiguë, d'infections des voies urinaires supérieures et inférieures, de néphrotoxines et de stress physique.

Les globules rouges peuvent également contaminer l'urine du vagin chez les femmes menstruées ou à la suite d'un traumatisme produit par le cathétérisme vésical. Quelques cas d'hématurie idiopathique ont été rapportés dans la littérature. Les globules rouges provenant d'une source externe, comme les saignements vaginaux, ne sont pas une véritable hématurie. Dans une urine normale, moins de 1,5 million d'érythrocytes se trouvent dans un échantillon de 24 heures. Cette valeur normale représente un comptage inférieur à 5 RBC/hpf (champ de haute puissance). Deux types d'hématurie peuvent être observés dans l'urine:

- Hématurie des voies urinaires inférieures
 - Cette hématurie est généralement associée à une maladie des voies urinaires inférieures
 - Les globules rouges ont leur forme et leur couleur typiques (disques réfractaires)
 - avec l'hypertonie de l'urine, les globules rouges commencent à avoir un aspect crénelé
- Hématurie dysmorphique
 - Cette hématurie est généralement liée à un saignement glomérulaire
 - Les globules rouges présentent une grande variation dans la taille des cellules (anisocytose), de nombreuses cellules fantômes et un pourcentage élevé de dysmorphocytose (>20 %)
 - Les globules rouges ont des formes et des projections bizarres de la membrane cellulaire appelées bulles

Cellules épithéliales

- Cellules épithéliales tubulaires rénales

Ils sont généralement plus gros que les granulocytes, contiennent un gros noyau rond ou ovale et s'écoulent normalement dans l'urine en petit nombre. Cependant, avec le syndrome néphrotique et dans des conditions conduisant à la dégénérescence tubulaire, le nombre de mues est augmenté.

En cas de lipidurie, ces cellules contiennent des graisses endogènes. Lorsqu'elles sont remplies de nombreuses gouttelettes de graisse, ces cellules sont appelées corps adipeux ovales. Les corps adipeux ovales présentent une configuration en « croix de Malte » par microscopie à lumière polarisée. Ces cellules sont généralement observées dans une protéinurie lourde.

- Cellules épithéliales transitionnelles (cellules urothéliales)

Proviennent du bassin du rein, l'uretère ou la vessie ont des bords cellulaires plus réguliers, des noyaux plus grands et une taille globale plus petite que l'épithélium squameux. Les cellules transitionnelles sont des éléments normaux du sédiment urinaire. La forme de la cellule change légèrement en fonction de la section des voies urinaires inférieures. La présence de cellules transitionnelles est plus fréquente chez les personnes âgées.

Contrairement aux cellules isolées, la présence de fragments épithéliaux transitionnels est presque toujours associée à une situation anormale. Dans la majorité des cas, les cellules ont un aspect normal et forment une fine feuille où il est facile de délimiter chaque cellule. On dit que ces feuilles ont un aspect semblable à un mur de briques. La présence de ce type de fragments peut être le résultat d'une sonde urinaire ou d'une autre affection qui provoque une érosion de la surface de l'épithélium de la vessie. Dans certaines conditions irritantes prolongées, les cellules transitionnelles peuvent devenir réactives. Dans ces conditions, les cellules et le noyau augmentent en taille. La taille des cellules peut être variable, mais le rapport noyau/cytoplasme est bien conservé. Des cellules binucléées peuvent être observées.

- Cellules épithéliales squameuses

Ils proviennent de la surface de la peau ou de l'urètre externe. Leur signification est qu'ils représentent une possible contamination de l'échantillon par la flore cutanée.

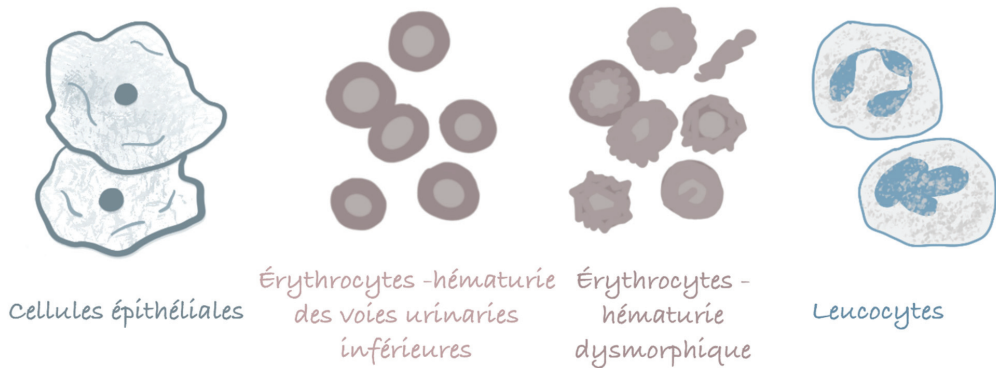


Figure 3. Cellules des sédiments urinaires

b) **Cylindres urinaires**

Les cylindres sont des sédiments urinaires formés par la coagulation de substances albumineuses dans les tubules rénaux. La protéine de Tamm-Horsfall constitue la substance fondamentale du cylindre.

On considère que tous les éléments nécessaires à la formation des cylindres sont présents dans le rein. Certains facteurs présents dans les urines anormales favorisent cette formation, tandis que d'autres, présents dans les urines normales, exercent un effet inhibiteur. Les cylindres apparaissent lorsque l'équilibre entre promoteurs et inhibiteurs est rompu. Les principaux facteurs favorisant leur formation sont: l'albumine, la stase urinaire, les débris cellulaires, un faible débit de filtration glomérulaire, un pH acide, la présence de certaines protéines (Bence-Jones, myoglobine, hémoglobine) et une osmolalité comprise entre 200 et 400 mOsm/kg.

Les cylindres ont une forme cylindrique, de diamètre variable, avec des bords parallèles et des extrémités généralement arrondies. Leur présence dans l'urine indique toujours une atteinte rénale, et elle doit être signalée. Lorsqu'ils sont présents en grand nombre, l'urine est presque toujours positive à l'albumine. On distingue plusieurs types de cylindres: Cylindres hyalins, Cylindres érythrocytaires, Cylindres leucocytaires, Cylindres granulaires, Cylindres épithéliaux, Cylindres cireux, Cylindres graisseux.

- Les cylindres hyalins sont les plus fréquemment observés dans l'urine. Ils peuvent apparaître même dans les affections rénales les plus légères. Ils sont incolores, homogènes, transparents et présentent généralement des extrémités arrondies.
- Les cylindres érythrocytaires ^{Figure 4. Cellules des sédiments urinaires} sont de couleur brunâtre à presque incolore et sont généralement diagnostiques d'une atteinte glomérulaire.
- Les cylindres leucocytaires sont présents en cas d'infection rénale ou d'inflammation non infectieuse. La majorité des cellules observées dans ces cylindres sont des neutrophiles hypersegmentés.
- Les cylindres granulaires indiquent presque toujours une atteinte rénale significative, bien qu'ils puissent apparaître temporairement après un effort physique intense. Ceux contenant des granulations fines sont gris ou jaune pâle, tandis que ceux à grosses granulations sont plus sombres, parfois noirs, en raison de la densité des granules.

- Les cylindres épithéliaux sont rarement observés car les affections tubulaires rénales primaires sont peu fréquentes. Les cellules épithéliales peuvent y être disposées en rangées parallèles ou de manière désordonnée.
- Les cylindres cireux résultent de la dégénérescence des cylindres granulaires. On les retrouve chez des patients souffrant d'insuffisance rénale chronique sévère, d'hypertension maligne ou de néphropathie diabétique. Ils apparaissent jaunes, gris ou incolores, souvent courts et larges, avec des extrémités émoussées ou fracturées, et présentent parfois des bords fissurés ou dentelés.
- Les cylindres graisseux apparaissent lors d'une dégénérescence graisseuse de l'épithélium tubulaire, comme dans les maladies tubulaires dégénératives, le lupus érythémateux disséminé ou les intoxications rénales toxiques. Un cylindre graisseux typique contient à la fois de grosses et de petites gouttelettes lipidiques, ces dernières étant brun jaunâtre.



Figure 4. Cylindres urinaires

c) Cristaux

À l'exception des cristaux de cystine et de quelques autres, la majorité des cristaux trouvés dans les sédiments urinaires ont une valeur clinique limitée. Il est tentant d'associer les cristaux à un risque de lithiase urinaire, mais la majorité des patients atteints d'une cristallurie n'ont pas et ne développeront pas de calculs rénaux. De nombreuses situations bénignes peuvent provoquer la formation de cristaux. Dans la majorité des cas, les cristaux présents dans l'urine ne sont pas présents dans l'échantillon fraîchement évacué. L'alcalinisation et la réfrigération sont des facteurs favorisant la formation de cristaux.

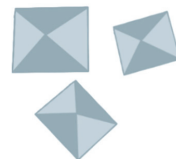
Tableau 6. Taux d'urobilinogène et de bilirubine dans l'urine

	Type	Ocuurence (%)
Oxalate de calcium	Oxalate de calcium monohydraté	70
	Oxalate de calcium dihydraté	
Phosphate de calcium	Hydroxyle-apatite	10
	Carbonate-apatite	
	Hydrogénophosphate de calcium	
	Hydrogénophosphate de calcium	
Phosphate triple = Phosphate de magnésium et d'ammonium		5-10
Acide urique		<5
Cystine		1

Il est impossible de dissoudre la quantité de calcium, de phosphate et d'oxalate éliminée dans un échantillon d'urine de 24 heures dans 1 à 2 litres d'eau. Il est donc nécessaire de conclure à la présence de substances inhibitrices de la cristallisation. Les inhibiteurs connus de la cristallisation urinaire sont le pyrophosphate, le citrate, le magnésium et certaines macromolécules. La protéine Tamm-Horsfall est considérée comme un inhibiteur important de l'oxalate de calcium. On pense que ce rôle est dû au résidu d'acide sialique de la protéine. Alors que la protéine entièrement sialée est un inhibiteur, les résidus sialiques manquant de protéine sont un promoteur de cristallisation.

Cristaux d'oxalate de calcium

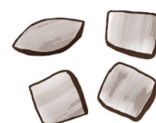
Dans le sédiment urinaire, on peut trouver deux formes de cristaux d'oxalate de calcium. La forme la plus fréquente est l'oxalate de calcium dihydraté. Le nom minéralogique de l'oxalate de calcium $2(H_2O)$ est Weddellite. La deuxième forme est l'oxalate de calcium mono-hydraté dont le nom minéralogique est Whewellite. Les deux formes ont des caractéristiques cristallographiques différentes. Il semble que le rapport calcium/magnésium joue un rôle important dans la formation des cristaux d'oxalate de calcium. Les cristaux d'oxalate de calcium se trouvent principalement dans l'urine acide, mais ceux-ci peuvent également être observés dans des échantillons légèrement alcalins.



Dans certains cas, la cristallisation de l'oxalate de calcium est massive et catastrophique. Un exemple typique de cette « catastrophe oxalique » clinique est l'intoxication à l'éthylène glycol. Dans cette situation, on peut retrouver des cristaux d'oxalate dans les tissus du patient. Le syndrome de toxicité touche des organes tels que le foie, les reins et le cerveau, et s'accompagne d'une acidose métabolique. Naturellement, la cristallurie oxalique est alors massive et dominée par des cristaux ovoïdes de whewellite formant des microlithes. La présence de cylindres d'oxalate de calcium est très significative, car elle indique que les cristaux d'oxalate se sont formés alors que l'urine était à sa dilution maximale.

Cristaux d'acide urique

Les cristaux d'acide urique peuvent apparaître sous plusieurs formes. Les cristaux classiques sont de fines plaques en forme de losange avec des sommets plus ou moins érodés. Les autres formes sont la plaque hexagonale, l'aiguille et la rosette. Les cristaux d'acide urique ont généralement une couleur jaune caractéristique. L'intensité de la couleur dépend de l'épaisseur du cristal, ainsi les plaques très fines semblent incolores, tandis que les cristaux massifs ont une couleur qui a tendance à être brune. Sous la lumière polarisée, l'acide urique présente une couleur de polarisation, et avec des cristaux plus épais, une série de lignes noires concentriques. La variation de couleur observée sous la lumière polarisée est assez typique de l'acide urique.



Environ 66 à 75 % de l'acide urique est éliminé par l'urine. La quantité à éliminer dépend surtout de l'alimentation (viande). En cas d'augmentation de l'uricosurie, des valeurs $> 4,5$ mmol/j sont observées. Les cristaux d'acide urique se forment lorsque le pH urinaire est de $< 5,5$ puisque le pK de l'acide urique est de 5,5. La cristallurie à l'acide urique est principalement due à un faible volume de dilution à un pH acide, ou à une surproduction. Dans la plupart des cas, ce résultat a peu de valeur clinique et représente une situation précise.

Cristaux de phosphates triples

Les triples phosphates (phosphate de magnésium et d'ammonium, Struvite) se retrouvent dans les urines dont le pH est supérieur à 6,5. Le principal facteur de formation des cristaux de phosphate triple est la concentration d'ammoniac. L'alcalinisation d'un échantillon d'urine avec de l'ammoniac génère des phosphates triples alors que l'alcalinisation avec de l'hydroxyde de sodium ne le fait pas. Un spécimen normal fraîchement vidé contient peu d'ammoniac libre; Cette substance est principalement générée par des bactéries qui divisent l'urée (ex: espèce *Proteus*). Les triples phosphates sont généralement associés à la croissance bactérienne. Avec un échantillon frais du premier matin, les triples phosphates peuvent indiquer une infection des voies urinaires. Sinon, les triples phosphates ont peu de valeur clinique.



Cristaux de cystine

La présence de cristaux de cystine est une découverte cliniquement significative. La cystine se présente sous la forme de plaques hexagonales incolores. La solubilité de la cystine est beaucoup plus grande dans l'urine alcaline, de sorte que la première se trouve rarement dans l'urine alcaline. Ces cristaux incolores peuvent être difficiles à distinguer de la forme de plaque hexagonale des cristaux d'acide urique. Mais, dans ce cas, l'examen des cristaux sous lumière polarisée montrera probablement des cristaux biréfringents avec une interférence de couleur de polarisation. Les cristaux de cystine sont assez rares.



Les cristaux de cystine se trouvent dans l'urine de presque exclusivement des patients atteints d'une maladie génétique donnant une déficience avec la réabsorption tubulaire de l'acide aminoïde basique: lysine, arginine, ornithine et cystine. Cette maladie est appelée cystinurie. Pour quelques patients atteints de cystinurie, des calculs se développeront. La lithiase urinaire dépend fortement du pH urinaire et de l'apport en eau. La cystine est moins soluble à un pH inférieur à 5,0 (saturation 300 mg/l); la saturation est de 500 mg/l à un pH de 7,4.

d) Bactéries

Les bactéries sont courantes dans les échantillons d'urine en raison de la flore microbienne normale abondante du vagin ou du méat urétral externe et de leur capacité à se multiplier rapidement dans l'urine à température ambiante. Par conséquent, les organismes microbiens présents dans toutes les urines, sauf les plus scrupuleusement recueillies, doivent être interprétés à la lumière des symptômes cliniques.

Le diagnostic de bactériurie en cas de suspicion d'infection urinaire nécessite une culture. Un dénombrement des colonies peut également être effectué pour voir si un nombre important de bactéries sont présentes. En général, plus de 100 000/ml d'un organisme reflète une bactériurie importante. De multiples organismes reflètent la contamination. Cependant, la présence de tout organisme dans les échantillons de robinetterie par cathétérisme ou sus-pubien doit être considérée comme significative.

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L5. INVESTIGATIONS BIOCHIMIQUES DU SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE

OBJECTIFS D'APPRENTISSAGE

Identifier les principaux marqueurs biochimiques utilisés dans l'évaluation des maladies cardiovasculaires.

Expliquez la cinétique et la signification diagnostique des principaux biomarqueurs cardiaques après une lésion du myocarde.

Décrivez le rôle des paramètres du profil lipidique dans l'évaluation du risque cardiovasculaire.

Interpréter les résultats de laboratoire dans le contexte des pathologies cardiovasculaires courantes.

POINTS CLÉS

Les troponines I et T sont les marqueurs les plus sensibles et spécifiques des lésions myocardiques; ils sont actuellement la référence en matière de diagnostic d'infarctus aigu du myocarde (IMA).

Le CK-MB augmente 4 à 6 heures après l'IAM, atteint un pic entre 12 et 24 heures, puis se normalise en 48 à 72 heures; Les troponines restent élevées pendant 7 à 14 jours.

Le profilage lipidique (cholestérol total, LDL-C, HDL-C) est essentiel pour évaluer le risque cardiovasculaire à long terme et surveiller le traitement.

La BNP et la NT-proBNP sont des marqueurs de surcharge de volume cardiaque utilisés dans le diagnostic et la surveillance de l'insuffisance cardiaque.

Les d-dimères sont augmentés après qu'un caillot sanguin a été dégradé par la fibrinolyse.

ASPECTS GENERAUX

Le changement pathologique le plus courant qui affecte la fonction cardiaque est l'**ischémie** (manque de circulation sanguine adéquate pour assurer l'oxygène nécessaire au fonctionnement du myocarde). Bien que le cœur pompe plusieurs litres de sang toutes les minutes, la vascularisation et le transport du sang artériel vers le cœur s'effectuent par les artères coronaires qui peuvent être affectées par **athérosclérose** (processus chronique de lésions de l'endothélium vasculaire par lequel sont produites des plaques d'athérosclérose qui peuvent bloquer partiellement ou totalement la lumière vasculaire, réduisant ainsi le flux sanguin; les plaques d'athérosclérose favorisent également l'apparition de caillots sanguins qui peuvent bloquer complètement ou partiellement les branches des artères coronaires, provoquant **Syndrome coronarien aigu-SCA**).

Le groupe de maladies qui se développent à la suite de l'atteinte du flux sanguin coronaire constitue la maladie coronarienne, sa manifestation la plus grave étant l'**infarctus aigu du myocarde (IAM)**, lorsque les artères coronaires ou leurs branches sont totalement bloqués et une nécrose des cellules myocardiques se produit.

BIOMARQUEURS DES LÉSIONS CARDIAQUES ISCHÉMIQUES

En fonction de la taille du territoire nécrotique, la mort cellulaire va provoquer la libération de nombreux composés biochimiques, plus ou moins spécifiques au myocarde, dont la détermination permet d'établir un diagnostic rapide, indispensable pour sauver la vie du patient.

Parmi les biomarqueurs associés à l'ischémie et à la nécrose des cellules cardiaques, actuellement, le biomarqueur le plus spécifique et le plus sensible est considéré comme la troponine cardiaque. D'autres biomarqueurs cardiaques utiles au diagnostic sont: la créatine kinase (CK: CK totale et l'isoenzyme CK-MB), AST (GOT, ASAT), LDH, la myoglobine, mais leur spécificité est plus faible car ils se trouvent également dans d'autres tissus.

L'évolution de la concentration des biomarqueurs cardiaques de la nécrose des cellules myocardiques, ainsi que des biomarqueurs permettant de la différencier des autres pathologies, est différente dans l'intervalle de temps écoulé depuis l'événement ischémique (Tableau 1 et Figure 1).

Tableau 1. Les principales caractéristiques des biomarqueurs cardiovasculaires

Marqueur cardiaque	Poids moléculaire (GM, Da)	Début (heures)	Maximum (heures)	Disparaître (jours)
CK	80000	4-8	18-30	3-4
CK-MB	80000	3-8	12-24	2-3
La LDH	135000	8-12	48-72	8-14
Myoglobine	18000	1-3	6-9	1
Troponine I	24000	3-8	24-48	4-10
Troponine T	37000	3-8	24-48	4-10
ASAT (GOT)		72-96	5-6 jours	12-14
D-Dimères	200000	4-8	12-24	2-4
Peptide natriurétique de type B (BNP)		8-12	12-24	2-3

Concentration des marqueurs cardiaques

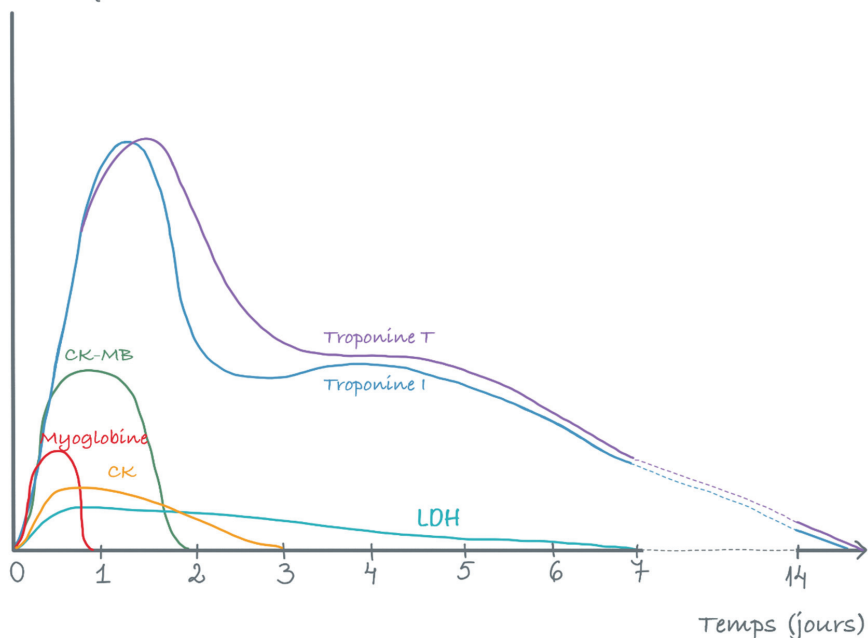


Figure 1. Évolution temporelle des concentrations de biomarqueurs dans l'IAM

1. Troponine cardiaque

La troponine (Tn) est un complexe régulateur constitué de 3 protéines situées à intervalles réguliers dans les filaments minces des muscles striés (composés d'actine, de tropomyosine et de troponine). Les trois protéines individuelles sont: TnT (sous-unité liée à la tropomyosine, 37 kDa), TnI (sous-unité inhibitrice liée à l'actine, 24 kDa) et TnC (sous-unité de liaison au Ca^{2+} , 18 kDa). Dans l'état musculaire détendu, TnI est lié à l'actine, bloquant sa liaison à la myosine. Le déclenchement de la contraction musculaire est accompli par Ca^{2+} se liant à TnC, provoquant un changement de conformation qui détache TnI de l'actine, permettant à l'interaction entre l'actine et la myosine d'avoir lieu.

Contrairement aux autres marqueurs, les formes de Tn dans les muscles squelettiques et cardiaques diffèrent. Pour le **TnC**, les formes trouvées dans les fibres de type 2 des muscles squelettiques et myocardiques sont identiques, ce qui rend impossible son utilisation comme marqueur différentiel. **TnI** a une forme cardiospécifique (cTnI = TnI cardiaque), ainsi que différentes formes dans les fibres musculaires striées de type 1 et de type 2, chacune codée par un gène distinct. **La TnT** a des formes distinctes dans le myocarde (cTnT = TnT cardiaque), le muscle squelettique à contraction rapide et à contraction lente, mais la cTnT a été détectée dans le muscle squelettique fœtal et le muscle squelettique malade. Dans tous les cas, les modifications post-traductionnelles produisent des différences détectables entre la cTnT produite dans le myocarde et la cTnT produite dans le muscle squelettique malade, de sorte que les tests commerciaux de la génération actuelle (ELISA) devraient avoir une spécificité myocardique proche de 100 %. Cependant, de légères augmentations de la cTnT circulante, à l'aide de tests encore plus récents, ont été signalées chez des patients atteints de dystrophie musculaire et d'insuffisance rénale qui ne présentent aucun autre signe de maladie cardiaque.

Dans les myocytes cardiaques, cTnT et cTnI sont principalement liés aux fibres musculaires comme décrit ci-dessus, et la forme liée est lentement libérée dans les 1 à 2 semaines suivant l'infarctus du myocarde. Ainsi, bien que cTnI et cTnT soient des protéines relativement petites qui sont rapidement éliminées, leur taux plasmatique diminue lentement après une lésion cardiaque.

Une petite fraction de cTn dans les cellules myocardiques se trouve libre dans le cytoplasme (en moyenne 6 % pour cTnT et 2,5 % pour cTnI). La fraction libre est libérée précocement des cellules myocardiques affectées et permet sa détection dans un intervalle de temps similaire à celui de la CK-MB, cTn atteignant un maximum environ 24 heures après l'infarctus du myocarde.

En raison de la libération lente de la fraction cTn liée, la diminution rapide de la cTn circulante immédiatement après avoir atteint le maximum est suivie d'un plateau, voire d'une légère augmentation secondaire. *Il est important qu'une telle augmentation ne soit pas interprétée comme un marqueur d'un autre infarctus.* La cTn circulante diminue à des valeurs normales après 5 à 10 jours, selon la taille de l'infarctus.

2. Créatine kinase (CK)

La CK est une enzyme dimérique composée de 2 sous-unités catalytiques (chaînes polypeptidiques de structure différente, ayant un poids moléculaire d'environ 40 kDa chacune) appelées M (muscle) et B (cerveau). Les 3 isoenzymes résultant de l'association des deux sous-unités sont: CK-BB (CK1, contenant 2 chaînes B), CK-MB (CK2, contenant une chaîne B et une chaîne M), CK-MM (CK3, contenant 2 chaînes M).

La CK se propage dans tout le corps, ayant les concentrations les plus élevées dans les muscles et le cerveau, bien que pratiquement la CK du cerveau ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique pour atteindre le plasma. Dans le cerveau et les muscles lisses, l'isoenzyme dominante est CK-BB.

Dans le cœur normal, un pourcentage de 15 à 20 % de la CK est représenté par la CK-MB, le reste étant la CK-MM, qui, cependant, n'est pas uniformément distribuée, une plus grande quantité se trouvant dans le cœur droit par rapport au cœur gauche. La CK-MB représente 0 à 1 % de la CK dans les fibres du muscle squelettique de type 1 et 2 à 6 % dans les fibres de type 2. De plus, une augmentation de la production de CK-MB par rapport à la production de CK-MM est observée pendant le processus de régénération musculaire.

La concentration sérique de CK et de CK-MB commence à augmenter 3 à 8 heures après l'apparition de l'IAM, et la quantité libérée est proportionnelle à la masse de nécrose. L'enzyme atteint un maximum après 24 heures et revient à la valeur normale après 48 à 72 heures (Figure 1).

La détermination de la fraction CK-MB est effectuée par des techniques immunométriques, étant une détermination quantitative (l'activité enzymatique n'est pas déterminée). Étant donné que la CK-MB n'est pas entièrement spécifique au myocarde (elle existe également dans les muscles striés), il est plus utile pour le diagnostic en laboratoire de l'IAM de déterminer le rapport entre la CK-MB (exprimée quantitativement en termes de concentration) et l'activité totale de la CK (mesurée en tant qu'activité enzymatique U/L), appelée indice relatif ou pourcentage relatif, car différentes unités de mesure sont utilisées pour les deux composantes du rapport. Un indice plus élevé est caractéristique de l'IAM, et le CK-MB doit dépasser la limite supérieure de la plage de référence à la fois quantitativement (>5 ng/ml) et en pourcentage par le calcul de l'indice (>6 %). Aussi, pour un diagnostic précis, il faut tenir compte de l'évolution de la concentration enzymatique dans le temps (Figure 1).

Soumises à l'électrophorèse, deux isoenzymes CK (CK-MB et CK-MM) présentent tour à tour différentes espèces moléculaires appelées isoformes, qui se forment sous l'action des carboxypeptidases sériques qui hydrolysent les résidus terminaux de lysine (Liz) de la sous-unité M. Ainsi, CK-MB peut avoir un résidu de Lys hydrolysé (CK-MB1) ou aucun (CK-MB2), tandis que CK-MM peut avoir un résidu de lysine lysé (CK-MM2), deux résidus de Liz (CK-MM1) ou aucun (CK-MM3). Cette modification qui donne naissance aux isoformes de CK ne se produit qu'après la

libération d'enzymes dans le sang à la suite de lésions tissulaires. Ainsi, dans l'IAM, des isoformes tissulaires natives sans résidus de lysine hydrolysée de CK (CK-MB2 et CK-MM3) sont libérées dans la circulation, mettant plusieurs heures à se transformer en isoformes CK-MB1 et CK-MM1/CK-MM2.

Par conséquent, un rapport plus élevé de CK-MB2/CK-MB1 et CK-MM3/CK-MM1 indique qu'une libération récente d'enzymes dans la circulation s'est produite. Cette augmentation du rapport des isoformes est observée peu de temps avant que le CK-MB sérique ne dépasse la limite supérieure de la plage de référence, de sorte que, dans les 3-4 premières heures après l'apparition des symptômes, cette détermination peut augmenter la sensibilité du diagnostic d'IAM. Les tests peuvent être effectués avec un système d'électrophorèse rapide qui restera dédié à ce type d'analyse.

3. LDH (*lactate déshydrogénase*)

La LDH est une enzyme Zn, d'un poids moléculaire de 135 kDa, ayant une structure tétramérique impliquant deux sous-unités, H (cœur) et M (muscle). En combinant les 2 sous-unités, 5 isoenzymes donnent: LDH1 (HHHH), LDH2 (HHHM), LDH3 (HHMM), LDH4 (HMMM) et LDH5 (MMMM). L'isoenzyme LDH1 est relativement abondante dans le myocarde et l'isoenzyme LDH5 est plus répandue dans les muscles striés.

Il s'agit d'un marqueur de nécrose myocardique moins spécifique qui contribue, avec l'ASAT, au diagnostic tardif de l'IAM, sa cinétique plasmatique étant lente (Figure 1). Son inconvénient est la très faible spécificité pour le myocarde, il peut également être libéré par les muscles squelettiques, les poumons, les reins, le foie, les érythrocytes. La spécificité de la LDH est augmentée par la détermination de l'activité isoenzymatique de la LDH1.

L'activité de la LDH1 augmente dans les 8 à 12 heures suivant le début de la nécrose, atteint un maximum dans les 48 à 72 heures et revient à la normale dans les 8 à 14 jours suivant l'IAM. Parce que la demi-vie est prolongée, la LDH1 est utile pour le diagnostic des patients qui se présentent tardivement. L'augmentation du rapport LDH1/LDH2 supérieure à 0,75, déterminée par l'augmentation de la concentration de LDH1 par rapport à LDH2 (LDH2 normale > LDH1), a une sensibilité et une spécificité de plus de 90 % pour la nécrose myocardique. Actuellement, il s'agit d'une détermination rare par rapport aux marqueurs de choix (cTn, CK-MB).

4. Myoglobine

La myoglobine est une hémoprotéine qui lie l'oxygène dans les muscles squelettiques et le myocarde. Il n'y a qu'une seule forme commune aux deux types de muscles. En l'absence de spécificité cardiaque, l'utilité de la myoglobine découle de sa cinétique (Figure 1).

Avec un poids moléculaire de seulement 18 kDa, il se diffuse hors des cellules affectées plus rapidement que les autres protéines. L'augmentation des concentrations sériques apparaît 1 à 3 heures après les premiers symptômes de l'IAM, plus rapidement que dans le cas de la troponine ou d'autres marqueurs. La myoglobine est éliminée principalement par filtration glomérulaire. La demi-vie est d'environ 4 heures, mais elle est plus longue si la fonction rénale est altérée. De manière caractéristique, le taux de myoglobine atteint un maximum environ 6 à 9 heures après l'IAM et revient à des valeurs normales après 24 heures. Chez les individus en bonne santé, les niveaux de myoglobine dépendent de la masse musculaire et de l'activité musculaire, de la même manière que le modèle CK.

Les taux plasmatiques sont plus élevés chez les hommes que chez les femmes. Le taux de myoglobine augmente avec l'âge, ce qui reflète la diminution du taux de filtration glomérulaire. La variation quotidienne est d'environ 10 à 15 %.

Malgré le manque de spécificité de la myoglobine pour le myocarde, en tant que test pour l'IAM, elle offre une spécificité clinique assez élevée (95 %) lorsque les patients atteints d'insuffisance rénale ou suspectés de maladies musculaires sont exclus.

5. ASAT/AST/GOT (Aspartate aminotransférase)

C'est l'un des premiers marqueurs enzymatiques qui a été utilisé pour le diagnostic de l'IAM, actuellement remplacé par des marqueurs beaucoup plus spécifiques, précédemment présentés. L'enzyme est libérée à la suite d'une nécrose myocardique, mais n'est pas spécifique.

Son activité peut également augmenter dans les maladies de la cytolysse hépatique (stase hépatique), les maladies pulmonaires (thromboembolie pulmonaire), les maladies et traumatismes musculaires, la gangrène, les anémies hémolytiques, la pancréatite aiguë.

BIOMARQUEURS UTILES DANS LE DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL DE L'ISCHEMIE CARDIAQUE

D-Dimères

Au cours du processus de coagulation, la thrombine convertit le fibrinogène en fibrine soluble en éliminant protéolytiquement les fibrinopeptides A et les fibrinopeptides B. La fibrine soluble polymérise spontanément et les régions D sont réticulées de manière covalente, un processus qui est catalysé par le facteur XIII.

La fibrine est finalement dégradée par la voie fibrinolytique. La plasmine clive la fibrine, réticule, et libère des produits de dégradation de la fibrine sous la forme de deux molécules D fragmentées réticulées avec des GM de 200 kDa (D-dimères).

Des taux élevés de D-dimères circulants ont été décrits chez des patients atteints d'embolie pulmonaire, de thrombose veineuse profonde et de coagulation intravasculaire disséminée.

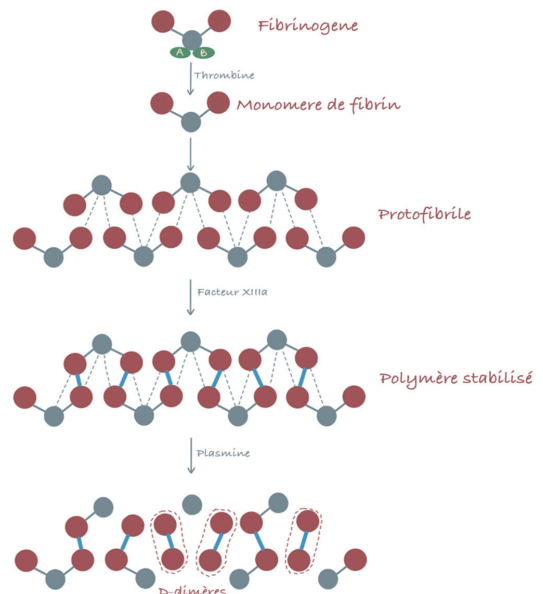


Figure 2. Production de D-dimères

Peptide natriurétique de type B (BNP) fait partie d'une classe d'hormones qui régulent la pression artérielle. Chez l'homme, le cœur (myocarde ventriculaire) est la principale source de BNP circulante. La molécule est libérée dans le sang en réponse à l'augmentation de la pression cardiaque. Différentes études ont démontré que des niveaux élevés de BNP circulant sont trouvés dans les premiers stades de l'insuffisance cardiaque chronique. Le taux de BNP dans le sang continue d'augmenter à mesure que l'insuffisance cardiaque chronique progresse. De plus, le BNP s'est avéré utile comme indicateur pronostique chez les patients atteints de syndromes coronariens aigus ainsi que comme test initial pour exclure l'IC chez les patients atteints de dyspnée.

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

Détermination des paramètres biochimiques du système cardiovasculaire à l'aide du panel SOB du Triage Profiler

Alere Triage Profiler Panneau SOB

Alere Triage Profiler SOB Panel (Shortness of Breath = Dyspnea) est un test d'immunofluorescence destiné à être utilisé avec les appareils de mesure Alere Triage, pour la détermination quantitative des paramètres plasmatiques suivants:

- Créatine kinase MB;
- Myoglobine;
- Troponine I;
- Le BNP;
- D-dimères.

Ce test est utilisé pour:

- Diagnostic IAM;
- évaluation du pronostic des patients atteints de SCA;
- diagnostic et évaluation du degré d'IC;
- évaluation du pronostic des patients atteints d'IC;
- évaluation des patients suspectés d'ICD ou d'événements thromboemboliques (embolie pulmonaire).

Échantillons biologiques utilisés: sang total ou plasma anticoagulé à l'EDTA.

Le principe de la procédure d'essai

La procédure de test consiste à ajouter quelques gouttes de sang total ou de plasma anticoagulant EDTA dans l'orifice d'échantillon de l'appareil de test. L'échantillon réagit avec les conjugués d'anticorps fluorescents et s'écoule à travers le dispositif de test par capillarité. Les complexes de chaque conjugué d'anticorps fluorescent avec l'antigène sont capturés dans différentes zones, spécifiques à chaque analyte. Le dispositif de test est inséré dans le compteur de triage Alere, qui est programmé pour effectuer l'analyse après que l'échantillon a réagi avec les réactifs du dispositif de test.

L'analyse est basée sur la détermination quantitative de la fluorescence par l'appareil de mesure dans une zone de mesure de l'appareil d'essai. La concentration de l'analyte dans l'échantillon est directement proportionnelle à la fluorescence détectée. Les résultats sont affichés sur l'écran du compteur environ 20 minutes après l'ajout de l'échantillon. Tous les résultats sont stockés dans la mémoire de l'appareil de mesure pour être affichés ou imprimés si nécessaire. S'il est connecté, l'appareil de mesure peut transmettre les résultats au système informatique du laboratoire ou de l'hôpital.

Réactifs

L'appareil de test contient:

- Anticorps monoclonaux murins contre CK-MB, myoglobine, troponine I, D-dimères et BNP;
- Anticorps polyclonaux murins contre CK-MB, myoglobine et BNP;
- Anticorps polyclonaux de chèvre contre la troponine I;
- Colorant fluorescent;
- Stabilisateurs

Procédure d'essai

- Les échantillons de sang total et les instruments de test sont conservés dans le réfrigérateur.
- Avant le test, ils doivent être laissés à température ambiante 15~min.
- L'appareil d'essai n'est retiré de la feuille individuelle qu'au moment de l'application de l'échantillon.

Étape I - Ajout de l'échantillon biologique prélevé sur le patient (sang)

1. Ouvrez le film protecteur de l'appareil de test.
2. Placez l'appareil de test sur une surface horizontale et plane.
3. Avant l'application, l'échantillon de sang entier est mélangé doucement en inversant le tube plusieurs fois pour éviter l'hémolyse.
4. À l'aide de la pipette de transfert, pressez complètement la grande poire (supérieure) et insérez la pointe dans l'échantillon de sang entier.
5. Relâchez lentement l'ampoule. Le baril de la pipette de transfert doit être complètement rempli, avec un peu de liquide s'écoulant dans le petit bulbe (inférieur) (doit remplir <1/4 du volume du bulbe inférieur).
6. Insérez l'extrémité de la pipette de transfert dans l'orifice d'échantillonnage de l'appareil de test et pressez complètement la grande ampoule. Tout le volume de liquide dans le cylindre de la pipette de transfert doit s'écouler dans l'orifice d'échantillon. Le contenu de l'échantillon dans le petit bulbe (inférieur) ne doit pas être évacué.
7. Retirez l'extrémité de la pipette de transfert de l'orifice d'échantillon, puis relâchez la grande poire (supérieure).
8. Jetez la pipette de transfert.
9. Laissez l'échantillon de sang entier absorber complètement (environ 15 min) avant d'insérer le dispositif de test dans la machine.

Étape II - Exécuter le test

1. Insérez l'appareil dans la prise et allumez-le à l'aide du bouton ON;
2. Attendez environ 2 minutes pour l'initialisation.
3. À partir de l'écran principal, sélectionnez Exécuter le test (à l'aide des flèches haut/bas) et appuyez sur Entrée.
4. Sélectionnez Échantillon de patient (à l'aide des flèches haut/bas) et appuyez sur Entrée.
5. Entrez le numéro d'identification du patient et appuyez sur Entrée.
6. Confirmez le numéro correct en sélectionnant Confirmer l'identifiant du patient et en appuyant sur Entrée. Si le numéro n'a pas été saisi correctement, sélectionnez Correct Patient ID, appuyez sur Entrée et répétez l'étape précédente.
7. En tenant l'appareil de test par les bords, insérez-le lentement dans l'appareil de mesure jusqu'à ce que vous entendiez un *clic* et appuyez sur Entrée.
8. L'appareil de test doit être inséré dans l'appareil de mesure dans un délai maximal de 30 minutes à compter de l'ajout de l'échantillon.
9. Les résultats sont imprimés automatiquement en 15 min et un signal sonore (bip) se fait entendre. Un résultat bloqué indique que le résultat n'était pas valide et que le test doit être répété;

10. Retirez l'appareil de test de l'appareil et jetez-le.
11. Éteignez l'appareil à partir du bouton ON.

Valeurs normales (valeurs de référence):

- CK-MB: 0,1 à 4,3 ng/mL;
- MYO: 0,1 à 107 ng/mL;
- TN-I: 0,01 à 0,40 ng/mL;
- BNP: 0,1 à 100 pg/mL;
- D-DIM: 0,1 à 600 ng/mL.

ÉTUDE DE CAS

1. Patient: AB, sexe: M, 55 ans

Le patient présente les symptômes suivants: douleur thoracique sévère avec irradiation à l'épaule gauche et au bras gauche, essoufflement (dyspnée), sueurs froides, nausées, anxiété. Le médecin recommande d'effectuer l'analyse biochimique suivante et comparez ces valeurs avec les valeurs normales et établissez un diagnostic éventuel.

Examen biochimique du sang

Dénomination	Résultat	Plage de référence	Dénomination	Résultat	Plage de référence
Glycémie à jeun	130 mg/dl	75 à 115 mg/dl	Bilirubine directe	0,2 mg/dl	<0,2 mg/dl
HbA1c	5 %	4-6 %	Bilirubine totale	0,9 mg/dl	<1 mg/dl
L'ALAT	30 U/l	F:10-22 U/l M:10-29 U/l	Protéines totales	6,2 g/dl	6,2 à 8 g/dl
ASAT	125 U/l	F:10-21 U/l M:10-25 U/l	Hémoglobine	14,6 g/dl	F: 12-16 g/dl M: 14-18 g/dl
Urée	40 mg/dl	15 à 45 mg/dl	hsCRP	43 mg/l	<1 mg/l de risque CV faible 1-3 mg/l risque CV moyen >3 mg/l de risque CV élevé
Créatinine	1,0 mg/dl	F<0,9 mg/dl M<1,1 mg/dl	cTnI	50 ng/ml	0,01 à 0,40 ng/ml
Clairance de la créatinine	100 ml/min	95 à 150 ml/min	Cystatine C	0,99 mg/l	0,49 à 1,13 mg/l
Acide urique	5 mg/dl	F: 2,5-7 mg/dl M: 3-9 mg/dl	Réserve alcaline	23 mEq/l	22 à 27 mEq/l
Amylase	68 U/l	50 à 100 U/l	Na+	144 mEq/l	135 à 145 mEq/l
Cholestérol total	200 mg/dl	140- 200 mg/dl	K+	4,5 mEq/l	3,8 à 5,4 mEq/l
Cholestérol HDL	20 mg/dl	F:45-65 mg/dl M: 35 à 55 mg/dl	TSH	3,1 mU/ml	0,27 à 4,20 µU/ml
Triacylglycérols	210 mg/dl	F: 40-140 mg/dl M:60-165mg/dl	fT3	2,9 pg/ml	2,2 à 5,5 pg/ml
La LDH	300 U/l	F:135-215 U/l M: 135-225 U / l	fT4	1,8 ng/dl	0,7 à 2,2 ng/dl
CK-MB	113 U/l	2-10 U/l	GGT	22 U/l	F: 5-40 U/l M: 8-61 U/l
			Phosphatase alcaline	200 U/l	F: <240 U/l M:<270 U/l

Examen biochimique de l'urine

Dénomination	Résultat	Plage de référence
Densité	1.025	1.015- 1.025
pH	5.5	6.5
Protéine	+/-	Négatif
Glucose	Négatif	Négatif
Corps cétoniques	Négatif	Négatif
UBG	Normal	Normal
Bilirubine	Négatif	Négatif
Nitrites	Négatif	Négatif
Leucocytes	Négatif	Négatif
Globules rouges	Négatif	Négatif

2. Un homme de 55 ans s'est présenté à l'urgence en se plaignant d'une douleur intense à la poitrine qui persistait depuis une heure. Il avait des antécédents d'angine d'effort depuis deux ans. Quels tests demanderiez-vous au laboratoire de biochimie ?

3. Un homme de 66 ans souffrait d'une douleur à la poitrine centrale pendant l'effort depuis plusieurs mois. Dans l'après-midi précédant son admission, il a eu un épisode de douleur thoracique exceptionnellement grave qui s'est manifesté au repos et qui a persisté pendant environ une heure. À l'admission, son examen physique n'a révélé aucune anomalie et son ECG semblait normal. Les niveaux de troponine étaient clairement élevés. Commentez ces résultats.

4. Un joueur de football qui n'était pas sur le terrain depuis 3 mois, a recommencé à jouer, mais s'est effondré à la 74e minute d'un match. Les tests montrent que sa CK était élevée à 8200 U/L (plage de référence de 30 à 200 U/L), et que la CK-MB représentait 10 % de la CK totale. Le taux de troponine était dans les limites de référence et l'ECG était normal. Commentez ces résultats.

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L6. DÉTERMINATION DE LA PROTÉINE C-RÉACTIVE À HAUTE SENSIBILITÉ

OBJECTIFS D'APPRENTISSAGE

Expliquez le rôle de la protéine C-réactive (PCR) en tant que marqueur inflammatoire en phase aiguë.

Distinguez entre les mesures de CRP standard et de CRP à haute sensibilité (hsCRP).

Décrivez le principe de la détermination ELISA de la hsCRP.

Interpréter les niveaux de hsCRP dans le contexte de la stratification du risque cardiovasculaire.

POINTS CLÉS

La CRP est une protéine de phase aiguë synthétisée par le foie en réponse à une inflammation, une infection ou une lésion tissulaire, médiée par l'interleukine-6.

Le hsCRP mesure la CRP à des concentrations inférieures à 10 mg/L avec une sensibilité analytique élevée et constitue un prédicteur indépendant des événements cardiovasculaires futurs.

Catégories de risque cardiovasculaire du hsCRP: < 1 mg/L = faible risque; 1–3 mg/L = risque intermédiaire; > 3 mg/L = risque élevé (valeurs supérieures à 10 mg/L suggèrent une inflammation aiguë).

L'ELISA (le principe de cette séance pratique) est la méthode standard pour la mesure du hsCRP dans les analyseurs automatisés de chimie clinique.

ASPECTS GENERAUX

La protéine C-réactive (CRP) est une « protéine de phase aiguë » cliniquement significative dont la concentration augmente considérablement (jusqu'à mille fois) à la suite d'un événement inflammatoire et chute rapidement, revenant à des valeurs normales quelques jours après la fin de l'inflammation. Cette protéine est une β -globuline, nommée à l'origine d'après une propriété du sérum de patients gravement malades, qui provoquait la précipitation d'un composant de la paroi cellulaire appelé C-polysaccharide (fraction C) à partir d'extraits de pneumocoque. On a d'abord pensé que la CRP pourrait être une sécrétion pathogène car elle était élevée chez les personnes atteintes de diverses maladies, y compris le cancer, cependant, la découverte de la synthèse hépatique a démontré qu'il s'agissait d'une protéine native.

Le CRP se compose de cinq sous-unités ayant 105 000 Da. La CRP est synthétisée par le foie en réponse à des facteurs libérés par les macrophages et les cellules adipeuses (adipocytes) (Figure 1). La CRP se lie fortement à certains lipides, en particulier les phospholipides/phosphocolines. La CRP est impliquée dans la réponse de l'organisme aux composés étrangers. La CRP augmente les processus d'infection et de maladie inflammatoire (jusqu'à 20 à 30 fois) et est largement mesurée comme une alternative ou un complément à la vitesse de sédimentation érythrocytaire (VSR) qui est moins sensible.

PROTEINE C-REACTIVE A HAUTE SENSIBILITE

La CRP à haute sensibilité (hsCRP) est la même protéine, mais elle est nommée d'après les nouvelles méthodologies de test basées sur les anticorps monoclonaux qui peuvent détecter la CRP à des niveaux inférieurs à 1 mg/L. Le test hsCRP détermine le risque de maladies cardiovasculaires. À l'aide du test hsCRP, les concentrations inférieures à 1, 1 à 3 et supérieures à 3 mg/L correspondent à des groupes à risque faible, modéré et élevé d'événements cardiovasculaires futurs. Certaines études cliniques ont montré qu'une légère augmentation du taux de CRP dans la gamme de 3 à 10 mg/L est associée à un risque accru de manifestation de complications cardiovasculaires.

Principalement, il existe un risque accru de cardiopathie ischémique, mais le risque d'accident vasculaire cérébral ischémique et d'athérosclérose dans d'autres endroits augmente également. Des études cliniques réalisées sur de grands ensembles ont prouvé que les personnes présentant une légère augmentation des CRP avaient des taux de morbidité et de mortalité cardiovasculaires plus élevés. Cette relation est valable non seulement en prévention primaire, pour les personnes auparavant en bonne santé sans complications cardiovasculaires, mais aussi en prévention secondaire, pour les patients atteints de maladies cardiovasculaires.

Cependant, la CRP n'est pas un facteur de risque qui induit l'athérosclérose, c'est juste un indicateur de risque (comme d'autres marqueurs inflammatoires). Le taux de CRP est augmenté chez les personnes présentant des facteurs de risque causaux majeurs tels que le tabagisme, l'hypertension, l'obésité, le syndrome métabolique, le diabète sucré, etc. Le taux de CRP diminue si une personne parvient à réduire le taux de cholestérol, à perdre du poids, à induire une régression du diabète (réduction du surpoids ou de l'obésité), etc. De plus, une légère augmentation de la CRP n'est pas toujours associée à un risque élevé de complications cardiovasculaires: l'interprétation d'un résultat de CRP entre 3 et 10 mg/L doit se faire avec prudence et individuellement, car une légère augmentation de la CRP peut être due à une inflammation de l'organisme sans rapport avec des maladies cardiovasculaires (maladies chroniques de l'intestin, poumons, articulations, etc.), ou peut être le résultat d'un début ou d'une diminution de l'inflammation aiguë.

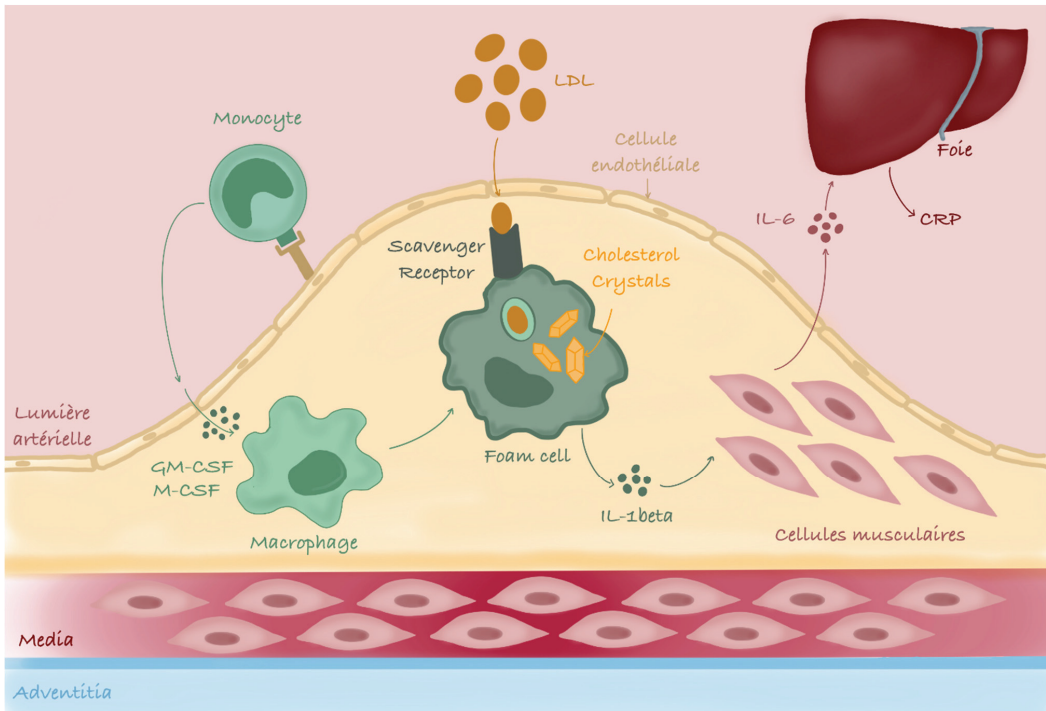


Figure 1. Réponse immunitaire dans l'athérosclérose

Le développement de l'athérosclérose est initié par la rétention de LDL. L'accumulation de lipoprotéines dans l'espace sous-endothélial conduit à une augmentation des molécules d'adhésion à la surface endothéliale ainsi qu'au recrutement des monocytes vers la lésion en formation. Les cellules endothéliales produisent le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF) et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF), qui provoquent la migration des monocytes dans l'espace sous-endothélial et leur différenciation en macrophages. Les cellules musculaires lisses pourraient également se transdifférencier en cellules « macrophage-like ». Ensuite, les cellules spumeuses (foam cells) se forment lorsque les macrophages captent les lipoprotéines via des récepteurs éboueurs (scavengers receptors). Des cristaux de cholestérol se développent dans ces cellules et activent l'inflammasome NLRP3, ce qui conduit à la production d'IL-1 β , qui stimule les cellules musculaires lisses à libérer l'IL-6. Ces deux cytokines, l'IL-1 β et l'IL-6 ont des effets pro-inflammatoires. De plus, l'IL-6 circulante peut déclencher la production de CRP par le foie. Les patients atteints de maladies cardiovasculaires athéroscléreuses présentent généralement des taux élevés de CRP.

PROCÉDÉ D'ESSAI IMMUNO-ENZYMATIQUE (ELISA)

ELISA est l'abréviation de « enzyme-linked immunosorbent assay », également appelé immunodosage enzymatique (EIA). Un ELISA, comme d'autres types d'immunoessais, utilise des anticorps pour détecter un certain antigène à l'aide d'interactions anticorps-antigène spécifiques. Dans un test ELISA, l'antigène est immobilisé sur une surface solide, soit directement, soit par l'utilisation d'un anticorps de capture immobilisé à la surface. L'antigène est ensuite lié à un anticorps de détection, qui est conjugué à une enzyme ou à un fluorophore.

Un test ELISA est généralement réalisé dans une plaque multi-puits (96 ou 384 puits), qui fournit une surface solide pour immobiliser l'antigène, facilitant la séparation de l'antigène du reste des molécules de l'échantillon.

- **Direct ELISA**

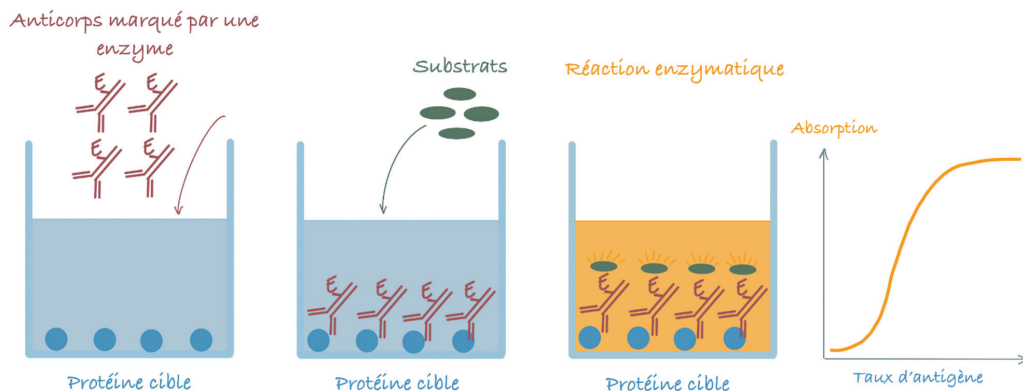


Figure 2. ELISA direct

Dans l'ELISA direct, l'antigène est immobilisé sur une surface solide (généralement une microplaque), puis un anticorps spécifique de l'antigène, conjugué à une enzyme, est ajouté pour la détection. Cette méthode est rapide et simple, mais présente une sensibilité plus faible car il ne comporte pas d'étape d'amplification du signal.

- **Indirect ELISA**

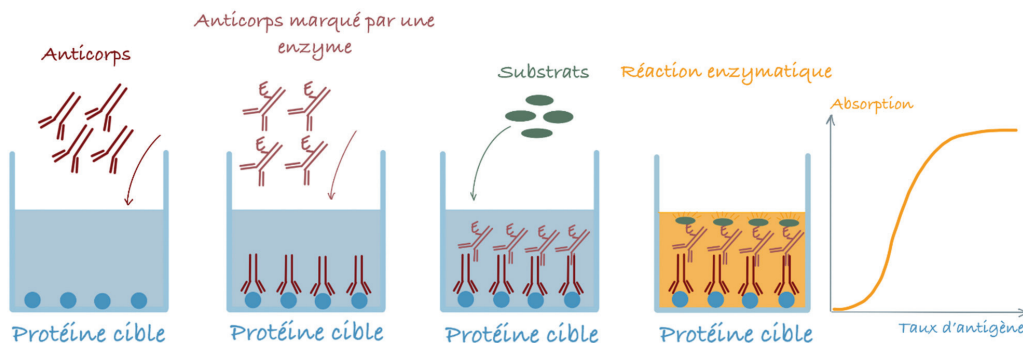


Figure 3. ELISA indirect

Ici, l'antigène est immobilisé et un anticorps primaire s'y lie, suivi d'un anticorps secondaire conjugué à une enzyme qui reconnaît le primaire. Cette approche offre une sensibilité plus élevée en raison de l'amplification du signal, mais implique plus d'étapes et une réactivité croisée potentielle.

- **ELISA compétitif**

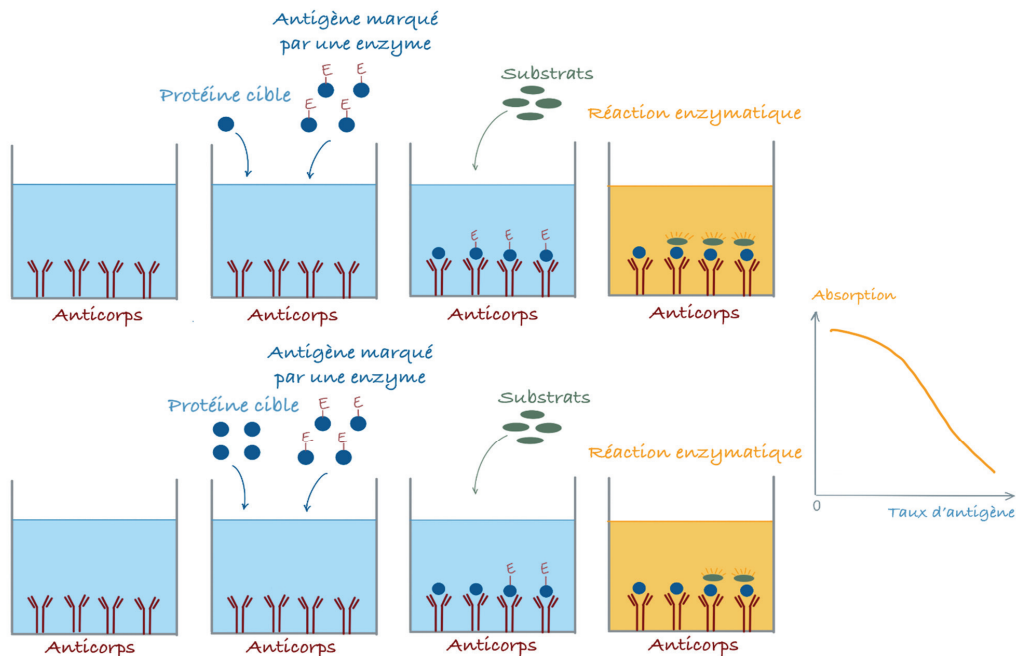


Figure 4. ELISA compétitif

Dans l'ELISA compétitif, l'antigène de l'échantillon est en compétition avec un antigène marqué pour un nombre limité de sites de liaison d'anticorps. L'intensité du signal est inversement proportionnelle à la concentration de l'antigène - plus l'antigène dans l'échantillon est élevé, plus le signal détecté est faible.

- **Sandwich ELISA**

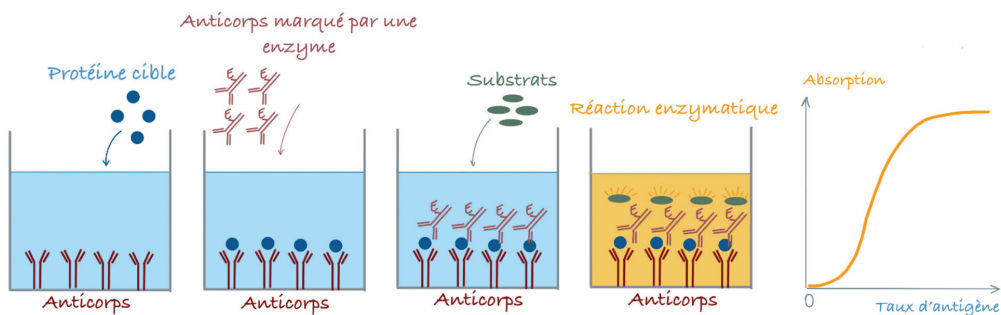


Figure 5. Sandwich ELISA

Dans ce format, l'antigène est « pris en sandwich » entre deux anticorps: un anticorps de capture lié à la plaque et un anticorps de détection qui reconnaît un épitope différent. Cette méthode est hautement spécifique et sensible, idéale pour la détection d'échantillons complexes.

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

Détermination de la hsCRP dans le sérum humain à l'aide du test ELISA

Principe du dosage

L'ELISA hsCRP est basé sur le principe d'un test immuno-enzymatique en phase solide. Le système de dosage utilise un anticorps monoclonal spécifique dirigé contre un déterminant antigénique distinct sur la molécule CRP. Cet anticorps monoclonal de souris anti-CRP est utilisé pour l'immobilisation en phase solide (dans les puits de microtitration). Un anticorps de chèvre anti-CRP, conjugué à une enzyme (peroxydase de raifort, HRP), est inclus dans la solution de conjugaison. L'échantillon de test peut réagir simultanément avec les deux anticorps, ce qui fait que les molécules de CRP sont prises en sandwich entre la phase solide et les anticorps liés aux enzymes.

Après une incubation de 45 minutes à température ambiante, les puits sont lavés à l'eau pour éliminer les anticorps marqués non liés. Un réactif de tétraméthylbenzidine (TMB) est ensuite ajouté et incubé pendant 20 minutes, ce qui entraîne le développement d'une couleur bleue. Le développement de la couleur est arrêté avec l'ajout de 1N HCl changeant la couleur en jaune. La concentration de CRP est directement proportionnelle à l'intensité de la couleur de l'échantillon de test. L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 450 nm.

Procédure d'analyse

1. Le sérum du patient et le sérum de contrôle doivent être dilués 100 fois avant d'être utilisés.
2. Fixez le nombre souhaité de puits revêtus dans le support.
3. Distribuez **10 µL** de sérum dilué dans des puits appropriés.
4. Ajoutez **100 µL** de réactif conjugué de l'enzyme CRP dans chaque puits.
5. Mélangez soigneusement pendant 30 secondes. une homogénéisation complète est essentielle.
6. Incuber à température ambiante (18 °C – 25 °C) pendant 45 minutes.
7. Retirez le mélange d'incubation en jetant le contenu de la plaque dans un récipient à déchets. Rincez le puits 5 fois avec de l'eau désionisée ou distillée. **N'UTILISEZ PAS L'EAU DU ROBINET.**
8. Tapotez fortement les puits sur du papier absorbant ou des serviettes en papier pour éliminer toutes les gouttelettes d'eau résiduelles.
9. Ajoutez une solution de TMB de **100 µL** dans chaque puits. Mélangez doucement pendant 5 secondes.
10. Incuber à température ambiante pendant 20 minutes.
11. Arrêtez la réaction en ajoutant **100 µL** de solution Stop dans chaque puits.
12. Mélangez doucement pendant 30 secondes. **Il est important de s'assurer que toute la couleur bleue se transforme complètement en couleur jaune.**
13. Mesurer l'absorbance à 450 nm avec un lecteur à puits **dans les 15 minutes** suivant l'ajout de la solution stop.

Valeurs attendues

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse sa propre plage normale en fonction de la population de patients. Cependant, d'après la littérature publiée, on s'attend à ce que les personnes en bonne santé aient des valeurs de CRP comme suit:

Sérum adulte: **<1 mg/L** - faible risque de développer une maladie cardiovasculaire;

1-3 mg/L - risque moyen;

3 à 10 mg/L - risque élevé;

>10 mg/L - évaluation du patient pour la présence d'autres pathologies inflammatoires, d'infections aiguës.

Principe du kit ELISA quantitatif

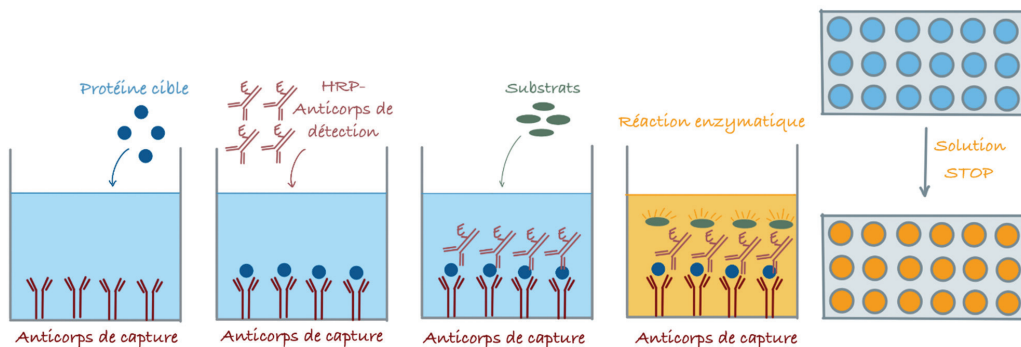


Figure 6. Principe du kit ELISA

ÉTUDE DE CAS

1. Un patient a subi une cholécystectomie de routine et a été surveillé postopératoirement pour une inflammation et une infection à l'aide des taux de protéine C-réactive (CRP).

Évolution clinique:

- Jours 1 à 3 postopératoire: Le patient a d'abord suivi une réponse normale de la CRP post-chirurgicale, avec des niveaux culminant autour de 100 mg/L, ce qui correspond à une inflammation postopératoire typique.
- Jour 4: Le patient a développé de la fièvre et les taux de CRP étaient anormalement élevés (supérieurs à 100 mg/L). Cela a soulevé des inquiétudes quant à une éventuelle infection.
- Jour 5: L'état du patient s'est aggravé, ce qui a entraîné un examen plus approfondi. La plaie chirurgicale a été rouverte, révélant un abcès, qui a ensuite été drainé. Les taux de CRP ont culminé au-dessus de 200 mg/L, ce qui reflète une réponse inflammatoire continue.
- Jours 6-7: Après l'intervention, le patient a montré une amélioration clinique. Les taux de CRP ont diminué, ce qui suggère une résolution de l'infection et une récupération efficace.

Commentez ces résultats, en indiquant l'importance de la détermination du CRP.

2. Les antécédents médicaux d'une femme de 70 ans comprenaient une hypertension systolique de longue date, gérée par un médicament antihypertenseur, ainsi qu'une habitude de fumer toute la vie. Elle était mince (IMC = 23 kg/m²) et avait de forts antécédents familiaux de maladie cardiovasculaire précoce. Son profil lipidique se situait dans la plage optimale:

- Cholestérol total: 214 mg/dL (5,54 mmol/L)
- LDL-C: 102 mg/dL (2,64 mmol/L)
- HDL-C: 80 mg/dL (2,07 mmol/L)

Ses taux de protéine C-réactive à haute sensibilité (hsCRP), mesurés deux fois sur une période de deux semaines, étaient élevés à 7,6 mg/L et 7,3 mg/L, respectivement.

Commentez ces résultats, en indiquant également le risque de maladies cardiovasculaires.

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L7. IMPLICATIONS CLINIQUES DE LA PHOSPHATASE ALCALINE (PAL)

OBJECTIFS D'APPRENTISSAGE

Décrivez le rôle physiologique et la distribution tissulaire de la phosphatase alcaline (PAL) et de ses isoenzymes.

Identifier les conditions cliniques associées à des niveaux élevés ou diminués de PAL.

Corrélez des schémas spécifiques d'isoenzymes PAL avec les pathologies osseuses, hépatiques et autres pathologies.

Effectuez et interprétez une détermination d'activité PAL.

POINTS CLÉS

La PAL est une enzyme liée à une membrane cellulaire; La PAL est présente dans l'os (ostéoblastes), le foie (épithélium biliaire), l'intestin, le rein et le placenta.

Une PAL élevée est principalement associée à des maladies osseuses (maladie de Paget, métastases, hyperparathyroïdie) et à une maladie hépatobiliaire (cholestase).

Le fractionnement de l'isoenzyme PAL différencie les sources tissulaires: l'isoenzyme osseuse est labile en chaleur; L'isoenzyme hépatique est stable à la chaleur.

En cholestase, l'élévation de la PAL s'accompagne généralement d'une élévation de la GGT; dans les maladies osseuses, la GGT reste normale, facilitant le diagnostic différentiel.

ASPECTS GÉNÉRAUX

Phosphatase Alcaline (ALP) - Il s'agit d'un nom générique pour un groupe d'enzymes qui catalysent la libération du groupe phosphate à partir d'une série de substrats et ont une activité maximale à un pH alcalin, compris entre 9,0 et 10,5. Le substrat naturel et le rôle *in vivo* de l'ALP sont inconnus. Les personnes atteintes d'un déficit héréditaire en ALP excrètent de grandes quantités de phosphoéthanolamine (phosphocolamine), ce qui suggère qu'il pourrait s'agir du substrat naturel. L'ALP est attachée aux membranes cellulaires, jouant peut-être un rôle dans le transport transmembranaire.

L'ALP est codée par **4 gènes pour 4 isoenzymes**:

- Intestinal
- Placentaire
- Cellule germinale
- Forme non spécifique

L'isoenzyme germinale est présente dans les testicules et le thymus, et l'isoenzyme non spécifique contient des enzymes du foie, des os et des reins. Les isoformes hépatiques et osseuses diffèrent par leur teneur en acide sialique.

Chez l'adulte, environ la moitié de l'activité sérique de l'ALP est d'origine hépatique et l'autre moitié d'origine osseuse. Seule une petite partie est d'origine intestinale.

L'importance primordiale de la mesure de la phosphatase alcaline est de vérifier la possibilité d'une maladie osseuse ou d'une maladie du foie.

ÉLÉVATIONS DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DANS DES CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES

Les niveaux de phosphatase alcaline (ALP) peuvent être augmentés dans plusieurs états normaux, non pathologiques.

L'un des cas les plus fréquents est la fin de la grossesse, période durant laquelle le placenta produit sa propre isoenzyme, entraînant des taux sériques d'ALP pouvant atteindre jusqu'à deux fois la normale.

Les enfants et les adolescents présentent également souvent des ALP élevés en raison de la croissance rapide des os et de l'activité ostéoblastique accrue pendant le développement squelettique.

Les niveaux de phosphatase alcaline peuvent également montrer une élévation physiologique après un repas copieux, en particulier riche en graisses, en raison de l'augmentation de l'isoenzyme intestinale. Il s'agit d'une réponse normale et temporaire, plus marquée chez les individus de groupe sanguin O ou B. Pour cette raison, le jeûne est généralement requis pour obtenir des résultats précis lors d'un dosage sanguin de l'ALP.

Ces élévations physiologiques sont généralement légères à modérées et doivent être distinguées des causes pathologiques afin d'éviter toute interprétation erronée dans un contexte clinique.

ALP - ÉTUDES DU MÉTABOLISME OSSEUX

Les cliniciens qui étudient des patients atteints de maladies osseuses doivent savoir dans quelle mesure les os se décomposent et se forment. Par conséquent, les marqueurs biochimiques de la résorption osseuse et de la formation osseuse sont utiles pour évaluer l'étendue de la maladie, ainsi que pour le suivi du traitement. En tant que tests de première intention pour diagnostiquer les patients atteints de troubles calciques et de maladies osseuses, des investigations de calcium, de phosphatase alcaline, suivies de PTH, de magnésium, d'excrétion de calcium dans l'urine, de 25-hydroxycholécalférol, d'hydroxyproline urinaire et d'ostéocalcine sont nécessaires.

L'os est continuellement remodelé à des endroits discrets du squelette afin de maintenir l'intégrité du tissu (Figure 1). Au cours de ce processus, l'os ancien est résorbé par les ostéoclastes et remplacé par de nouveaux os ostéoïdes sécrétés par les ostéoblastes. Les premiers ostéoclastes sont activés et la phase de résorption dure environ 10 jours. Après la résorption, des cellules non classifiées de type macrophage sont trouvées sur le site de remodelage dans la phase intermédiaire ou d'inversion. Des précurseurs d'ostéoblastes sont ensuite recrutés, qui prolifèrent et se différencient en ostéoblastes matures, avant de sécréter une nouvelle matrice osseuse. Dans la dernière étape, la matrice se minéralise pour générer de nouveaux os et cela complète le processus de remodelage.

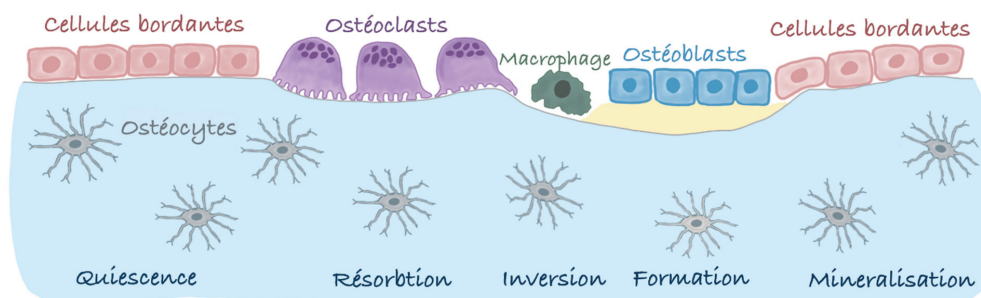


Figure 1. Processus de remodelage osseux

Profils de phosphatase alcaline dans différentes maladies osseuses

L'activité de l'enzyme phosphatase alcaline a traditionnellement été utilisée comme indicateur du renouvellement osseux. Les ostéoblastes qui déposent le cadre du collagène et la matrice minérale de l'os ont une activité élevée de cette enzyme. L'augmentation de l'activité ostéoblastique est indiquée par une activité élevée de la phosphatase alcaline dans l'échantillon de sérum. En effet, les enfants qui ont une croissance osseuse active par rapport aux adultes ont une activité phosphatase alcaline « normale » plus élevée dans le sérum. Cependant, la phosphatase alcaline est également produite par les cellules qui tapissent les canalicules biliaires et l'enzyme est aussi un marqueur de la cholestase. L'isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline peut être mesurée, mais il est nécessaire de disposer d'un marqueur plus spécifique et plus sensible.

1. Maladie de Paget

La maladie de Paget apparaît généralement chez les patients âgés et se caractérise par une augmentation de l'activité ostéoclastique, ce qui entraîne une résorption osseuse accrue. L'augmentation de l'activité ostéoblastique répare l'os résorbé, mais le nouvel os est reformé de manière désorganisée. Le signe clinique est presque toujours une douleur osseuse, qui peut être particulièrement grave. La phosphatase alcaline sérique est élevée et l'excrétion urinaire d'hydroxyproline est élevée. Ceux-ci permettent de suivre l'évolution de la maladie.

2. Ostéomalacie et rachitisme

L'ostéomalacie est le nom donné à la minéralisation osseuse défectueuse chez l'adulte. Le rachitisme se caractérise par des défauts de minéralisation osseuse et cartilagineuse chez l'enfant.

La carence en vitamine D était autrefois la raison la plus fréquente du rachitisme et de l'ostéomalacie. Le statut en vitamine D peut être évalué par la mesure du principal métabolite circulant, le 25-hydroxycholecalciférol, dans un échantillon de sérum. Le métabolisme de la vitamine D est illustré ci-dessous. Dans l'ostéomalacie sévère due à une carence en vitamine D, le calcium sérique diminuera et il y aura une augmentation appropriée de la sécrétion de PTH. L'activité sérique de la phosphatase alcaline sera également élevée.

La carence en vitamine D et/ou en calcium entraîne une diminution du taux de calcium ionisé (Ca^{2+}), provoquant une augmentation de la sécrétion de parathormone (PTH). La PTH augmente la réabsorption tubulaire du calcium afin de ramener la calcémie dans la plage normale. Cependant, en cas de carence sévère en calcium et en vitamine D, la calcémie reste inférieure à la normale. De plus, la PTH provoque une perte de phosphore dans les urines, entraînant une diminution du taux sérique de HPO_4^{2-} .

Un produit calcium-phosphore ($\text{Ca}^{2+} \times \text{HPO}_4^{2-}$) insuffisant conduit à un défaut de minéralisation osseuse, responsable du rachitisme chez l'enfant et de l'ostéomalacie chez l'adulte. Divers troubles héréditaires et acquis peuvent perturber le métabolisme du calcium et du phosphore et également entraîner une minéralisation défectueuse du squelette.

Il existe trois syndromes héréditaires responsables d'une résistance à la vitamine D:

- Le rachitisme vitamino-dépendant de type 1 (DDR-1) est dû à une mutation du gène codant l'enzyme 1-alpha-hydroxylase, empêchant la conversion de la forme inactive de la vitamine D en sa forme active, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.
- Le rachitisme vitamino-dépendant de type 2 (DDR-2) résulte d'une mutation du gène du récepteur de la vitamine D (VDR), rendant l'organisme incapable de reconnaître ou d'utiliser correctement la forme active produite, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.
- Un défaut génétique entraînant une surproduction de la protéine de liaison à l'élément de réponse hormonale perturbe l'interaction entre $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ et son récepteur VDR, provoquant le DDR-3.

Par ailleurs, certains troubles héréditaires et acquis peuvent causer une hypophosphatémie sévère et réduire la production rénale de la forme active de la vitamine D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Les maladies héréditaires telles que le rachitisme hypophosphatémique lié à l'X et le rachitisme hypophosphatémique autosomique dominant résultent d'une production accrue ou d'une dégradation diminuée de phosphatonin(es), telles que FGF23. L'ostéomalacie tumorale est une affection acquise provoquée par une production excessive de FGF23 par certaines tumeurs, entraînant une phosphaturie et une diminution de la synthèse rénale de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

▪ Hypophosphatasie

Cette maladie est une forme de rachitisme ou d'ostéomalacie qui résulte d'une carence en phosphatase alcaline.

3. Métastases osseuses

Dans les métastases osseuses, les taux de calcium sont élevés, les niveaux de phosphate augmentent également et la PTH est généralement diminuée. Les niveaux de phosphatase alcaline sont généralement élevés.

Donc, Affections ostéoblastiques/osseuses associées à une activité accrue de l'ALP:

- Maladie de Paget
- Hyperactivité des glandes parathyroïdes (hyperparathyroïdie primaire, hyperparathyroïdie secondaire due à une maladie rénale, ostéomalacie, malabsorption)
- Rachitisme - Carence en vitamine D
- Guérison des fractures
- Croissance osseuse rapide (comme après une fracture, les cancers des os comme le sarcome ostéogénique, l'ostéomalacie et la maladie de Paget)
- Traitement de l'ostéoporose
- Hyperthyroïdie - renouvellement osseux

ALP - INVESTIGATIONS SUR LES MALADIES DU FOIE

Étant donné que les cellules de la muqueuse qui tapissent le système biliaire du foie sont la source de la phosphatase alcaline, la libre circulation de la bile à travers le foie et vers les voies biliaires et la vésicule biliaire est responsable du maintien du niveau approprié de cette enzyme dans le sang. Lorsque le foie, les canaux biliaires ou la vésicule biliaire ne fonctionnent pas correctement ou sont bloqués, cette enzyme n'est pas excrétée par la bile et la phosphatase alcaline est libérée dans la circulation sanguine. Ainsi, la phosphatase alcaline sérique est une mesure de l'intégrité du système hépatobiliaire et de l'écoulement de la bile dans l'intestin grêle.

Par conséquent, une augmentation des niveaux de phosphatase alcaline peut se produire en cas de congestion ou d'obstruction des voies biliaires, ou du canal menant de la vésicule biliaire au pancréas qui se vide dans le duodénum. N'importe lequel de ces organes (foie, vésicule biliaire, pancréas ou duodénum) peut être impliqué. L'augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline dans les maladies du foie est le résultat d'une synthèse accrue de l'enzyme par les cellules tapissant les canalicules biliaires, généralement en réponse à la cholestase, qui peut être intra- ou extrahépatique.

1. Obstruction biliaire extrahépatique

Les calculs biliaires peuvent bloquer partiellement ou totalement le canal biliaire. Un tel blocage est connu sous le nom d'obstruction extrahépatique. Si l'obstruction est complète, la bilirubine et la phosphatase alcaline sont élevées. Il y a peu ou pas d'urobilinogène dans l'urine. Les selles seront de couleur pâle. Lorsque l'obstruction est éliminée, les selles retrouvent leur couleur et l'urine redevient positive pour l'urobilinogène.

2. Obstruction biliaire intrahépatique

Obstruction biliaire intrahépatique est beaucoup plus difficile à diagnostiquer que l'obstruction extrahépatique. Les canalicules biliaires peuvent se bloquer en raison d'une cirrhose, d'un cancer du foie ou d'une infection. Cela conduit à une concentration accrue de bilirubine conjuguée dans le sérum.

Dans les lésions hépatocellulaires, l'obstruction peut être secondaire à des lésions des hépatocytes par une infection ou des toxines, plutôt qu'à des lésions des voies biliaires. Les causes les plus courantes de jaunisse aiguë observée chez les adultes sont l'hépatite virale et l'empoisonnement au paracétamol. Dans ces cas, non seulement les taux de bilirubine et de phosphatase alcaline sont élevés, mais l'AST et l'ALT sont élevés, ce qui indique des lésions hépatocellulaires.

La cholestase, même de courte durée, entraîne une augmentation de l'activité enzymatique d'ALP jusqu'à au moins deux fois l'extrémité supérieure de l'intervalle de référence. Une activité élevée de la phosphatase alcaline peut également se produire dans la cirrhose.

3. Autres causes associées à une augmentation de l'activité de l'ALP:

- Contraceptifs oraux
- Pancréatite obstructive
- Hépatite/mononucléose/CMV
- Parasites
- Malignité du foie

ALP - AUGMENTATION DE L'ACTIVITÉ DE L'ALP DANS LES AFFECTIONS NON OSSEUSES/NON HÉPATIQUES

Bien que l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) soit le plus souvent élevée dans les troubles osseux et hépatiques, une augmentation de l'ALP sérique peut également résulter de plusieurs affections non hépatiques et non squelettiques. Ces élévations peuvent résulter de la libération d'enzymes par d'autres tissus, tels que l'intestin, le placenta ou les reins, ou de processus physiologiques ou pathologiques systémiques. Il est essentiel de comprendre ces sources alternatives pour éviter les erreurs d'interprétation des résultats de l'ALP et pour identifier correctement la cause sous-jacente de l'élévation.

- Troubles inflammatoires et systémiques:
 - Amylose
 - Sarcoïdose
 - Polyarthrite rhumatoïde
 - Infections systémiques (p. ex. septicémie)
 - Herpès zoster (zona)
 - Formation de tissu de granulation
- Affections gastro-intestinales:
 - Maladie inflammatoire de l'intestin (colite ulcéreuse, maladie de Crohn)
 - Ulcères gastroduodénaux ou intestinaux
- Affections malignes et ischémiques:
 - Certains cancers (lymphome de Hodgkin, tumeurs malignes gynécologiques)
 - Lésions tissulaires aiguës du cœur/des poumons (infarctus - myocarde/pulmonaire)

DIMINUTION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE SÉRIQUE

Bien qu'une grande attention soit accordée aux taux élevés de phosphatase alcaline (ALP), une ALP sérique anormalement basse peut également fournir des informations cliniques importantes. La diminution de l'activité de l'ALP peut refléter des carences nutritionnelles, des troubles génétiques, des anomalies endocriniennes ou certaines affections systémiques. La reconnaissance de ces causes est essentielle pour une bonne interprétation des résultats de laboratoire:

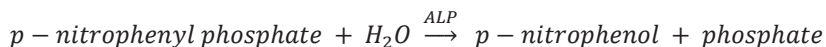
- Carence en zinc / vitamine C (scorbut) / acide folique / vitamine B₆
- Malnutrition avec un faible apport en protéines ou une absorption altérée
- Hypothyroïdisme
- Fonction insuffisante de la glande parathyroïde
- Apport excessif en vitamine D
- Faible teneur en phosphore (hypophosphatasie)
- Maladie cœliaque
- Anémie pernicieuse

TRAVAIL EXPERIMENTAL

Dosage de la phosphatase alcaline sérique (ALP)

Principe

Le phosphate de p-nitrophényle sera hydrolysé par la phosphatase alcaline (du sérum du patient) en p-nitrophénol, un composé de couleur jaune dont l'absorption est mesurée par spectrophotométrie, l'intensité de la couleur étant directement proportionnelle à l'activité de l'enzyme (ALP) dans le sérum.



Réactifs

1. R1 = solution tampon de diéthanolamine 1M, pH = 9,8: dissoudre 100 mg de MgCl₂ et 95,6 ml de diéthanolamine, d'une densité de 1,1 g/ml, dans du H₂O distillé, porter le pH à 9,8 avec une solution de HCl 1M, puis compléter avec du H₂O distillé, dans un ballon jaugé jusqu'à 1 litre.

2. R2 = Substrat p-nitrophénylphosphate (pNPP), 10 mM: dissoudre 64,2 mg de pNPP dans 20 ml de solution tampon de diéthanolamine. pNPP = 371,12g/mol.

Mélangez 5 volumes de R1+1 volume de R2 (**le réactif de travail est déjà préparé = RL = réactif de travail**) !!

3. Sérum ou plasma

4. Autres matériaux: Pipettes automatiques de 20-200 µl et 100-1000 µl. Spectrophotomètre, cuvettes, minuterie.

Procédure

1. Allumez le spectrophotomètre et amenez-le à la longueur d'onde $\lambda=450\text{nm}$.

2. Le spectrophotomètre est calibré par rapport à l'air.

3. **Préparez l'échantillon directement dans la cuvette comme suit:** 1000 µL RL + 20 µL de sérum et homogénéisez avec l'embout de la pipette automatique de 20 µL.

4. Lorsque le sérum est ajouté, la minuterie démarre.

5. Lisez les valeurs d'absorbance à 450 nm à **1** minute et **3** minutes (la valeur de l'absorbance augmentera).

Calcul

Calculez la vitesse moyenne de la réaction en $\Delta A/\text{min}$. L'activité de l'enzyme est calculée avec:

$$a = \Delta A / \text{min} \times 5757 = (A_3 - A_1) / 2 \times 5757 (U / L)$$

où 5757 - est une grandeur qui dépend du coefficient d'absorption molaire de pNPP et du volume de l'échantillon.

Valeurs normales: Enfants: 10 - 400 U / L

Adultes: 60 - 180 U/L

ÉTUDE DE CAS

1. Patient: **MJ**, sexe: **M**, **58 ans**.

Le patient présente les symptômes suivants: fatigue, jaunisse, gêne abdominale, prise de poids abdominale, ballonnements, gonflement, saignement gingival. Le médecin recommande d'effectuer l'analyse biochimique ci-dessous. Comparez ces valeurs avec les valeurs normales et établissez un diagnostic éventuel.

Examen biochimique du sang

Dénomination	Résultat	Plage de référence	Dénomination	Résultat	Plage de référence
Glycémie à jeun	60 mg/dl	75 à 115 mg/dl	Bilirubine directe	1,0 mg/dl	<0,2 mg/dl
HbA1c	6 %	4-6 %	Bilirubine totale	3,9 mg/dl	<1 mg/dl
L'ALAT	40 U/l	F: 10-22 U/l M: 10-29 U / l	Protéines totales	4,1 g/dl	6,2 à 8 g/dl
ASAT	45 U/l	F: 10-21 U/l M: 10-25 U / l	Hémoglobine	14,6 g/dl	F: 12-16 g/dl M: 14-18 g/dl
Urée	40 mg/dl	15 à 45 mg/dl	hsCRP	12 mg/l	<1 mg/l de risque CV faible 1-3 mg/l risque CV moyen >3mg/l de risque CV élevé
Créatinine	1,0 mg/dl	F<0,9 mg/dl M<1,1 mg/dl	cTnI	0,05 ng/ml	0,01 à 0,40 ng/ml
Clairance de la créatinine	100 ml/min	95 à 150 ml/min	Cystatine C	0,99 mg/l	0,49 à 1,13 mg/l
Acide urique	5 mg/dl	F: 2,5-7 mg/dl M: 3-9 mg/dl	Réserve alcaline	23 mEq/l	22 à 27 mEq/l
Amylase	99 U/l	50 à 100 U/l	Na+	144 mEq/l	135 à 145 mEq/l
Cholestérol total	130 mg/dl	140- 200 mg/dl	K+	5,0 mEq/l	3,8 à 5,4 mEq/l
Cholestérol HDL	40 mg/dl	F:45-65 mg/dl M: 35 à 55 mg/dl	TSH	3,1 mU/ml	0,27 à 4,20 µUI/ml
Triacylglycérols	298 mg/dl	F: 40-140 mg/dl M:60-165mg/dl	fT3	2,9 pg/ml	2,2 à 5,5 pg/ml
La LDH	150 U/l	F:135-215 U/l M: 135-225 U / l	fT4	1,8 ng/dl	0,7 à 2,2 ng/dl
CKMB	6 U/l	2-10 U/l	GGT	122 U/l	F: 5-40 U/l M: 8-61 U/l
			Phosphatase alcaline	700 U/l	F: <240 U/l M:<270 U/l

Examen biochimique de l'urine

Dénomination	Résultat	Plage de référence
Densité	1.015	1.015- 1.025
pH	5.5	6.5
Protéine	Négatif	Négatif
Glucose	Négatif	Négatif
Corps cétoniques	Négatif	Négatif
UBG	+(2 mg/dl)	Normal
bilirubine	+	Négatif
Nitrites	Négatif	Négatif
Leucocytes	Négatif	Négatif
Globules rouges	Négatif	Négatif

2. Patient: **JI**, sexe: **F**, **20 ans**.

Le patient présente les symptômes suivants: fièvre, anorexie, fatigue, perte d'appétit, nausées, vomissements, jaunisse, urine foncée. Le médecin recommande d'effectuer l'analyse biochimique ci-dessous. Comparez les valeurs du patients avec les valeurs normales et établissez un diagnostic possible.

Examen biochimique du sang

Dénomination	Résultat	Plage de référence	Dénomination	Résultat	Plage de référence
Glycémie à jeun	75 mg/dl	75 à 115 mg/dl	Bilirubine directe	3,2 mg/dl	<0,2 mg/dl
HbA1c	5 %	4-6 %	Bilirubine totale	9,8 mg/dl	<1 mg/dl
L'ALAT	2150 U/l	F: 10-22 U/l M: 10-29 U / l	Protéines totales	4,0 g/dl	6,2 à 8 g/dl
ASAT	2035 U/l	F: 10-21 U/l M: 10-25 U / l	Hémoglobine	13,6 g/dl	F: 12-16 g/dl M: 14-18 g/dl
Urée	45 mg/dl	15 à 45 mg/dl	hsCRP	100 mg/l	<1 mg/l de risque CV faible 1-3 mg/l risque CV moyen >3 mg/l de risque CV élevé
Créatinine	0,9 mg/dl	F<0,9 mg/dl M<1,1 mg/dl	cTnI	0,05 ng/ml	0,01 à 0,40 ng/ml
Clairance de la créatinine	100 ml/min	95 à 150 ml/min	Cystatine C	1,0 mg/l	0,49 à 1,13 mg/l
Acide urique	5 mg/dl	F: 2,5-7 mg/dl M: 3-9 mg/dl	Réserve alcaline	29 mEq/l	22 à 27 mEq/l
Amylase	100 U/l	50 à 100 U/l	Na+	122 mEq/l	135 à 145 mEq/l
Cholestérol total	150 mg/dl	140- 200 mg/dl	K+	2,5 mEq/l	3,8 à 5,4 mEq/l
Cholestérol HDL	55 mg/dl	F:45-65 mg/dl M: 35 à 55 mg/dl	TSH	3,1 mU/ml	0,27 à 4,20 µUI/ml
Triacylglycérols	75 mg/dl	F: 40-140 mg/dl M:60-165mg/dl	fT3	2,9 pg/ml	2,2 à 5,5 pg/ml
La LDH	632 U/l	F:135-215 U/l M: 135-225 U / l	fT4	1,8 ng/dl	0,7 à 2,2 ng/dl
CKMB	6 U/l	2-10 U/l	GGT	150 U/l	F: 5-40 U/l M: 8-61 U/l
			Phosphatase alcaline	500 U/l	F: <240 U/l; M:<270 U/l

Examen biochimique de l'urine

Dénomination	Résultat	Plage de référence
Densité	1.030	1.015- 1.025
pH	6.0	6.5
Protéine	Négatif	Négatif
Glucose	Négatif	Négatif
Corps cétoniques	Négatif	Négatif
UBG	+++ (6 mg/dl)	normal
bilirubine	++	Négatif
Nitrites	Négatif	Négatif
Leucocytes	Négatif	Négatif
Globules rouges	Négatif	Négatif

3. Un homme de 65 ans s'est présenté à la clinique orthopédique avec une douleur intense à la jambe droite et au bassin. L'imagerie radiographique a révélé des signes caractéristiques affectant son fémur, son bassin et son crâne. Les tests de laboratoire ont montré des paramètres sériques normaux, à l'exception d'un taux de phosphatase alcaline nettement élevé de 2700 U/L (plage de référence: 30-130 U/L). Le patient a par la suite commencé un traitement aux bisphosphonates pour gérer la maladie. Commentez ces résultats.

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L8. IMPLICATIONS CLINIQUES DE LA α -AMYLASE SÉRIQUE, LIPASE SÉRIQUE ET DE LA GAMMA-GLUTAMYLTRANSFÉRIASE

OBJECTIFS D'APPRENTISSAGE

Expliquez l'origine, la fonction et la signification clinique de l'alpha-amylase sérique dans les troubles du pancréas et des glandes salivaires.

Expliquez l'origine, la fonction et la signification clinique de la lipase sérique dans les troubles pancréatiques.

Décrivez le rôle diagnostique de la gamma-glutamyltransférase (GGT) dans les maladies du foie et des voies biliaires.

Interpréter l'élévation combinée de la lipase, l'amylase et la GGT dans le diagnostic différentiel des affections abdominales et hépatobiliaires.

Effectuez et interprétez la détermination de l'activité sérique de l'amylase et du GGT.

POINTS CLÉS

L'alpha-amylase coupe les liaisons α -1,4-glycosidiques dans l'amidon; Il est produit par le pancréas exocrine et les glandes salivaires.

L'amylase sérique $> 3\times$ la limite supérieure de la normale est un critère clé pour la pancréatite aiguë; La mesure de la lipase améliore la spécificité.

La lipase sérique est un indicateur très sensible et spécifique de la pancréatite aiguë.

La GGT est une enzyme membranaire très sensible aux maladies hépatobiliaires et à la consommation excessive d'alcool; Elle est élevée dans la cholestase, la maladie du foie alcoolique et l'hépatotoxicité induite par les médicaments.

L'élévation combinée du GGT et de l'ALP suggère une cholestase; L'élévation isolée du GGT indique un excès d'alcool ou une induction enzymatique par des drogues.

AMYLASE

L'amylase (AMS) est une enzyme digestive principalement sécrétée par le pancréas et les glandes salivaires, étant présente dans d'autres tissus à des niveaux minimes. L'amylase a été décrite pour la première fois au début des années 1800 et est l'une des enzymes pionnières à faire l'objet d'études scientifiques.

Le rôle principal des amylases est de cliver les liaisons glycosidiques au sein des molécules d'amidon, transformant les glucides complexes en sucres simples. Les enzymes amylases sont classées en trois grandes catégories (alpha-, bêta- et gamma-amylases), chacune ciblant des segments spécifiques de la molécule de glucide.

L'alpha-amylase est présente chez les humains, les animaux, les plantes et les microbes, tandis que la bêta-amylase se trouve principalement dans les microbes et les plantes. La gamma-amylase, en revanche, peut être localisée à la fois chez les animaux et les plantes.

En 1908, une étude de Wohlgemuth a identifié la présence d'amylase dans l'urine, ouvrant la voie à son application comme test de laboratoire de diagnostic. L'amylase est un test diagnostique standard fréquemment prescrit, souvent associé à la lipase, en particulier lorsqu'une pancréatite aiguë est suspectée chez les patients.

Source de tissu

Le pancréas et les glandes salivaires sont les principales sources tissulaires de AMS sérique. Des concentrations moindres se trouvent dans les muscles squelettiques, l'intestin grêle et les trompes de Fallope. L'AMS est une petite enzyme, d'un poids moléculaire de 50 000 à 55 000 Da. En raison de sa petite taille, il est facilement filtré par le glomérule rénal et apparaît également dans l'urine. La digestion des amidons commence dans la bouche avec l'action hydrolytique de l'AMS salivaire. L'activité salivaire du AMS, cependant, est de courte durée car, lors de la déglutition, il est inactivé par l'acidité du contenu gastrique. L'AMS pancréatique effectue ensuite l'action digestive majeure des amidons une fois que les polysaccharides atteignent l'intestin.

Signification diagnostique

L'importance diagnostique des mesures AMS sériques et urinaires réside dans le diagnostic de la pancréatite aiguë. Les troubles des tissus autres que le pancréas peuvent également produire des élévations des niveaux de AMS. Par conséquent, un taux élevé d'AMS est un résultat non spécifique. Cependant, le degré d'élévation du AMS est utile, dans une certaine mesure, dans le diagnostic différentiel de la pancréatite aiguë. De plus, d'autres tests de laboratoire (p. ex., mesures des taux urinaires de AMS, études de clairance AMS, études d'isoenzymes AMS et mesures des taux sériques de lipase), lorsqu'ils sont utilisés conjointement avec la mesure sérique de l'AMS, augmentent la spécificité des mesures de l'AMS dans le diagnostic de la pancréatite aiguë.

Dans le cas d'une pancréatite aiguë, les taux sériques de AMS commencent à augmenter 2 à 12 heures après le début d'une crise, atteignent un pic à 24 heures et reviennent à des niveaux normaux dans les 3 à 5 jours. Les valeurs varient généralement de 250 à 1 000 unités Somogyi par dL (2,55 LSN). Les valeurs peuvent atteindre des niveaux beaucoup plus élevés.

D'autres troubles provoquant une élévation du taux sérique d'AMS comprennent les lésions des glandes salivaires, telles que les oreillons et la parotidite, et d'autres maladies intra-abdominales, telles que l'ulcère gastroduodénal perforé, l'obstruction intestinale, la cholécystite, la rupture de la grossesse extra-utérine, l'infarctus mésentérique et l'appendicite aiguë. De plus, des élévations ont été signalées dans l'insuffisance rénale et l'acidocétose diabétique.

Les taux sériques d'AMS dans les affections intra-abdominales autres que la pancréatite aiguë sont généralement inférieurs à 500 unités Somogyi par dL.

Beaucoup d'intérêt s'est récemment concentré sur l'utilisation diagnostique possible des mesures isoenzymatiques AMS. L'AMS sérique est un mélange d'un certain nombre d'isoenzymes qui peuvent être séparées sur la base de différences de propriétés physiques, notamment par électrophorèse, bien que la chromatographie et la focalisation isoélectrique aient également été appliquées. Dans le sérum humain normal, deux bandes principales et jusqu'à quatre bandes mineures peuvent être observées. Les bandes sont désignées comme isoamylase de type P et isoamylase de type S.

-La P isoamylase est dérivée du tissu pancréatique;

-La S isoamylase est dérivée du tissu des glandes salivaires, ainsi que de la trompe de Fallope et du poumon.

Les isoenzymes d'origine salivaire (S1, S2, S3) migrent le plus rapidement, tandis que celles d'origine pancréatique (P1, P2, P3), sont plus lentes (Figure 1). Les fractions les plus couramment observées sont P2, S1 et S2.

Dans la pancréatite aiguë, il y a généralement une augmentation de l'activité de type P, P3 étant l'isoenzyme la plus prédominante. Cependant, la P3 a également été détectée dans des cas d'insuffisance rénale et, par conséquent, n'est pas entièrement spécifique de la pancréatite aiguë. L'isoamylase de type S représente environ les deux tiers de l'activité du AMS dans le sérum normal, tandis que le type P prédomine dans l'urine normale.

LIPASE

Les lipases appartiennent à la superfamille des enzymes alpha/bêta-hydrolase. Ils fonctionnent en utilisant une hydrolyse semblable à la chymotrypsine, qui utilise une base histidine, un nucléophile sérine et de l'acide aspartique. La lipase est une enzyme qui décompose les triglycérides en acides gras libres et en glycérol en catalysant l'hydrolyse des liaisons esters dans les triglycérides. Les lipases sont présentes dans les sécrétions pancréatiques et participent à la digestion et au métabolisme des graisses. Ils jouent un rôle essentiel dans le transport des lipides et remplissent des fonctions individuelles dans plusieurs tissus, notamment la lipase hépatique dans le foie, les lipases hormonosensibles dans les adipocytes, la lipoprotéine lipase dans les cellules endothéliales et la lipase pancréatique dans l'intestin grêle.

Des taux élevés de lipase sérique peuvent être révélateurs d'une pancréatite. Dans le cas de la pancréatite aiguë, le diagnostic repose sur les résultats de laboratoire avec deux des trois critères. Les critères utilisés pour le diagnostic comprennent une douleur épigastrique aiguë irradiant vers le dos, une augmentation de l'amylase sérique ou une augmentation des taux de lipase, qui sont jusqu'à trois fois la limite supérieure des taux normaux de lipase sérique. Ce dernier est un marqueur diagnostique plus spécifique que l'amylase ou l'imagerie par TDM ou IRM. 20 % des patients atteints de pancréatite aiguë peuvent avoir une amylase sérique normale. La lipase sérique est utilisée comme biomarqueur principal dans le diagnostic de la pancréatite aiguë. De plus, la lipase sérique est normale dans les problèmes de glandes salivaires et est plus rarement élevée dans les affections abdominales telles que l'ulcère perforé.

Valeurs normales: 10-60 U/L

γ -GLUTAMYLTRANSFÉRASE

La γ -glutamyltransférase/ γ -glutamyltrypsinogénase (GGT/ γ -GT) est une enzyme impliquée dans le transfert du résidu γ -glutamyl des γ -glutamylpeptides vers les acides aminés, le H₂O et d'autres petits peptides. Dans la plupart des systèmes biologiques, le glutathion sert de donneur de γ -glutamyle.

La fonction physiologique spécifique de la GGT n'a pas été clairement établie, mais il est suggéré que la GGT est impliquée dans la synthèse des peptides et des protéines, la régulation des niveaux tissulaires de glutathion et le transport des acides aminés à travers les membranes cellulaires.

L'activité de la GGT se trouve principalement dans les reins, le cerveau, la prostate, le pancréas et le foie.

Les applications cliniques du test, cependant, se limitent principalement à **l'évaluation des troubles du foie et du système biliaire.**

En raison des effets de l'alcool sur l'activité de la GGT, des niveaux élevés de GGT peuvent indiquer **l'alcoolisme**, en particulier l'alcoolisme chronique. En général, les élévations enzymatiques chez les alcooliques ou les gros buveurs varient de deux à trois fois au-dessus de la normale, bien que des niveaux plus élevés aient été observés. Les dosages GGT sont utiles pour surveiller les effets de l'abstinence d'alcool et sont utilisés comme tels par les centres de traitement de l'alcoolisme. Les taux reviennent généralement à la normale dans les 2 à 3 semaines suivant l'arrêt, mais peuvent augmenter à nouveau si la consommation d'alcool reprend. En raison de la sensibilité à l'induction enzymatique, toute interprétation des niveaux de GGT doit être faite en tenant compte des effets consécutifs des drogues et de l'alcool.

Les niveaux de GGT pourraient également être élevés dans d'autres conditions, telles que la pancréatite aiguë, le diabète sucré et l'infarctus du myocarde.

L'activité de la GGT est utile pour différencier la source d'un taux élevé de phosphatase alcaline (ALP), car les niveaux de GGT sont normaux dans les troubles squelettiques et pendant la grossesse. Il est particulièrement utile pour évaluer l'atteinte hépatobiliaire chez les adolescents, car l'activité de l'ALP sera invariablement élevée à la suite de la croissance osseuse.

Recommandations pour déterminer la GGT

La GGT est l'indicateur le plus sensible pour la détection de l'alcoolisme, étant l'enzyme dont l'augmentation dépasse les autres enzymes hépatiques actuellement dosées. Chez les alcooliques, le taux sérique de GGT peut atteindre des valeurs 50 fois supérieures à la valeur normale, le degré d'augmentation dépendant à la fois de la quantité d'alcool consommée et surtout de la persistance prolongée de la consommation. Il joue également un rôle dans la surveillance de l'abstinence d'alcool.

Dans les maladies hépto-biliaires, la GGT est corrélée aux taux de phosphatase alcaline (ALP). Les augmentations ne sont pas spécifiques et peuvent également être associées à des maladies pancréatiques, cardiaques, rénales, au diabète. Le test GGT est également utile pour diagnostiquer une maladie du foie en présence d'une maladie osseuse, d'une grossesse ou d'une enfance lorsque les niveaux d'ALP augmentent alors que la GGT reste à des niveaux normaux.

Importance clinique

Dans l'interprétation des valeurs élevées de GGT, en plus du niveau d'activité de la GGT, le taux sérique de GGT par rapport aux aminotransférases, c'est-à-dire le rapport GGT/AST ou GGT/ALT (chez les patients atteints de jaunisse, ce rapport mesure l'intensité de la cholestase par rapport aux lésions de la membrane cellulaire) et le taux de GGT par rapport aux autres enzymes de la cholestase, sont pris en compte.

1. L'alcoolisme

2. Problèmes de foie:

- Dans l'**hépatite virale aiguë**, l'augmentation de la GGT est inférieure à celle des autres enzymes (GGT/AST = 0,1 - 0,2); GGT est la dernière qui revient à la normale;
- Dans l'**hépatite chronique active, virale ou auto-immune**, les augmentations peuvent dépasser 7 fois la limite supérieure de la normale (GGT/AST = 1 - 3);
- Dans l'**hépatite alcoolique aiguë** GGT/AST > 6;
- Dans la **cirrhose du foie**, les augmentations de GGT/AST sont en moyenne de 2 fois dans la cirrhose et d'environ 10 fois dans la cirrhose alcoolique;
- Dans la **cirrhose biliaire primitive**, la GGT augmente parallèlement à l'ALP, avant l'apparition de la jaunisse, les augmentations peuvent atteindre jusqu'à 13 fois la limite supérieure de la normale;
- Dans la **stéatose hépatique d'étiologie alcoolique**, la GGT est environ 2 fois supérieure à la limite supérieure de la normale et persiste augmentée pendant une longue période après l'arrêt de la consommation, et dans la stéatose hépatique non alcoolique, la légère augmentation des aminotransférases, plus fréquemment que la GGT;

3. Syndrome de cholestase:

- La GGT et l'ALP augmentent à peu près dans la même proportion dans la cholestase mécanique et la viralité, par opposition à la cholestase induite par un médicament dans laquelle la GGT augmente beaucoup plus que l'ALP; En moyenne, les augmentations dépassent 6 fois la limite supérieure de la normale;
- Dans la **cholestase extrahépatique**, la GGT augmente > 10 fois, GGT/AST = 3 - 6 en cas d'obstruction récente et GGT/AST > 6 en cas d'obstruction à long terme;
- Dans la **cholestase intrahépatique** (hépatite aiguë, grossesse, médicaments, maladie de Hodgkin, nutrition parentérale, atresie des voies biliaires, etc.) Les augmentations de la GGT sont plus faibles: pendant la grossesse, la GGT n'augmente pas autant que l'ALP, et les enfants atteints de cholestase récurrente bénigne ont des taux normaux de GGT malgré la présence d'un ictère;

4. Tumeurs:

- Dans les **tumeurs hépatiques primitives, les métastases hépatiques**, l'évolution de la GGT est parallèle à celle de l'ALP et les augmentations peuvent dépasser 14 fois la limite supérieure de la normale; La GGT est augmentée chez 90 % des patients présentant des métastases, et les déterminations dynamiques permettent de surveiller la réponse à la chimiothérapie;
- En cas de **congestion hépatique chronique**: la GGT peut être multipliée par 5, et en cas de congestion hépatique aiguë (thrombose de la veine porte), l'augmentation est faible par rapport à celle des transaminases et de la LDH.

5. Médicament: médicament anticonvulsivant

6. *Augmentations isolées de la GGT*: stéatose hépatique, obstruction biliaire subclinique, insuffisance cardiaque congestive.

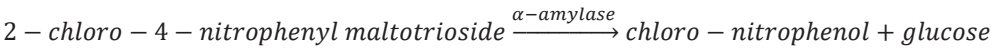
7. *Autres causes de croissance de la GGT*: pancréatite aiguë (5 fois plus élevée que la normale); infarctus aigu du myocarde; insuffisance rénale aiguë, syndrome néphrotique, rejet du greffon rénal (augmentations modérées); diabète sucré (légère augmentation); tumeurs cérébrales et hémorragies (excroissances légères); néoplasmes (excroissances modérées: mélanome malin, cancer du sein, cancer du poulmon).

TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX

1. Dosage de la α -amylase

Principe

Test colorimétrique avec du 2-chloro-4-nitrophényl maltotrioside (CNP-G3) comme substrat direct. La couleur est libérée directement à la suite d'un clivage α au niveau de l'aglycone:



Réactifs

1. Tampon MES: (pH = 6), 100 mmol/L
2. NaCl, 350 mmol/L
3. Acétate de Ca, 6 mmol/L
4. Thiocyanate de potassium, 900 mmol/L
5. CNP-G3

Procédure

Pipeter dans le tube à essai comme suit:

Réactifs, μl	Échantillon
Réactif de travail	1000
Sérum	10

Incuber 1 minute à 37 °C, puis lire l'absorbance et démarrer le chronomètre en même temps. Répétez les lectures après exactement 1, 2 et 3 minutes. Déterminez la variation de l'absorbance par minute ($\Delta A/\text{min}$) et utilisez-la pour le calcul.

Calcul:

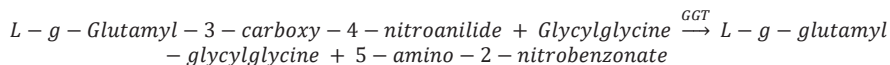
$$\text{Activité d'AMS} = \Delta A/\text{min} \times 15408(\text{U/L})$$

Valeurs normales: jusqu'à 120 U/L

2. γ -Détermination de la glutamyltransférase

La gamma-glutamyltransférase (GGT) est utilisée dans le diagnostic et le suivi des maladies hépatobiliaires. Les niveaux de GGT sont également élevés dans d'autres conditions, telles que la pancréatite aiguë, le diabète sucré et l'infarctus du myocarde. La gamma-glutamyltransférase est également un test de dépistage sensible de l'alcoolisme occulte.

Principe:



La gamma-glutamyltransférase transfère le groupe g-glutamyle de la L-g-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide à la glycylglycine. La quantité de 5-amino-2-nitrobenzonate libérée est proportionnelle à l'activité de la GGT et peut être déterminée par photométrie.

Réactifs:

R1: Tampon de trisglycylglycine pH 8,25, 100 mmol/l

R2: L-g-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide, 2,9 mmol/l

Procédure

Pipeter dans le tube à essai comme suit:

Réactifs, μ l	Échantillon
Réactif de travail	1000
Sérum	100

Mélangez, lisez l'absorbance initiale à 405 nm à nouveau dans l'escalier et démarrez le chronomètre en même temps. Répétez les lectures après exactement 1, 2 et 3 minutes. Déterminez leur variation d'absorbance par minute ($\Delta A/\text{min}$) et utilisez-la pour le calcul.

Calcul

$$\text{Activité de GGT} = \Delta A/\text{min} \times 1158 \text{ (U/L)}$$

Valeurs normales:

Hommes: 8-61 U/L

Femmes: 5-40 U/L

ÉTUDE DE CAS

1. Patient: **DE**, sexe: **M**, **45 ans**.

Le patient présente les symptômes suivants: consommation volontaire d'alcool, maux de tête, anxiété. Le médecin recommande d'effectuer l'analyse suivante ci-dessous. Etablir un diagnostic éventuel.

Examen biochimique du sang

Dénomination	Résultat	Plage de référence	Dénomination	Résultat	Plage de référence
Glycémie à jeun	100 mg/dl	75 à 115 mg/dl	Bilirubine directe	0,2 mg/dl	<0,2 mg/dl
HbA1c	5 %	4-6 %	Bilirubine totale	0,9 mg/dl	<1 mg/dl
L'ALAT	29 U/l	F: 10-22 U/l M: 10-29 U / l	Protéines totales	6,9 g/dl	6,2 à 8 g/dl
ASAT	23 U/l	F: 10-21 U/l M: 10-25 U / l	Hémoglobine	16,3 g/100 ml	F: 12-16 g/dl M: 14-18 g/dl
Urée	39 mg/dl	15 à 45 mg/dl	hsCRP	8 mg/l	<1 mg/l de risque CV faible 1-3 mg/l risque CV moyen >3mg/l de risque CV élevé
Créatinine	1,0 mg/dl	F<0,9 mg/dl M<1,1 mg/dl	cTnI	0,09 ng/ml	0,01 à 0,40 ng/ml
Clairance de la créatinine	112 ml/min	95 à 150 ml/min	Cystatine C	0,86 mg/l	0,49 à 1,13 mg/l
Acide urique	5 mg/dl	F: 2,5-7 mg/dl M: 3-9 mg/dl	Réserve alcaline	25 mEq/l	22 à 27 mEq/l
Amylase	77 U/l	50 à 100 U/l	Na+	140 mEq/l	135 à 145 mEq/l
Cholestérol total	220 mg/dl	140- 200 mg/dl	K+	4,9 mEq/l	3,8 à 5,4 mEq/l
Cholestérol HDL	35 mg/dl	F:45-65 mg/dl M: 35 à 55 mg/dl	TSH	3,1 mU/ml	0,27 à 4,20 µUI/ml
Triacylglycérols	280 mg/dl	F: 40-140 mg/dl M:60-165mg/dl	fT3	2,9 pg/ml	2,2 à 5,5 pg/ml
La LDH	155 U/l	F:135-215 U/l M: 135-225 U / l	fT4	1,8 ng/dl	0,7 à 2,2 ng/dl
CKMB	9 U/l	2-10 U/l	GGT	90 U/l	F: 5-40 U/l M: 8-61 U/l
			Phosphatase alcaline	220 U/l	F: <240 U/l M:<270 U/l

Examen biochimique de l'urine

Dénomination	Résultat	Plage de référence
Densité	1.015	1.015- 1.025
pH	6.5	6.5
Protéine	Négatif	Négatif
Glucose	Négatif	Négatif
Corps cétoniques	Négatif	Négatif
UBG	normal	normal
bilirubine	Négatif	Négatif
Nitrites	Négatif	Négatif
Leucocytes	Négatif	Négatif
Globules rouges	Négatif	Négatif

2. Patient: **KL**, sexe: **M**, 63 ans.

Le patient présente les symptômes suivants: malaise, fièvre, nausées, vomissements, douleurs aiguës dans la partie supérieure de l'abdomen, crampes abdominales. Le médecin recommande d'effectuer l'analyse biochimique suivante

Examen biochimique du sang

Dénomination	Résultat	Plage de référence	Dénomination	Résultat	Plage de référence
Glycémie à jeun	196 mg/dl	75 à 115 mg/dl	Bilirubine directe	0,2 mg/dl	<0,2 mg/dl
HbA1c	5 %	4-6 %	Bilirubine totale	1,3 mg/dl	<1 mg/dl
L'ALAT	250 U/l	F: 10-22 U/l M: 10-29 U / l	Protéines totales	6,6 g/dl	6,2 à 8 g/dl
ASAT	170 U/l	F: 10-21 U/l M: 10-25 U / l	Hémoglobine	14,6 g/dl	F: 12-16 g/dl M: 14-18 g/dl
Urée	45 mg/dl	15 à 45 mg/dl	hsCRP	128 mg/l	<1 mg/l de risque CV faible 1-3 mg/l risque CV moyen >3mg/l de risque CV élevé
Créatinine	0,9 mg/dl	F<0,9 mg/dl M<1,1 mg/dl	cTnI	0,09 ng/ml	0,01 à 0,40 ng/ml
Clairance de la créatinine	123 ml/min	95 à 150 ml/min	Cystatine C	0,96 mg/l	0,49 à 1,13 mg/l
Acide urique	5 mg/dl	F: 2,5-7 mg/dl M: 3-9 mg/dl	Réserve alcaline	23 mEq/l	22 à 27 mEq/l
Amylase	1298 U/l	50 à 100 U/l	Na+	144 mEq/l	135 à 145 mEq/l
Cholestérol total	150 mg/dl	140- 200 mg/dl	K+	4,5 mEq/l	3,8 à 5,4 mEq/l
Cholestérol HDL	41 mg/dl	F:45-65 mg/dl M: 35 à 55 mg/dl	TSH	3,1 mU/ml	0,27 à 4,20 µUI/ml
Triacylglycérols	200 mg/dl	F: 40-140 mg/dl M:60-165mg/dl	ft3	2,9 pg/ml	2,2 à 5,5 pg/ml
La LDH	476 U/l	F:135-215 U/l M: 135-225 U / l	ft4	1,8 ng/dl	0,7 à 2,2 ng/dl
CKMB	9 U/l	2-10 U/l	GGT	134 U/l	F: 5-40 U/l M: 8-61 U/l
			Phosphatase alcaline	470 U/l	F: <240 U/l M:<270 U/l

Examen biochimique de l'urine

Dénomination	Résultat	Plage de référence
Densité	1.025	1.015- 1.025
pH	5.5	6.5
Protéine	Négatif	Négatif
Glucose	+/- (100mg/dl)	Négatif
Corps cétoniques	Négatif	Négatif
UBG	Normal	Normal
Bilirubine	Négatif	Négatif
Nitrites	Négatif	Négatif
Leucocytes	Négatif	Négatif
Globules rouges	Négatif	Négatif

Comparer ces valeurs avec les valeurs normales et établir un diagnostic éventuel.

3. Un homme de 58 ans (IMC = 30) ayant des antécédents d'hypertension et de consommation modérée d'alcool s'est présenté au service des urgences avec une douleur épigastrique sévère d'apparition soudaine irradiant dans le dos, accompagnée de nausées et de vomissements. La douleur a commencé environ quatre heures après un repas copieux et s'est progressivement aggravée. Le patient semblait en détresse à cause de la douleur. L'examen abdominal a révélé une sensibilité dans la région épigastrique sans sensibilité de rebond ni protection. Les bruits intestinaux étaient présents, mais ils ont diminué. Sa tension artérielle: 145/90 mmHg; fréquence cardiaque: 110 bpm; fréquence respiratoire: 22 respirations par minute; température: 37,8°C. L'échographie abdominale a révélé des calculs biliaires dans la vésicule biliaire sans signe de cholécystite. Les analyses de laboratoire ont été les suivantes:

- Amylase sérique: 980 U/L (intervalle de référence: 25 à 125 U/L)
- Lipase sérique: 760 U/L (intervalle de référence: 18-180 U/L)
- Alanine aminotransférase (ALT): 190 U/L (intervalle de référence: 7 à 40 U/L)
- Aspartate aminotransférase (AST): 220 U/L (intervalle de référence: 10 à 40 U/L)
- Phosphatase alcaline (ALP): 150 U/L (intervalle de référence: 30 à 120 U/L)
- Bilirubine totale: 2,5 mg/dL (intervalle de référence: 0,1 à 1,2 mg/dL)
- Protéine C-réactive (CRP): 115 mg/L (intervalle de référence: <5 mg/L)

Commentez ces résultats et établissez un éventuel diagnostic.

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L9. INVESTIGATIONS BIOCHIMIQUES POUR LE SYSTÈME ENDOCRINIEN. ANALYSE DES HORMONES THYROÏDIENNES

OBJECTIFS D'APPRENTISSAGE

Décrivez la synthèse, le transport, la régulation et les actions physiologiques des hormones thyroïdiennes (T3 et T4).

Expliquez l'axe hypothalamo-hypophyse-thyroïde et ses mécanismes de rétroaction négative.

Sélectionnez et interprétez les tests de fonction thyroïdienne appropriés: TSH, T4 libre, T3 libre et anticorps thyroïdiens.

Distinguer hypothyroïdie et hyperthyroïdie en fonction des caractéristiques cliniques et des résultats biochimiques.

POINTS CLÉS

La glande thyroïde sécrète principalement du T4 (thyroxine); la déiodination périphérique convertit le T4 en T3 biologiquement actif (tri-iodothyronine) dans les tissus cibles.

L'axe hypothalamo-hypophyse-thyroïde: TRH (hypothalamus) → TSH (hypophyse) → T3/T4 (thyroïde); un T3/T4 élevé supprime la TSH via une relance négative.

La TSH est le test de première intention le plus sensible pour les dysfonctionnements thyroïdiens: une TSH supprimée indique une hyperthyroïdie; un TSH élevé indique une hypothyroïdie.

Hypothyroïdie primaire (le plus souvent thyroïdite de Hashimoto): TSH élevé, fT4 bas, anticorps anti-TPO. Maladie de Basedow (hyperthyroïdie): TSH bas, FT4 élevé, anticorps anti-récepteurs du TSH stimulants.

ASPECTS GÉNÉRAUX

Une hormone est une substance chimique libérée par une ou plusieurs cellules qui affecte les cellules d'autres parties de l'organisme. Seule une petite quantité d'hormone est nécessaire pour modifier le métabolisme cellulaire. Il s'agit essentiellement d'un messenger chimique qui transporte un signal d'une cellule à une autre. Tous les organismes multicellulaires produisent des hormones; Les hormones végétales sont aussi appelées phytohormones. Les hormones chez les animaux sont souvent transportées dans le sang. Les cellules réagissent à une hormone lorsqu'elles expriment un récepteur spécifique pour cette hormone. L'hormone se lie à la protéine réceptrice, ce qui entraîne l'activation d'un mécanisme de transduction du signal qui conduit finalement à des réponses spécifiques au type cellulaire.

Les molécules d'hormones endocrines sont sécrétées (libérées) directement dans la circulation sanguine, tandis que les hormones exocrines sont sécrétées directement dans un canal, et à partir de ce conduit, elles s'écoulent soit dans la circulation sanguine, soit elles circulent de cellule en cellule par diffusion dans un processus connu sous le nom de signalisation paracrine.

L'investigation d'une glande endocrine recherche la présence de symptômes cliniques d'hyper ou d'hypofonction de la glande endocrine référée.

Pour l'évaluation de la fonction endocrinienne, les mesures suivantes sont nécessaires, seules ou en association.

- **Concentration plasmatique de l'hormone**
- **Excrétion urinaire de l'hormone ou de ses produits cataboliques**
- **Dynamique de sécrétion de l'hormone**
- **La réserve hormonale et la régulation hormonale par des tests dynamiques**
- **Le niveau des récepteurs hormonaux**
- **Les effets sélectifs de l'hormone sur les tissus cibles**

Mesures de la concentration plasmatique des hormones

Les taux d'hormones dans le plasma sont très faibles, entre 1 nmol/l et 1 µmol/l pour les hormones stéroïdes et entre 1 pmol/l et 1 nmol/l pour les hormones protéiques et peptidiques. Malgré des concentrations aussi faibles, il est possible de mesurer les concentrations hormonales dans la « jungle » des protéines plasmatiques en utilisant des dosages performants, spécifiques et sensibles.

L'investigation biochimique du système endocrinien prend en compte les éléments suivants:

- Pour les hormones dont le taux est constant pendant une journée (thyroxine, etc.), un échantillon suffit pour déterminer l'échantillon hormonal;
- Pour l'hormone à sécrétion pulsée, comme la testostérone, LH, il est nécessaire de mesurer la concentration hormonale dans plusieurs échantillons prélevés à différents moments de la journée ou dans un mélange à partir de plusieurs échantillons prélevés avec un intervalle de 20 à 30 minutes.
- Pour les hormones ayant un rythme circadien (par exemple le cortisol), l'interprétation des valeurs obtenues se fait en fonction de l'heure de prélèvement de l'échantillon. Pour les femmes, les taux plasmatiques de gonadotrophines, d'œstrogènes, progestérone seraient interprétés en fonction des phases ovariennes; il est nécessaire de savoir les jours précis du cycle menstruel.
- Pour l'hormone qui a besoin d'un transporteur plasmatique (hormones thyroïdiennes et stéroïdes), l'hormone libre est responsable de l'action hormonale et il existe des dosages qui permettent de mesurer l'hormone totale ou l'hormone libre.

- Pour les personnes en bonne santé, les plages normales de concentrations hormonales dans le plasma sont grandes et les niveaux des paires d'hormones et de leurs régulateurs en amont (par exemple, la TSH et les hormones thyroïdiennes, la LH et la testostérone, etc.) refléteraient mieux l'état clinique. Par exemple, si la testostérone est à sa limite inférieure de concentration plasmatique et que la LH est élevée, le patient souffre d'une insuffisance testiculaire, mais si la LH est normale, la fonction testiculaire serait considérée comme normale.

La mesure des niveaux urinaires des hormones et de leurs métabolites

Pour les hormones à sécrétion fluctuante (cortisol par exemple), les dosages urinaires pourraient présenter certains avantages par rapport aux dosages à partir d'isolats et d'échantillons de sang. Les déterminations sont prises à partir d'urine prélevée dans les 24 heures.

Inconvénients pour les mesures urinaires des hormones:

- La sécrétion urinaire dépend de la fonction rénale, de sorte que l'interprétation se ferait en fonction du taux de créatinine.
- Il y a des hormones qui sont éliminées par la bile
- Les niveaux d'urine pourraient être modifiés par le médicament
- Il existe des hormones d'origines tissulaires différentes mais avec des métabolites urinaires communs. Par exemple, les 17-cétostéroïdes urinaires remontent de la glande surrénale ou des gonades, de sorte qu'ils ont une valeur réduite pour l'interprétation de la fonction testiculaire.

La rapidité de la sécrétion et de la production d'hormones

Une hormone radioactive est injectée et la dilution de l'hormone due à la production d'hormone endogène dans une période précise est mesurée.

Les récepteurs et les hormones, les anticorps, les dosages

La mesure des récepteurs hormonaux est nécessaire pour diagnostiquer les maladies associées à la résistance hormonale. Les techniques de séquençage de l'ADN sont utilisées pour la détection de mutations dans les structures de la protéine. La présence dans certains cas d'anticorps hormonaux (maladie de Basedow par exemple) peut être réalisée à l'aide d'immunodosages.

Les effets des hormones sur les tissus cibles seraient les méthodes idéales.

Méthodes modernes pour la mesure de l'hormone

Les quatre principales techniques utilisées pour les mesures endocriniennes sont les suivantes:

- Tests immunologiques à base d'anticorps, qui se divisent en deux sous-catégories:
 - Essais immunologiques compétitifs
 - Tests immunométriques (sandwich)
- Tests chromatographiques
- Spectrométrie de masse
- Dosages à base d'acides nucléiques

HORMONES THYROÏDIENNES

La glande thyroïde produit deux hormones clés: les hormones thyroïdiennes et la calcitonine (sécritée par les cellules folliculaires). Les hormones thyroïdiennes sont essentielles à la régulation du métabolisme, du développement neurologique et de diverses fonctions corporelles. La calcitonine, sécrétée par les cellules C parafolliculaires, joue un rôle dans l'homéostasie calcique.

Située dans la partie inférieure antérieure du cou, la glande thyroïde a la forme d'un papillon, composée de deux lobes de chaque côté de la trachée reliés par l'isthme, une fine bande de tissu thyroïdien traversant la trachée. Derrière la glande thyroïde se trouvent les glandes parathyroïdes, qui contrôlent les taux de calcium sérique, et les nerfs laryngés récurrents, qui innervent les cordes vocales. Ces relations anatomiques sont particulièrement importantes lors d'une chirurgie de la thyroïde, car des dommages à ces structures peuvent entraîner une hypocalcémie ou une voix rauque en permanence.

La thyroxine (T4) et la tri-iodothyronine (T3) sont connues sous le nom d'«hormones thyroïdiennes ». La synthèse commence dans la glande thyroïde par iodation et couplage de deux molécules de tyrosine qui sont attachées à une protéine complexe appelée thyroglobuline. T4 a quatre atomes d'iode et T3 en a trois.

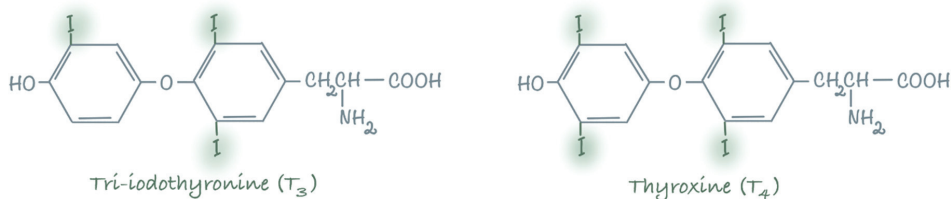


Figure 1. Structures chimiques des hormones thyroïdiennes

Synthèse des hormones thyroïdiennes

Les cellules folliculaires de la glande thyroïde transportent activement les ions iodure du sang vers le cytosol. Ces cellules synthétisent également la thyroglobuline, qui est une grosse glycoprotéine. La thyroglobuline est produite dans le réticulum endoplasmique rugueux, modifié par la fixation de molécules de glucides dans l'appareil de Golgi, puis emballée dans des vésicules sécrétoires. Ces vésicules transportent la thyroglobuline vers la lumière du follicule par exocytose. La thyroglobuline contient plusieurs résidus de tyrosine, qui subiront plus tard l'iodation. Dans l'alimentation, l'iode est ingéré sous forme d'iodure, qui doit d'abord être oxydé en iode avant de pouvoir se lier aux résidus de tyrosine de la thyroglobuline. Cette oxydation se produit lorsque l'iodure traverse la membrane cellulaire dans la lumière du follicule. Une fois converti en iode, il se lie aux résidus de tyrosine dans la thyroglobuline.

- La fixation d'une molécule d'iode à la tyrosine produit de la monoiodothyrosine (MIT).
- La fixation de deux molécules d'iode entraîne la di-iodothyrosine (DIT).
- Le couplage de deux molécules de DIT forme la thyroxine (T₄).
- Le couplage du MIT et du DIT produit de la tri-iodothyronine (T₃).

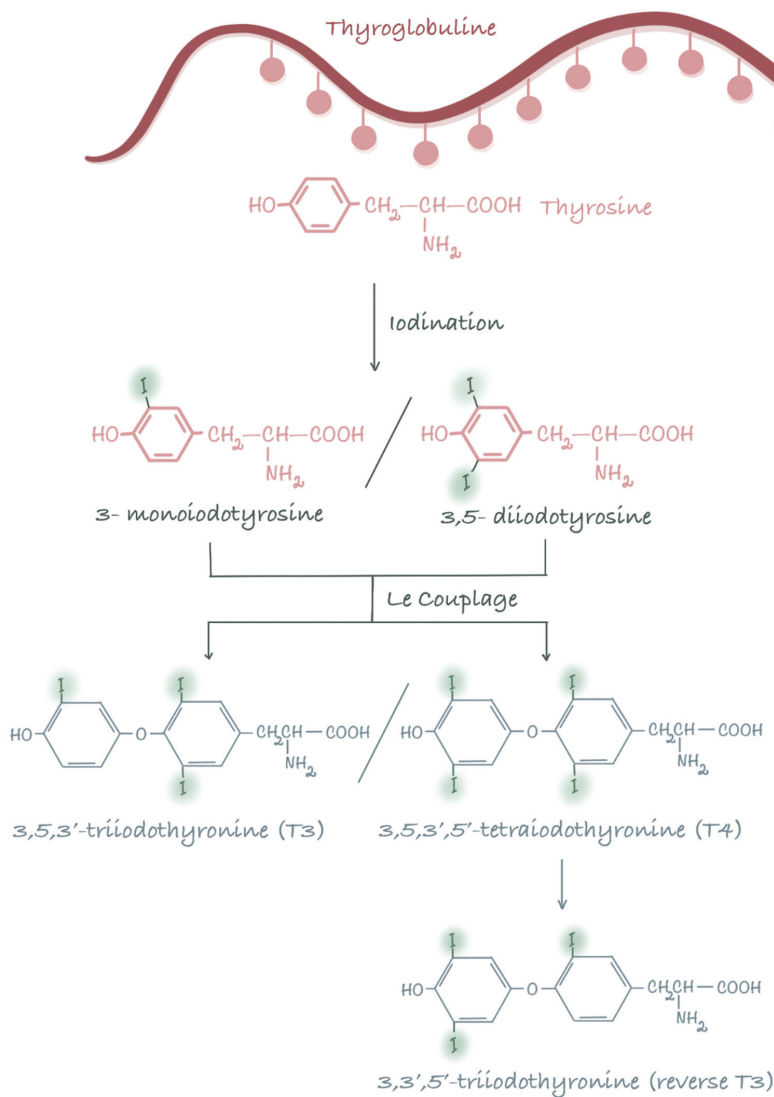


Figure 2. Synthèse des hormones thyroïdiennes

La thyroglobuline iodée, qui contient maintenant T3 et T4, est stockée dans le colloïde à l'intérieur du follicule. Les processus d'oxydation de l'iodure, d'iodation de la tyrosine et de couplage sont tous catalysés par l'enzyme peroxydase thyroïdienne (TPO). Sous l'influence de la thyroïdostimuline (TSH), qui est sécrétée par l'hypophyse antérieure, les gouttelettes colloïdales pénètrent à nouveau dans les cellules folliculaires via la pinocytose et fusionnent avec les lysosomes. Les enzymes lysosomales décomposent ensuite la thyroglobuline par digestion protéolytique, libérant T3 et T4 pour la sécrétion dans la circulation sanguine.

La glande thyroïde sécrète principalement de la thyroxine (T4), avec une concentration plasmatique d'environ 100 nmol/L. Dans les tissus périphériques, en particulier le foie et les reins, la T4 subit une déiodination, convertissant environ les deux tiers en tri-iodothyronine (T3), qui circule à une concentration beaucoup plus faible d'environ 2 nmol/L.

La plupart des cellules peuvent absorber la T4 et la convertir en T3, plus biologiquement active, grâce à l'action des enzymes déiodinases D1 ou D2. C'est la T3 qui se lie aux récepteurs des hormones thyroïdiennes, initiant les effets physiologiques des hormones thyroïdiennes.

Alternativement, la T4 peut être métabolisée par la déiodinase D3, produisant de la T3 inverse (rT3), qui est biologiquement inactive. En ajustant l'équilibre entre la production de T3 et de rT3, les tissus peuvent affiner leur activité locale des hormones thyroïdiennes. Cependant, les mécanismes précis qui sous-tendent cette régulation ne sont pas encore entièrement compris.

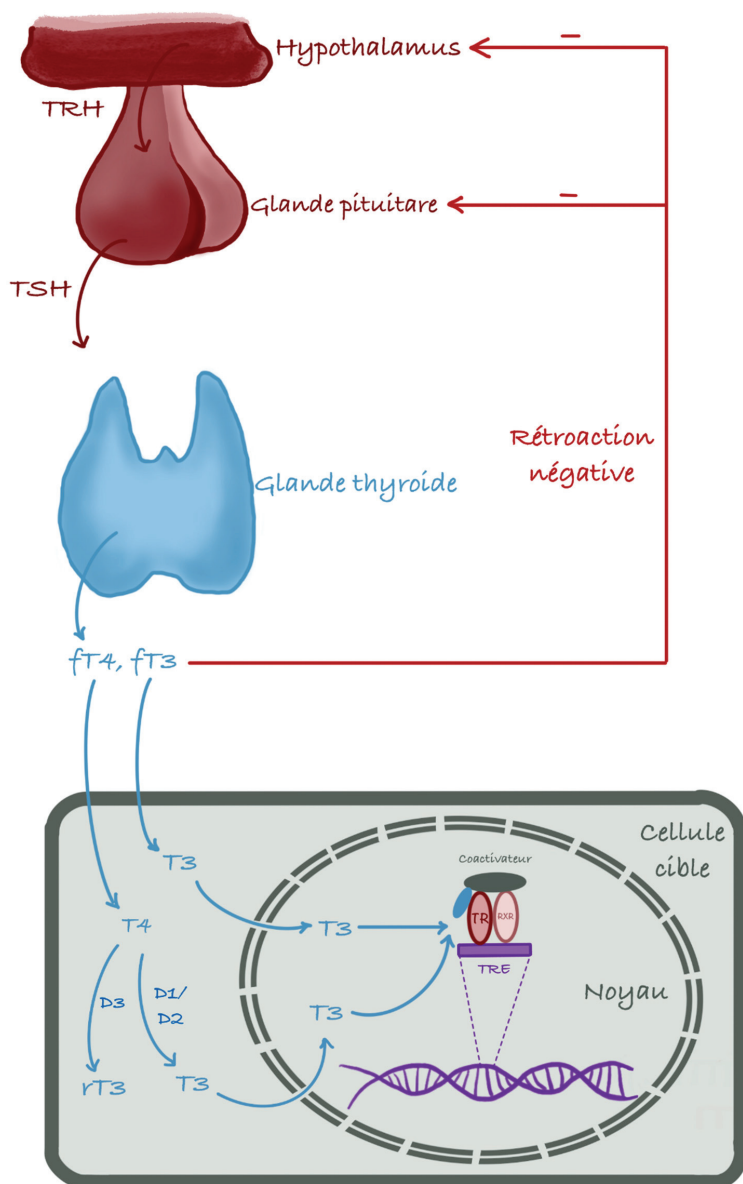


Figure 3. Régulation de la synthèse des hormones thyroïdiennes

Régulation de la synthèse des hormones thyroïdiennes

L'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien est constitué de l'hormone de libération de la thyrotropine (TRH), de l'hormone stimulant la thyroïde (TSH) et des hormones thyroïdiennes (T3 et T4).

- La TRH, un tripeptide sécrété par l'hypothalamus, stimule l'hypophyse antérieure à produire de la TSH, une hormone glycoprotéique.
- La TSH agit alors sur la glande thyroïde, favorisant la synthèse et la libération d'hormones thyroïdiennes.
- La production de TSH est régulée par une rétroaction négative (« negative feedback »), en fonction des niveaux d'hormones thyroïdiennes non liées en circulation.

Points clés pour l'investigation des maladies thyroïdiennes:

- Une production excessive d'hormones thyroïdiennes entraîne une suppression des niveaux de TSH.
- Une sécrétion insuffisante d'hormones thyroïdiennes entraîne des taux élevés de TSH, car l'hypophyse tente de stimuler la thyroïde.

La compréhension de ces mécanismes fondamentaux est cruciale pour l'interprétation correcte des résultats des tests de fonction thyroïdienne dans le diagnostic des troubles thyroïdiens primaires.

Liaison dans le plasma

Dans le plasma, plus de 99,95 % de la thyroxine (T4) est transportée liée aux protéines. Les principales protéines de transport sont:

- Globuline liant la thyroxine (TBG) - transporte ~70 % de T4
- Albumine - transporte ~25 % de T4
- Transthyréline (préalbumine) - se lie à ~5 % de la T4

De même, plus de 99,5 % de la triiodothyronine (T3) est liée aux mêmes protéines. Cependant, ce sont les T4 et T3 non liées (« libres ») qui exercent des effets biologiques, y compris la régulation de la rétroaction sur l'hypophyse et l'hypothalamus. Les changements dans les concentrations de protéines de liaison peuvent affecter les résultats des tests d'hormones thyroïdiennes, ce qui rend l'interprétation plus difficile. Par exemple, pendant la grossesse, les fluctuations des taux de TBG peuvent modifier les mesures hormonales totales, malgré des niveaux normaux de T4 et T3 libres.

Action des hormones thyroïdiennes

La T3 se lie à son récepteur nucléaire sur les gènes sensibles aux hormones thyroïdiennes, initiant la production d'ARN messager, qui conduit ensuite à la synthèse des protéines qui régulent le métabolisme et le développement. Les effets des hormones thyroïdiennes comprennent la promotion de la croissance des tissus, le soutien à la maturation du cerveau, l'augmentation de la production de chaleur et de la consommation d'oxygène, et l'amélioration de l'expression des récepteurs β -adrénergiques. Cliniquement, les personnes ayant des niveaux excessifs d'hormones thyroïdiennes (thyrotoxicose) présentent des symptômes d'activité métabolique accrue, tels que la tachycardie et les tremblements, tandis que les personnes atteintes d'hypothyroïdie présentent une activité métabolique réduite, entraînant des symptômes tels que l'œdème et la constipation. Dans l'hypothyroïdie, le métabolisme des lipides est altéré, ce qui entraîne souvent une élévation du taux de cholestérol sérique. Cela se produit en raison de la réduction de la dégradation du cholestérol, causée par la

régulation négative des récepteurs LDL dans le foie, entraînant une diminution de l'excrétion de stérols par l'intestin. En ce qui concerne les effets sur la maturation des tissus, l'impact le plus marquant est observé dans l'hypothyroïdie congénitale. S'il n'est pas traité dans les 3 premiers mois de la vie, il peut entraîner des lésions cérébrales irréversibles. Les enfants hypothyroïdiens peuvent présenter un retard de développement squelettique, une petite taille et une puberté tardive.

TESTS DE LA FONCTION THYROÏDIENNE

Traditionnellement, les mesures biochimiques dans le diagnostic des maladies thyroïdiennes sont connues sous le nom de tests de la fonction thyroïdienne. La TSH et une estimation du statut T4 (T4 totale ou T4 libre) sont les tests de première intention.

1. TSH (hormone stimulant la thyroïde)

Les progrès technologiques ont considérablement amélioré la mesure de la TSH, aidant au diagnostic et à la surveillance des troubles thyroïdiens. Les premiers tests de TSH ont eu du mal à détecter de faibles concentrations d'hormones. Les dosages modernes et très sensibles de la TSH peuvent désormais mesurer des niveaux beaucoup plus bas, ce qui indique plus clairement si la sécrétion de TSH est réellement réduite.

En raison de sa relation log-linéaire avec la TRH, la TSH est très sensible aux déséquilibres thyroïdiens, ce qui en fait le principal test utilisé dans de nombreux laboratoires pour évaluer la fonction thyroïdienne. Cependant, il y a une exception clé: dans l'hypopituitarisme, la mesure de la TSH n'est pas fiable pour diagnostiquer une maladie thyroïdienne primaire ou surveiller un traitement de remplacement. Par exemple, après une hypophysectomie, la TSH devient indétectable et les niveaux de T4 doivent être évalués à la place pour déterminer l'adéquation du traitement.

2. T4 totale ou T4 libre

Lorsque le remplacement de la thyroxine ou un traitement antithyroïdien (par exemple, le carbimazole) est initié ou ajusté, les taux de TSH peuvent prendre plusieurs semaines à se normaliser. Pendant cette période, il est essentiel de surveiller les taux de T4 pour évaluer la fonction thyroïdienne, en particulier pendant le traitement antithyroïdien, car les patients peuvent rapidement développer une hypothyroïdie sévère s'ils ne sont pas surveillés.

3. T3 total ou T3 libre

Dans certains cas, l'évaluation des niveaux de T3 en même temps que de la T4 est bénéfique. Dans l'hyperthyroïdie, les niveaux de T3 augmentent souvent plus significativement que ceux de T4, ce qui rend la mesure de la T3 utile pour détecter la thyrotoxicose à un stade précoce. Certains patients peuvent présenter une toxicose T3, où seule la T3 est élevée, tandis que la T4 reste dans la plage normale.

4. Anticorps thyroïdiens

La présence d'auto-anticorps contre les antigènes du tissu thyroïdien peut aider à diagnostiquer et à surveiller les troubles thyroïdiens auto-immuns.

Les anticorps anti-péroxydase thyroïdienne (anti-TPO) sont particulièrement utiles pour identifier l'hypothyroïdie, comme la thyroïdite de Hashimoto.

La stimulation des anticorps des récepteurs thyroïdiens aide à diagnostiquer la thyrotoxicose, comme la maladie de Basedow.

TROUBLES DE LA THYROÏDE

D'un point de vue clinique, les troubles de la fonction thyroïdienne peuvent être classés en deux grandes catégories: les états d'hyperfonction où les hormones thyroïdiennes sont produites en excès, appelés hyperthyroïdie, et les états d'hypofonction où il y a une carence en hormones thyroïdiennes, appelés hypothyroïdie.

HYPOTHYROÏDISME

L'hypothyroïdie se développe généralement lentement et la biochimie clinique a un rôle important à jouer dans le diagnostic.

Les **caractéristiques cliniques** de l'hypothyroïdie comprennent:

- Léthargie et fatigue
- Lenteur de la parole et de la fonction mentale
- Intolérance au froid
- Prise de poids
- Sécheresse de la peau et des cheveux
- Voix rauque
- Relaxation lente des muscles et des réflexes tendineux
- De nombreux autres signes associés, notamment l'anémie, la démence, la constipation, la bradycardie, la raideur musculaire, le syndrome du canal carpien, l'hypofertilité et la galactorrhée, l'œdème périorbitaire et facial.

Causes

Plus de 90 % des cas d'hypothyroïdie apparaissent en raison de:

- Destruction auto-immune de la glande thyroïde (maladie de Hashimoto)
- Iode radioactif ou traitement chirurgical de l'hyperthyroïdie.

Causes moins fréquentes:

- Hypothyroïdie transitoire résultant de médicaments comme le carbonate de lithium.
- Carence en TSH, qui peut survenir dans le cadre d'un panhypopituitarisme.
- Malformations congénitales, telles que des défauts dans la biosynthèse de T4 et T3, ou la résistance des organes cibles des tissus cibles à leurs effets.
- Carence sévère en iode.

Diagnostic

L'hypothyroïdie résulte d'une carence en hormones thyroïdiennes. L'hypothyroïdie primaire, causée par la défaillance de la glande thyroïde elle-même, est l'un des troubles endocriniens les plus fréquemment rencontrés. Un taux élevé de TSH est généralement diagnostique. L'hypothyroïdie secondaire, due à une sécrétion insuffisante de TSH par l'hypophyse, est beaucoup moins fréquente. Bien que le déficit isolé en TSH soit rare, un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien peut survenir en raison de diverses maladies ou lésions hypophysaires. Si les signes cliniques suggèrent une atteinte hypophysaire plus large que l'hypothyroïdie, une évaluation plus approfondie de la fonction hypophysaire, y compris un test TRH, peut être nécessaire.

HYPERTHYROÏDIE

La thyrotoxicose se produit lorsque les tissus sont exposés à des niveaux excessifs d'hormones thyroïdiennes. Le terme « hyperthyroïdie » fait spécifiquement référence à une glande thyroïde hyperactive, mais la thyrotoxicose peut également résulter d'un apport excessif de T4 ou, dans de rares cas, d'une stimulation hypophysaire accrue de la thyroïde.

Les **caractéristiques cliniques** de l'hyperthyroïdie comprennent:

- Perte de poids malgré un appétit normal
- Transpiration et intolérance à la chaleur
- Irritabilité accrue
- Fatigue
- Palpitations - tachycardie sinusale ou fibrillation auriculaire
- Agitation et tremblements
- Faiblesse musculaire généralisée; myopathie proximale
- Angine de poitrine et insuffisance cardiaque
- Diarrhée
- Oligo ménorrhée et hypofertilité
- Goitre
- Rétraction et décalage des paupières

Causes

L'hyperthyroïdie peut résulter de:

- Maladie de Basedow (goitre toxique diffus)
- Goitre multinodulaire toxique
- Adénome toxique solitaire
- Thyroïdite
- Iode administré de manière exogène et médicaments contenant de l'iode, par exemple l'amiodarone
- Ingestion excessive de T4 et T3.

La maladie de Basedow est la cause la plus fréquente d'hyperthyroïdie et est une maladie auto-immune dans laquelle les anticorps ciblant le récepteur TSH sur les cellules thyroïdiennes imitent les effets de l'hormone hypophysaire. En conséquence, les mécanismes de régulation habituels de la synthèse et de la sécrétion de T4 sont perturbés. Les niveaux élevés d'hormones thyroïdiennes dans le sang suppriment complètement la sécrétion de TSH hypophysaire.

Bien que la rétraction des paupières dans la maladie de Basedow soit principalement due à des niveaux élevés d'hormones thyroïdiennes, tous les symptômes oculaires ne découlent pas de ce mécanisme. Au lieu de cela, les muscles thyroïdiens et orbitaires peuvent partager un antigène commun, déclenchant une réponse immunitaire à partir d'auto-anticorps circulants. Ce processus inflammatoire peut entraîner une exophtalmie sévère, qui peut même se développer chez les patients ayant une fonction thyroïdienne normale (individus euthyroïdiens).

Diagnostic

Le diagnostic d'hyperthyroïdie primaire est confirmé par la détection d'une suppression de la concentration de TSH associée à des taux élevés d'hormones thyroïdiennes. En particulier, lorsque des tests modernes très sensibles montrent une TSH indétectable chez un patient symptomatique, cela indique fortement une hyperthyroïdie primaire. Cependant, la confirmation biochimique d'une hyperthyroïdie suspectée peut parfois être difficile. Les taux totaux de T4 dans le sérum ne reflètent pas toujours avec précision l'état métabolique en raison des variations des protéines de liaison aux hormones thyroïdiennes. Par exemple, pendant la grossesse, des niveaux élevés d'œstrogènes stimulent le foie à produire plus de globuline liant la thyroïde (TBG), ce qui entraîne une T4 totale élevée malgré des niveaux normaux de T4 libre. De même, le déficit congénital en TBG peut entraîner des résultats trompeurs lors du dépistage des hormones thyroïdiennes, même en l'absence de maladie thyroïdienne. Bien que rare, le déficit en TBG est moins fréquent que l'augmentation des taux de TBG.

Les dosages de T4 libre sont maintenant couramment utilisés comme tests primaires pour le dysfonctionnement thyroïdien. Parce que la sécrétion de TSH est très sensible aux changements de T4 libre, de nombreux laboratoires s'appuient uniquement sur les mesures de TSH pour le dépistage des maladies thyroïdiennes. Le test T4 libre est particulièrement utile dans les cas où les protéines de liaison sont altérées, comme pendant la grossesse, les femmes prenant des contraceptifs oraux et les patientes atteintes du syndrome néphrotique. Chez certaines personnes présentant des signes cliniques d'hyperthyroïdie, les taux de T4 totale peuvent se situer dans la plage de référence, mais des tests plus approfondis révèlent une concentration élevée de T3 - cette condition est connue sous le nom de « toxicose T3 ». Dans ces cas, la TSH reste indétectable.

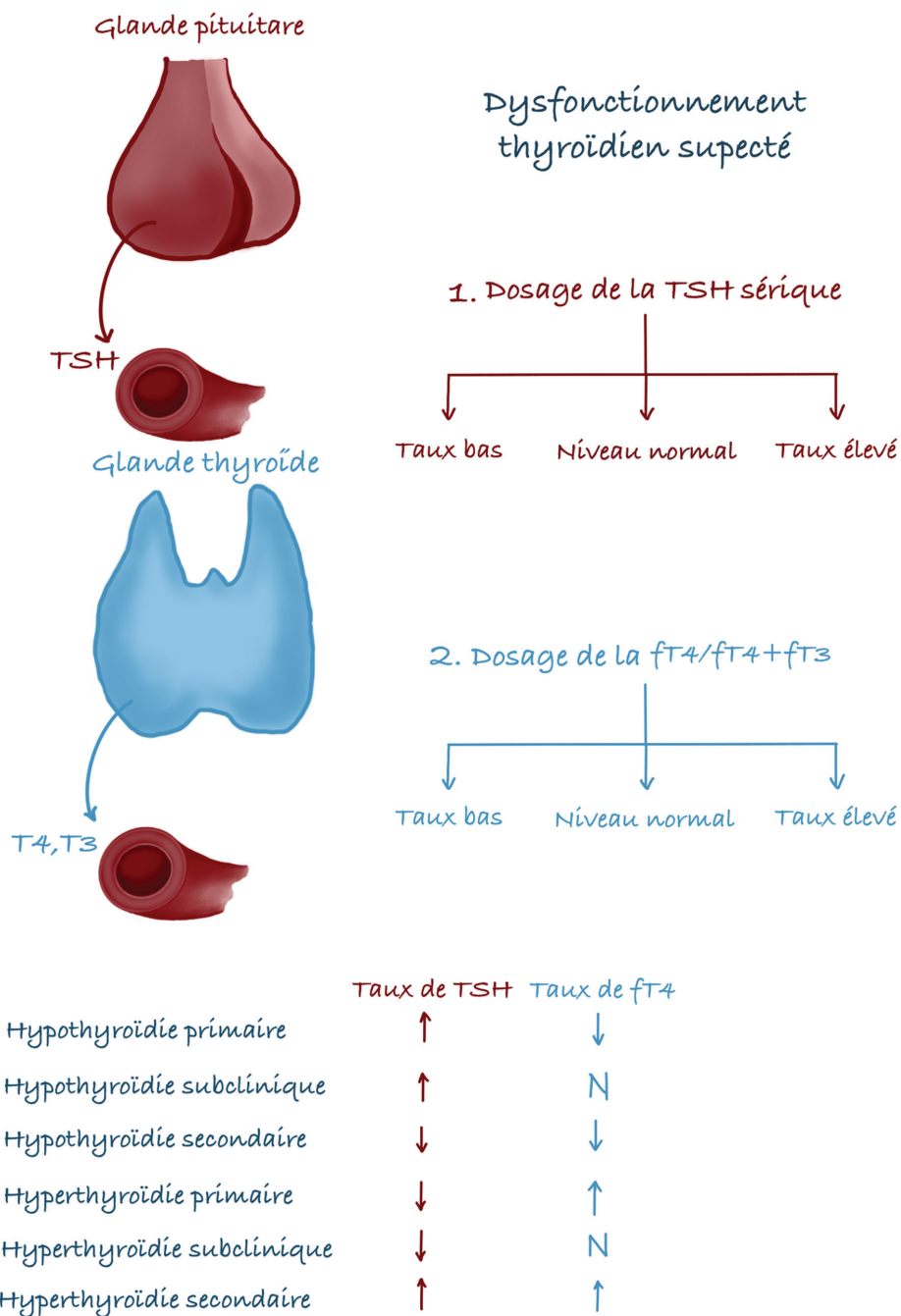


Figure 4. Diagnostic d'hypothyroïdie et d'hyperthyroïdie

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

Détermination quantitative de la concentration de thyroïdostimuline (TSH) dans le sérum humain (ELISA, TSH)

Les tests de laboratoire initiaux pour tout patient suspecté d'être atteint d'une maladie thyroïdienne doivent inclure un test immunométrique de TSH. Si le médecin est raisonnablement convaincu de la présence d'un trouble fonctionnel de la thyroïde, un FT4 doit être inclus comme test initial pour confirmer la présence et évaluer le degré d'anomalie déduit du résultat de la TSH. Il y a rarement une raison de mesurer la T3 totale lors de l'évaluation initiale, à moins que le patient ne reçoive de la liothyronine ou de la liotrix. Le test est utile dans le diagnostic des troubles thyroïdiens ou hypophysaires.

Introduction

La détermination des taux sériques ou plasmatiques de thyroïdostimuline (TSH ou thyrotropine) est reconnue comme une méthode sensible dans le diagnostic de l'hypothyroïdie primaire et secondaire. La TSH est sécrétée par le lobe antérieur de l'hypophyse et induit la production et la libération de thyroxine (T4) et de triiodothyronine (T3) par la glande thyroïde. Il s'agit d'une glycoprotéine d'un poids moléculaire d'environ 28 000 daltons, composée de deux sous-unités chimiquement différentes, alpha et bêta. Bien que la concentration de TSH dans le sang soit extrêmement faible, elle est essentielle au maintien d'une fonction thyroïdienne normale. La libération de TSH est régulée par une hormone de libération de TSH (TRH) produite par l'hypothalamus. Les niveaux de TSH et de TRH sont inversement proportionnels au taux d'hormones thyroïdiennes. Lorsqu'il y a un taux élevé d'hormones thyroïdiennes dans le sang, moins de TRH est libérée par l'hypothalamus, donc moins de TSH est sécrétée par l'hypophyse. L'action inverse se produira lorsqu'il y aura une diminution de l'hormone thyroïdienne dans le sang. Ce processus est connu sous le nom de mécanisme de rétroaction négative et est responsable du maintien des niveaux sanguins appropriés de ces hormones. La TSH et les glycoprotéines hypophysaires: l'hormone lutéinisante (LH), l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et la gonadotrophine chorionique humaine (hCG), ont des chaînes alpha identiques. Les chaînes bêta sont distinctes mais contiennent des régions avec des séquences d'acides aminés identiques. Ces régions d'homologie peuvent provoquer une réactivité croisée considérable avec certains antisérums polyclonaux de TSH. L'utilisation d'un anticorps monoclonal dans le **test ELISA TSH** élimine cette interférence, qui pourrait entraîner des valeurs faussement élevées de TSH chez les femmes ménopausées ou enceintes, une population dont l'évaluation de l'état thyroïdien est cliniquement significative.

Principe

Le test **ELISA TSH** est basé sur le principe d'un dosage immuno-enzymatique en phase solide. Le système de dosage utilise un anticorps monoclonal unique dirigé contre un déterminant antigénique distinct sur la molécule de TSH intacte. L'anticorps monoclonal anti-TSH de souris est utilisé pour l'immobilisation en phase solide (puits de microtitration), et l'anticorps anti-TSH de chèvre est dans la solution conjuguée anticorps-enzyme (raifort peroxydase - HRP). L'échantillon de test est laissé réagir simultanément avec les deux anticorps, ce qui fait que les molécules de TSH sont prises en sandwich entre la phase solide et les anticorps liés aux enzymes. Après une incubation de 60 minutes ou d'une nuit à température ambiante, la phase solide est lavée à l'eau pour éliminer les anticorps marqués non liés. Une solution de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) est ajoutée et incubée pendant 20 minutes, ce qui entraîne le développement d'une couleur bleue. Le développement de la couleur est stoppé par l'ajout de 1N HCl, et la couleur jaune résultante est mesurée spectrophotométriquement à 450 nm. La concentration de TSH est directement proportionnelle à l'intensité de la couleur de l'échantillon de test.

Réactifs

1. Puits recouverts d'anticorps (1 plaque, 96 puits). Puits de microtitration recouverts d'un anti-TSH monoclonal de souris.
2. Réactif conjugué enzymatique (1 bouteille, 13 ml). Contient de l'anti-TSH de chèvre conjugué à la peroxydase de raifort.
3. Ensemble d'étalons de référence (1 ml/flacon). Contient 0, 0,5, 2,0, 5,0, 10,0 et 25,0 $\mu\text{UI/mL}$ de TSH dans du sérum équin avec des conservateurs. Lyophilisé.
4. Réactif TMB (1 bouteille, 11 ml). Contient de la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) stabilisée dans une solution tampon.
5. Solution d'arrêt (1N HCl) (1 bouteille, 11 mL). Contient de l'acide chlorhydrique dilué.

Matériel requis mais non fourni

1. Eau distillée ou désionisée
2. Pipettes de précision: 50 μl , 100 μl , 200 μl et 1 ml
3. Pointes de pipette jetables
4. Lecteur de puits de microtitration capable de lire l'absorbance à 450 nm.
5. Agitateur de puits de microtitration de mouvement orbital
6. Papier absorbant
7. Papier millimétré (semi-log, etc.)

Instrumentation

Un lecteur de puits de microtitration avec une bande passante de 10 nm ou moins et une plage de densité optique de 0 à 2 OD ou plus à une longueur d'onde de 450 nm est acceptable pour la mesure de l'absorbance.

Prélèvement et préparation des échantillons

1. Le sérum doit être préparé à partir d'un échantillon de sang total obtenu par des techniques médicales acceptables. Ce kit est destiné à être utilisé avec des échantillons de sérum sans additifs uniquement. Évitez les échantillons grossièrement hémolytiques, lipémiques ou troubles.
2. Les échantillons doivent être bouchés et peuvent être conservés jusqu'à 48 heures à une température de 2 à 8 °C avant d'être dosés. Les échantillons conservés plus longtemps ne doivent être congelés qu'une seule fois à -20 °C avant l'essai. Les échantillons décongelés doivent être inversés plusieurs fois avant d'être testés.

Préparation des réactifs

1. Tous les réactifs doivent atteindre la température ambiante (18-25°C) avant utilisation.
2. Tous les réactifs doivent être mélangés par inversion douce ou par tourbillonnage avant utilisation. Ne pas induire de mousse.

3. Reconstituer chaque étalon lyophilisé avec 1,0 mL de dH₂O. Laissez reposer le matériau reconstitué pendant au moins 20 minutes. Les étalons reconstitués doivent être conservés scellés à une température de 2 à 8 °C et être stables à une température de 2 à 8 °C pendant au moins 30 jours.

4. Les échantillons dont la concentration de TSH est supérieure à 25 µUI/mL doivent être dilués à 1:10 avec du sérum sans TSH (calibrateur zéro).

Notes de procédure

1. Pipetage manuel: Il est recommandé de ne pas utiliser plus de 32 puits pour chaque cycle d'analyse. Le pipetage de tous les étalons, échantillons et contrôles doit être terminé en 3 minutes.

2. Pipetage automatisé: Une plaque complète de 96 puits peut être utilisée dans chaque cycle de test. Cependant, il est recommandé que le pipetage de tous les étalons, échantillons et contrôles soit terminé dans les 3 minutes.

3. Tous les étalons, échantillons et contrôles doivent être exécutés en double simultanément afin que toutes les conditions d'essai soient les mêmes.

4. Il est recommandé de lire les puits dans les 15 minutes suivant l'ajout de la solution d'arrêt.

Procédure d'analyse

1. Fixez le nombre souhaité de puits revêtus dans le support.

2. Distribuez 100 µl d'étalons, d'échantillons et de contrôles dans les puits appropriés.

3. Distribuez 100 µl de réactif de conjugué enzymatique dans chaque puits.

4. Bien mélanger pendant 30 secondes. Il est très important d'avoir un mélange complet.

5. Incuber à température ambiante (18-25°C) pendant 60 minutes (1 heure).

6. Retirez le mélange d'incubation en jetant le contenu de la plaque dans un récipient à déchets.

7. Rincez et effleurez les puits de microtitration 5 fois avec de l'eau distillée ou dionisée. (Veuillez ne pas utiliser l'eau du robinet).

8. Frappez brusquement les puits sur du papier absorbant ou des serviettes en papier pour éliminer toutes les gouttelettes d'eau résiduelles.

9. Versez 100 µl de réactif TMB dans chaque puits. Mélangez doucement pendant 10 secondes.

10. Incuber à température ambiante, pendant 20 minutes.

11. Arrêtez la réaction en ajoutant 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits.

12. Mélangez doucement pendant 30 secondes. *Assurez-vous que toute la couleur bleue passe complètement au jaune.*

13. Lire l'absorbance à 450 nm avec un lecteur de plaque de microtitration dans les 15 minutes.

Calcul des résultats

1. Calculer la valeur moyenne de l'absorbance pour chaque ensemble d'étalons de référence, de témoins et d'échantillons.
2. Construire une courbe standard en traçant l'absorbance moyenne obtenue pour chaque étalon de référence en fonction de sa concentration en $\mu\text{UI/ml}$, avec l'absorbance sur l'axe vertical (y) et concentration sur l'axe horizontal (x).
3. À l'aide de la valeur d'absorbance moyenne de chaque échantillon, déterminer la concentration correspondante de TSH en $\mu\text{UI/ml}$ à partir de la courbe standard. Selon l'expérience et/ou la disponibilité des capacités informatiques, d'autres méthodes de réduction des données peuvent être utilisées.
4. Tout échantillon dilué doit être corrigé par le facteur de dilution approprié.

Valeurs normales:

	TSH ($\mu\text{UI/ml}$)
Adulte	
21-54 ans	0.4-4.2
55-87 ans	0.5-8.9
Grossesse	
1er trimestre	0.3-4.5
2ème trimestre	0.5-4.6
3ème trimestre	0.8-5.2

ÉTUDE DE CAS

1. Patient: **IK, sexe: F, 40 ans.**

La patiente présente les symptômes suivants: prise de poids au cours des 6 derniers mois, fatigue, faiblesse, sensation de froid toujours, diminution des performances intellectuelles, cycles menstruels irréguliers, dysurie, pollakiurie. Le médecin recommande d'effectuer les analyses ci-dessous. Comparez ces valeurs avec les valeurs normales et établissez un diagnostic éventuel.

Examen biochimique du sang

Dénomination	Résultat	Plage de référence	Dénomination	Résultat	Plage de référence
Glycémie à jeun	100 mg/dl	75 à 115 mg/dl	Bilirubine directe	0,2 mg/dl	<0,2 mg/dl
HbA1c	5 %	4-6 %	Bilirubine totale	0,9 mg/dl	<1 mg/dl
L'ALAT	25 U/l	F: 10-22 U/l M: 10-29 U / l	Protéines totales	7,1 g/dl	6,2 à 8 g/dl
ASAT	21 U/l	F: 10-21 U/l M: 10-25 U / l	Hémoglobine	10,6 g/dl	F: 12-16 g/dl M: 14-18 g/dl
Urée	25 mg/dl	15 à 45 mg/dl	hsCRP	16 mg/l	<1 mg/l de risque CV faible 1-3 mg/l risque CV moyen >3mg/l de risque CV élevé
Créatinine	0,7 mg/dl	F<0,9 mg/dl M<1,1 mg/dl	cTnI	0,03 ng/ml	0,01 à 0,40 ng/ml
Clairance de la créatinine	102 ml/min	95 à 150 ml/min	Cystatine C	1,00 mg/l	0,49 à 1,13 mg/l
Acide urique	5,5 mg/dl	F: 2,5-7 mg/dl M: 3-9 mg/dl	Réserve alcaline	25 mEq/l	22 à 27 mEq/l
Amylase	75 U/l	50 à 100 U/l	Na+	138 mEq/l	135 à 145 mEq/l
Cholestérol total	296 mg/dl	140- 200 mg/dl	K+	5,1 mEq/l	3,8 à 5,4 mEq/l
Cholestérol HDL	45 mg/dl	F:45-65 mg/dl M: 35 à 55 mg/dl	TSH	42 mU/ml	0,27 à 4,20 µUI/ml
Triacylglycérols	306 mg/dl	F: 40-140 mg/dl M:60-165mg/dl	fT3	0,5 pg/ml	2,2 à 5,5 pg/ml
La LDH	236 U/l	F:135-215 U/l M: 135-225 U / l	fT4	0,2 ng/dl	0,7 à 2,2 ng/dl
CKMB	20 U/l	2-10 U/l	GGT	31 U/l	F: 5-40 U/l M: 8-61 U/l
			Phosphatase alcaline	100 U/l	F: <240 U/l M:<270 U/l

Examen biochimique de l'urine

Dénomination	Résultat	Plage de référence
Densité	1.025	1.015- 1.025
pH	7.5	6.5
Protéine	Négatif	Négatif
Glucose	Négatif	Négatif
Corps cétoniques	Négatif	Négatif
UBG	Normal	Normal
Bilirubine	Négatif	Négatif
Nitrites	Négatif	Négatif
Leucocytes	+(25/µl)	Négatif
Globules rouges	Négatif	Négatif

2. Patient: LM, sexe: F, 19 ans

Le patient présente les symptômes suivants: faiblesse générale, nervosité, anxiété, irritabilité, transpiration, peau moite et rouge, tremblements des mains, perte de poids. Le médecin recommande d'effectuer les analyses biochimiques suivantes. Comparez ces valeurs avec les valeurs normales et établissez un diagnostic éventuel.

Examen biochimique du sang

Dénomination	Résultat	Plage de référence	Dénomination	Résultat	Plage de référence
Glycémie à jeun	69 mg/dl	75 à 115 mg/dl	Bilirubine directe	0,2 mg/dl	<0,2 mg/dl
HbA1c	5 %	4-6 %	Bilirubine totale	0,9 mg/dl	<1 mg/dl
L'ALAT	19 U/l	F: 10-22 U/l M: 10-29 U / l	Protéines totales	6,6 g/dl	6,2 à 8 g/dl
ASAT	15 U/l	F: 10-21 U/l M: 10-25 U / l	Hémoglobine	11,6 g/dl	F: 12-16 g/dl M: 14-18 g/dl
Urée	20 mg/dl	15 à 45 mg/dl	hsCRP	6 mg/l	<1 mg/l de risque CV faible 1-3 mg/l risque CV moyen >3mg/l de risque CV élevé
Créatinine	0,6 mg/dl	F<0,9 mg/dl M<1,1 mg/dl	cTnI	0,06 ng/ml	0,01 à 0,40 ng/ml
Clairance de la créatinine	103 ml/min	95 à 150 ml/min	Cystatine C	0,99 mg/l	0,49 à 1,13 mg/l
Acide urique	8 mg/dl	F: 2,5-7 mg/dl M: 3-9 mg/dl	Réserve alcaline	26 mEq/l	22 à 27 mEq/l
Amylase	68 U/l	50 à 100 U/l	Na+	144 mEq/l	135 à 145 mEq/l
Cholestérol total	101 mg/dl	140- 200 mg/dl	K+	4,5 mEq/l	3,8 à 5,4 mEq/l
Cholestérol HDL	51 mg/dl	F:45-65 mg/dl M: 35 à 55 mg/dl	TSH	0,03 mU/ml	0,27 à 4,20 µU/ml
Triacylglycérols	70 mg/dl	F: 40-140 mg/dl M:60-165mg/dl	fT3	16,0 pg/ml	2,2 à 5,5 pg/ml
La LDH	151 U/l	F:135-215 U/l M: 135-225 U / l	fT4	8,3 ng/dl	0,7 à 2,2 ng/dl
CKMB	6 U/l	2-10 U/l	GGT	11 U/l	F: 5-40 U/l M: 8-61 U/l
			Phosphatase alcaline	201 U/l	F: <240 U/l M:<270 U/l

Examen biochimique de l'urine

Dénomination	Résultat	Plage de référence
Densité	1.010	1.015- 1.025
pH	5.0	6.5
Protéine	Négatif	Négatif
Glucose	Négatif	Négatif
Corps cétoniques	+(15mg/dl)	Négatif
UBG	Normal	Normal
Bilirubine	Négatif	Négatif
Nitrites	Négatif	Négatif
Leucocytes	Négatif	Négatif
Globules rouges	Négatif	Négatif

3. Patient: EF, sexe: F, 68 ans.

Le patient présente les symptômes suivants: perte de poids au cours des six derniers mois, anxiété, transpiration, maux de tête, soif, nausées et vomissements, oligurie, douleurs abdominales, œdème des membres inférieurs. Le médecin recommande d'effectuer les analyses biochimiques suivantes:

Examen biochimique du sang

Dénomination	Résultat	Plage de référence	Dénomination	Résultat	Plage de référence
Glycémie à jeun	80 mg/dl	75 à 115 mg/dl	Bilirubine directe	0,2 mg/dl	<0,2 mg/dl
HbA1c	5 %	4-6 %	Bilirubine totale	0,9 mg/dl	<1 mg/dl
L'ALAT	15 U/l	F: 10-22 U/l M: 10-29 U / l	Protéines totales	6,4 g/dl	6,2 à 8 g/dl
ASAT	19 U/l	F: 10-21 U/l M: 10-25 U / l	Hémoglobine	14,9 g/dl	F: 12-16 g/dl M: 14-18 g/dl
Urée	126 mg/dl	15 à 45 mg/dl	hsCRP	10 mg/l	<1 mg/l de risque CV faible 1-3 mg/l risque CV moyen >3mg/l de risque CV élevé
Créatinine	3,2 mg/dl	F<0,9 mg/dl M<1,1 mg/dl	cTnI	0,06 ng/ml	0,01 à 0,40 ng/ml
Clairance de la créatinine	50 ml/min	95 à 150 ml/min	Cystatine C	6,22 mg/l	0,49 à 1,13 mg/l
Acide urique	13 mg/dl	F: 2,5-7 mg/dl M: 3-9 mg/dl	Réserve alcaline	15 mEq/l	22 à 27 mEq/l
Amylase	89 U/l	50 à 100 U/l	Na+	144 mEq/l	135 à 145 mEq/l
Cholestérol total	189 mg/dl	140- 200 mg/dl	K+	7,2 mEq/l	3,8 à 5,4 mEq/l
Cholestérol HDL	45 mg/dl	F:45-65 mg/dl M: 35 à 55 mg/dl	TSH	0,10 mU/ml	0,27 à 4,20 µUI/ml
Triacylglycérols	130 mg/dl	F: 40-140 mg/dl M:60-165mg/dl	ft3	10,0 pg/ml	2,2 à 5,5 pg/ml
La LDH	155 U/l	F:135-215 U/l M: 135-225 U / l	ft4	5,1 ng/dl	0,7 à 2,2 ng/dl
CKMB	9 U/l	2-10 U/l	GGT	20 U/l	F: 5-40 U/l M: 8-61 U/l
			Phosphatase alcaline	155 U/l	F: <240 U/l M:<270 U/l

Examen biochimique de l'urine

Dénomination	Résultat	Plage de référence
Densité	1.010	1.015- 1.025
pH	7.0	6.5
Protéine	++(100mg/dl)	Négatif
Glucose	Négatif	Négatif
Corps cétoniques	Négatif	Négatif
UBG	Normal	Normal
Bilirubine	Négatif	Négatif
Nitrites	Négatif	Négatif
Leucocytes	++(75/µl)	Négatif
Globules rouges	++(50/µl)	Négatif

Comparer ces valeurs avec les valeurs normales et établir un diagnostic éventuel.

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L10. ÉVALUATION EN LABORATOIRE DES HORMONES SEXUELLES

OBJECTIFS D'APPRENTISSAGE

Classez les principales catégories d'hormones sexuelles (protéines et stéroïdes) et décrivez leurs rôles physiologiques.

Expliquez la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG).

Interpréter les mesures de laboratoire de FSH, LH, hCG, œstrogènes, progestérone et testostérone dans des contextes cliniques.

Identifiez les conditions associées à des niveaux anormaux d'hormones reproductives.

POINTS CLÉS

Les hormones sexuelles protéiques (FSH, LH, hCG, prolactine) agissent via des récepteurs membranaires et des systèmes de seconds messagers; Les hormones stéroïdes (œstrogènes, progestérone, testostérone) agissent via des récepteurs nucléaires intracellulaires.

L'axe HHG: GnRH (hypothalamus) → FSH et LH (hypophyse antérieure) → stéroïdes sexuels (gonades); Une rétroaction négative des œstrogènes et de la progestérone régule le cycle.

La FSH favorise la croissance folliculaire chez les femmes et la spermatogenèse chez les hommes; Le LH déclenche l'ovulation et maintient le corps jaune; La hCG maintient le corps jaune au début de la grossesse.

Les niveaux d'œstrogènes, de progestérone et de testostérone varient selon le sexe, l'âge et la phase du cycle menstruel; les résultats doivent toujours être interprétés en fonction de la plage physiologique appropriée.

ASPECTS GÉNÉRAUX

Les hormones sexuelles sont de deux types: *les protéines* et *les stéroïdes*.

Les stéroïdes ont un poids moléculaire d'environ 300 daltons, présentant ainsi une petite taille. En raison de leur taille et de leur liposolubilité (soluble dans les graisses), ils peuvent facilement se diffuser à travers les cellules cibles, ayant par conséquent des récepteurs intracellulaires. Alors que les hormones protéiques pèsent plus de 5 000 daltons et ne peuvent donc pas pénétrer dans les cellules, elles ont besoin de récepteurs membranaires. Les stéroïdes peuvent circuler dans la circulation sanguine, uniquement s'ils sont liés à des protéines non spécifiques comme l'albumine, ou à des protéines spécifiques comme la SHBG (globuline liant les hormones sexuelles). D'autre part, les hormones protéiques sont hydrosolubles et circulent librement dans le sang.

LES HORMONES PROTÉIQUES

A. Les gonadotrophines

Ces hormones sont produites par différents tissus (hypophyse et placenta) et leur fonction principale est la régulation gonadique (ovaires et testicules). Les gonadotrophines comprennent:

- la FSH (hormone folliculo-stimulante),
- LH (hormone lutéinisante) et
- hCG (gonadotrophine chorionique humaine).

A1. Hormone folliculo-stimulante (FSH)

La FSH est une glycoprotéine produite par l'hypophyse et a un poids moléculaire d'environ 30 000 daltons. Morphologiquement, il s'agit d'un hétérodimère composé de deux sous-unités différentes: a et b. La sous-unité a (89 acides aminés) est commune à toutes les gonadotrophines ainsi qu'à la TSH (hormone thyroïdienne). La sous-unité b (118 acides aminés) est spécifique de la FSH.

La fonction principale de la FSH est de promouvoir et de soutenir la croissance folliculaire ovarienne chez les femmes et la spermatogenèse chez les hommes. La FSH stimule également la synthèse de son propre récepteur sur les cellules de la granulosa et de Sertoli et du récepteur LH sur les cellules de la granulosa. Il stimule l'activité de l'aromatase à l'intérieur des cellules de la granulosa (l'enzyme qui convertit les androgènes en œstrogènes).

La synthèse et la sécrétion de FSH par l'hypophyse sont contrôlées par différents régulateurs, tels que: la GnRH (hormone de libération des gonadotrophines d'origine hypothalamique), les œstrogènes ovariens, l'activine et l'inhibine (tous deux d'origine gonadique).

A2. Hormone lutéinisante (LH)

La LH est une glycoprotéine d'un poids moléculaire d'environ 30 000 daltons, produite par l'hypophyse. Comme la FSH, la LH est également présente sous la forme d'un hétérodimère avec deux sous-unités différentes: a et b.

Les principales fonctions de LH sont:

1. favoriser la synthèse des androgènes dans les cellules thécales des ovaires et dans les cellules interstitielles des testicules,
2. induire l'ovulation (en stimulant la cascade d'enzymes protéolytiques conduisant à la rupture de la membrane basale du follicule) et
3. Maintien du corps jaune pendant le cycle menstruel.

La synthèse de LH et la sécrétion de la glande pituitaire par l'hypophyse sont contrôlées par différents régulateurs, comme la GnRH (hormone de libération des gonadotrophines d'origine hypothalamique) et les œstrogènes ovariens et la progestérone.

Chez les femmes, les taux de LH et de FSH peuvent aider à différencier l'insuffisance ovarienne primaire (défaillance des ovaires eux-mêmes ou absence de développement ovarien) et l'insuffisance ovarienne secondaire (défaillance des ovaires due à des troubles de l'hypophyse ou de l'hypothalamus). Une augmentation des niveaux de LH et de FSH est observée dans l'insuffisance ovarienne primaire (par exemple, syndrome de Turner, déficit en 17-alpha-hydroxylase, radiothérapie, chimiothérapie, maladie thyroïdienne, tumeur ovarienne). Lorsqu'une femme entre en ménopause et que ses ovaires cessent de fonctionner, les niveaux de LH augmentent.

De faibles niveaux de LH et de FSH sont observés dans l'insuffisance ovarienne secondaire et indiquent un problème avec l'hypophyse ou l'hypothalamus.

Chez les hommes, des taux élevés de LH indiquent une insuffisance testiculaire primaire. Cela peut être dû à des défauts de développement de la croissance testiculaire ou à des lésions testiculaires (par exemple, syndrome de Klinefelters, radiothérapie, chimiothérapie).

Les résultats du test de réponse de la LH à la GnRH peuvent aider à différencier le dysfonctionnement primaire (défaillance des ovaires ou des testicules) et le trouble secondaire (un problème impliquant l'hypophyse ou l'hypothalamus). Une fois que le taux de base de LH a été mesuré, une dose de GnRH est administrée par injection. Une augmentation ultérieure du taux de LH indique que l'hypophyse a répondu à la GnRH et indique un trouble impliquant les ovaires ou les testicules. Un taux réduit de LH montre que l'hypophyse n'a pas répondu à la GnRH et suggère une maladie impliquant l'hypophyse ou l'hypothalamus.

Chez les jeunes enfants, des niveaux élevés de LH et de FSH et/ou le développement de caractères sexuels secondaires à un âge inhabituellement jeune sont une indication de puberté précoce. Ceci est beaucoup plus fréquent chez les filles que chez les garçons. En période de puberté tardive, les taux de LH et de FSH peuvent être normaux ou inférieurs à ce qui est attendu pour un jeune dans la tranche d'âge de la puberté. Il peut être nécessaire d'effectuer le test de réponse de la LH à la GnRH en même temps que d'autres tests pour diagnostiquer la raison du retard de la puberté.

A3. Gonadotrophine chorionique humaine (hCG)

L'hCG est une glycoprotéine d'un poids moléculaire d'environ 43 000 daltons, produite par le syncytiotrophoblaste. Il s'agit d'un hétérodimère composé de deux sous-unités différentes: a et b. La sous-unité b spécifique contient 145 acides aminés et ne peut être distinguée de la sous-unité b de LH que par 30 acides aminés dans la partie terminale C de la molécule.

La molécule entière de hCG est également appelée holo-hCG, afin d'être distinguée de l'hCG totale, actuellement mesurée en laboratoire, (holo-hCG + sous-unité b libre). La sous-unité b libre circule également dans le sang. Une forme particulière d'hCG, appelée hCG « entaillée », est une holo-hCG ou une sous-unité b libre, où la liaison entre le 46e et le 47e acide aminé est rompue. Cela donne naissance à une forme tridimensionnelle particulière de la molécule, ce qui la rend souvent

difficile à reconnaître par les anticorps utilisés pour sa mesure. La reconnaissance immunologique des formes « entaillées » est particulièrement importante lorsque l'hCG est mesurée pour déterminer le risque qu'une mère porte un bébé trisomique 21 (connu sous le nom de « double test ou triple test »), car dans cette pathologie chromosomique, les formes « entaillées » augmentent considérablement.

La fonction de l'hCG est essentielle pour maintenir le corps jaune de la grossesse et sa sécrétion de progestérone. Mais il a aussi un effet anti-gonadotrophique, car il inhibe la sécrétion de LH et de FSH. On dit que l'hCG est une hormone « stéroïdogène », non seulement parce qu'elle favorise la sécrétion de progestérone par le corps jaune, mais aussi parce qu'elle stimule la sécrétion de stéroïdes par les gonades fœtales. La régulation de la synthèse et de la sécrétion d'hCG est assurée par une GnRH trophoblastique.

B. Prolactine (Prl)

La prolactine humaine est une protéine non glycosylée, qui contient une simple chaîne polypeptidique de 198 acides aminés. Sa structure est similaire à celle du lactogène placentaire humain (hPL) et de l'hormone de croissance (GH). Dans la circulation, la prolactine peut également apparaître sous sa forme monomère (peu de prolactine) ou polymérique (grosse ou grande-grosse prolactine). La relation quantitative entre ces différentes formes varie en fonction des conditions physiologiques et pathologiques et en fonction de l'anticorps utilisé pour leur mesure.

La prolactine est essentiellement d'origine hypophysaire, mais les cellules stromales de l'endomètre produisent également de la prolactine pendant la phase sécrétoire. Cette hormone est considérée comme un marqueur de décidualisation.

La principale fonction biologique de la prolactine chez les femmes est de contrôler le développement des seins et la lactation.

Le rôle de la prolactine chez l'homme et de la prolactine de l'endomètre chez la femme n'est pas encore connu. Si la progestérone est le principal régulateur de la prolactine endométriale, la prolactine hypophysaire est essentiellement contrôlée par la dopamine (appelée également PIF ou facteur inhibiteur de la prolactine). Cependant, la TRH (hormone de libération de la thyroïde) et la VIP (peptide intestinal vasoactif) sont capables de stimuler la libération de prolactine hypophysaire.

Les hommes et les femmes non enceintes n'ont normalement que de petites quantités de prolactine dans le sang. Les niveaux de prolactine doivent toutefois être évalués en fonction du moment de la journée où ils sont recueillis. Les niveaux varient sur une période de 24 heures, augmentant pendant le sommeil et culminant le matin.

Des taux élevés de prolactine (hyperprolactinémie) sont normaux pendant la grossesse et après l'accouchement pendant que la mère allaite. Des niveaux élevés sont également observés avec :

- Anorexie mentale
- Médicaments: œstrogènes, antidépresseurs tricycliques et médicaments qui bloquent l'effet de la dopamine (une substance chimique du cerveau qui régule et inhibe la production de prolactine) tels que: les tranquillisants, certains médicaments contre l'hypertension et certains médicaments utilisés pour traiter le reflux gastro-œsophagien
- Maladies hypothalamiques
- Hypothyroïdisme
- Maladie rénale
- Stimulation du mamelon (augmentation modérée)
- Autres tumeurs et maladies de l'hypophyse
- Syndrome des ovaires polykystiques
- Prolactinomes

Les taux de prolactine inférieurs à la normale ne sont généralement pas traités, mais peuvent être le signe d'un hypopituitarisme plus général (diminution de la fonction hypophysaire et diminution de la production d'hormones). De faibles niveaux peuvent également être causés par des drogues telles que la dopamine.

LES HORMONES STÉROÏDES

A. Œstrogènes

- **Estradiol (E2)**
- **Estrone (E1)**
- **Estriol (E3)**

B. Progestérone (P4)

C. Testostérone (T)

A. Œstrogènes

Les œstrogènes sont de trois types: l'œstrone (E1), l'œstradiol (E2) et l'estriol (E3).

À concentrations égales, E2 a un effet biologique plus fort que E1 qui est plus puissant que E3. L'E2 peut être converti de manière réversible en E1 et en E1-sulfate. Ce sulfate est quantitativement le métabolite le plus important dans la circulation. La conversion enzymatique des œstrogènes se produit dans le foie. Les œstrogènes sont excrétés dans l'urine sous forme de glucuronides ou de sulfates

Estradiol (E2)

Chez les femmes en âge de procréer, l'E2 est essentiellement produit par la conversion enzymatique des androgènes (androstènedione et testostérone). Les androgènes sont produits par les cellules thécales sous l'influence de la LH et leur conversion en E2 se produit dans les cellules de la granulosa du follicule, par l'enzyme aromatasase. L'activité de l'aromatasase dépend des niveaux de FSH. Ainsi, une sécrétion harmonieuse d'E2 dépend des deux gonadotrophines hypophysaires.

Chez les femmes ménopausées, le faible taux d'E2 est fourni par la conversion périphérique (foie, graisse et tissus musculaires) (aromatisation) des androgènes sécrétés par les glandes surrénales.

Chez l'homme, 20 % de l'E2 circulant est fourni par la production d'une cellule de Sertoli et 80 % provient de la conversion périphérique des androgènes.

Les principales fonctions de l'E2 chez la femme sont l'effet mitotique sur la muqueuse utérine et sur le sein, le retour d'information (positif et négatif) sur les gonadotrophines hypophysaires et son rôle dans la minéralisation osseuse.

Estrone (E1)

Chez les femmes en âge de procréer, E1 est principalement produit à partir de la conversion enzymatique de l'androstènedione, qui est sécrétée sous l'influence de la LH par les cellules thécales. L'activité de l'aromatasase dépend de la FSH. Chez les femmes ménopausées et chez les hommes, l'E1 et son sulfate représentent les principaux œstrogènes circulants.

La fonction biologique de E1 est encore spéculative, mais elle pourrait être liée à l'effet régulateur que la conversion de E1 en E2 a sur le degré d'œstrogénisation.

Estriol (E3)

Chez les femmes en âge de procréer, les très faibles concentrations d'E3 sont produites par l'hydroxylation hépatique de E1 et E2. Pendant la grossesse, l'E3 est produite en grande quantité à partir de l'unité fœto-placentaire. Comme la 17-hydroxylase est absente dans le placenta et que la 3- β -hydroxy-déshydrogénase est absente chez le fœtus, la production d'E3 dépend d'une collaboration fœto-placentaire. Le mécanisme est le suivant: la prégénolone placentaire (le précurseur de la progestérone) est réduite en sulfate de déhydroépiandrostérone (DHEAS) dans les glandes surrénales fœtales. La DHEAS retourne au placenta, où elle se transforme en androstènedione puis en E3. Les concentrations en E3 augmentent fortement pendant la grossesse, reflétant ainsi la coopération fœto-placentaire. Pour cette raison, le taux d'E3 est utilisé depuis longtemps pour évaluer les grossesses à haut risque.

Le rôle biologique de l'E3 reste encore inconnu. Le test de fraction d'œstrogène est effectué pour évaluer la maturité sexuelle, les problèmes menstruels et les problèmes de fertilité chez les femmes. Ce test peut également être utilisé pour tester les tumeurs qui excrètent des œstrogènes. Chez les femmes enceintes, il aide à déterminer la santé fœtale-placentaire. La fraction d'œstrogène est utilisée chez les hommes pour évaluer la gynécomastie, ou syndromes de féminisation.

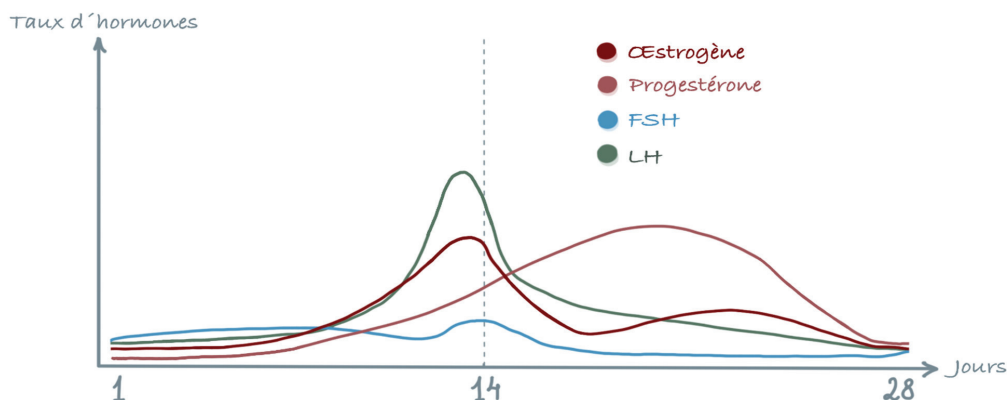


Figure 1. Évolution hormonale au cours d'un cycle menstruel

B. Progestérone (P4)

Chez les femmes non enceintes en âge de procréer, la P4 est essentiellement d'origine ovarienne, la participation du cortex surrénalien est négligeable. Au milieu du cycle menstruel, c'est le pic de LH qui induit des modifications biochimiques et phénotypiques des cellules de la granulosa, appelées aussi « processus de lutéinisation ». Ce processus rend les cellules de la granulosa capables de produire de la progestérone. Ainsi, la progestérone, qui devient détectable à partir du milieu du cycle, est essentiellement produite par le corps jaune. Au début de la grossesse (< 12 semaines), la P4 est également produite par le corps jaune; après 12 à 14 semaines de grossesse, la synthèse et la production de P4 sont exclusivement d'origine placentaire.

Le rôle biologique de P4 est de transformer la muqueuse utérine, déjà stimulée par E2, en une muqueuse sécrétoire, qui peut recevoir un ovule fécondé. D'autre part, la progestérone inhibe les contractions utérines. La synthèse de la progestérone dans le corps jaune est stimulée par la LH et l'hCG. La régulation de la production de progestérone dans le placenta n'est pas encore connue, mais on pense qu'elle dépend en partie de l'hCG.

Le test de dosage de la progestérone est prescrit pour évaluer les femmes qui ont des difficultés à tomber enceintes ou à maintenir une grossesse, et pour surveiller les grossesses à haut risque.

C. Testostérone (T)

Chez les femmes en âge de procréer, la T est produite par les cellules thécales qui entourent le follicule. Cet androgène (T) sert de substrat pour la synthèse de l'E2, mais il est également détecté dans la circulation, même à de très faibles concentrations. Chez les hommes, la testostérone est produite par les cellules de Leydig, mais l'apport des androgènes surrénaliens ne peut être négligé, en particulier dans certaines pathologies du nouveau-né. Le rôle biologique de la T chez la femme est de favoriser l'atrophie folliculaire (un follicule qui a une capacité d'aromatase diminuée ne peut pas aromatiser tous les androgènes devient atrophique). Chez l'homme, la T donne l'apparence de caractères sexuels secondaires (voix, pilosité) et contrôle la sécrétion de gonadotrophines.

Les niveaux de testostérone sont ordonnés pour évaluer:

- Caractéristiques sexuelles ambiguës
- Puberté précoce
- Syndromes virilisants chez la femme
- L'infertilité chez l'homme
- Tumeurs rares de l'ovaire et du testicule

La surproduction de testostérone causée par des tumeurs testiculaires, surrénales ou hypophysaires chez le jeune homme peut entraîner une puberté précoce.

La surproduction de testostérone chez les femmes, causée par des tumeurs ovariennes et surrénales, peut entraîner une masculinisation, dont les symptômes comprennent l'arrêt du cycle menstruel (**aménorrhée**) et la croissance excessive des poils (**hirsutisme**).

Lorsque des niveaux réduits de testostérone chez l'homme indiquent une sous-activité des testicules (**hypogonadisme**), des tests de stimulation de la testostérone peuvent être prescrits.

Préparation aux tests

Les tests de progestérone et de testostérone nécessitent un échantillon de sang; Il n'est pas nécessaire pour le patient de restreindre la nourriture ou les liquides avant le test.

Les échantillons de testostérone doivent être prélevés le matin, car les niveaux de testostérone sont les plus élevés tôt le matin.

Le test de fraction d'œstrogène peut être effectué sur du sang et/ou de l'urine.

Valeurs normales

Les niveaux d'œstrogène varient chez les femmes, allant de 24 à 149 picogrammes par ml de sang. Chez les hommes, la plage normale se situe entre 12 et 34 picogrammes par ml de sang.

Les niveaux de progestérone varient de moins de 150 nanogrammes par décilitre (ng/dl) de sang à 2 000 nanogrammes chez les femmes menstruées. Pendant la grossesse, les niveaux de progestérone varient de 1 500 à 20 000 ng/dl de sang.

Les valeurs de testostérone varient d'un laboratoire à l'autre, mais peuvent généralement être trouvées dans:

- Hommes. 300 à 1 200 ng/dl
- Femme. 30 à 95 ng/dl
- Enfants prépubères:
 - Moins de 100 ng/dl (garçons),
 - Moins de 40 ng/dl (filles).

Résultats anormaux

Des niveaux accrus d'œstrogènes sont observés dans les syndromes de féminisation:

- Lorsqu'un mâle commence à développer des caractères sexuels secondaires féminins
- Pendant la puberté précoce
- Lorsque les enfants développent des caractères sexuels secondaires à un âge anormalement précoce
 - En raison d'une tumeur ovarienne, testiculaire ou surrénale
 - Pendant une grossesse normale, cirrhose et hyperthyroïdie

Une diminution des niveaux d'œstrogènes se trouve dans les conditions suivantes:

- Une grossesse ratée
- Pendant la ménopause
- Anorexie mentale
- Hypogonadisme primaire et secondaire
- Syndrome de Turner, observé chez les femmes ayant un chromosome X manquant (45 X)

Une augmentation des niveaux de progestérone est observée:

- Pendant l'ovulation et la grossesse
- Avec certains types de kystes ovariens
- Avec une tumeur de l'ovaire connue sous le nom de choriocarcinome

Une diminution des niveaux de progestérone est observée:

- Dans la toxémie de la grossesse
- Avec une menace d'avortement
- Lors d'une insuffisance placentaire
- Après la mort **fœtale**
- Avec aménorrhée
- En raison d'un dysfonctionnement ovarien

L'augmentation des niveaux (masculins) de testostérone se trouve dans:

- Précocité sexuelle
- L'infection virale de l'encéphalite
- Tumeurs impliquant les glandes surrénales
- Tumeurs testiculaires
- Production excessive de thyroïde (hyperthyroïdie)
- Syndromes de résistance à la testostérone.

Des niveaux accrus (femelles) de testostérone sont trouvés:

- Tumeurs de l'ovaire
- Tumeurs surrénales
- En présence d'une croissance excessive des cheveux de cause inconnue (hirsutisme).

Une diminution des niveaux (masculins) de testostérone est observée chez:

- Syndrome de Klinefelter (hommes 47 XXY, 48 XXXY)
- Une déficience chromosomique
- Hypogonadisme primaire et secondaire
- Trisomie 21
- Ablation chirurgicale des testicules
- Cirrhose.

Tests commerciaux

FSH - Tests d'hormone folliculaire stimulante

La FSH, ou hormone folliculo-stimulante, est excrétée par l'hypophyse. Au cours de la phase folliculaire du cycle menstruel, la FSH favorise la croissance et la maturation des ovules de la femme. Si une femme souffre d'infertilité ou s'approche de la ménopause, cela peut être le signe d'une faible production d'ovules ovariens - et cela est indiqué par un taux élevé de FSH. En cas de problèmes d'infertilité, l'hormone FSH est libérée en quantités supérieures à la normale pour stimuler les ovaires à produire un ovule mature et plus d'œstrogènes. Le test urinaire FSH est un kit de test permettant de déterminer la concentration de FSH (hormone folliculaire stimulante humaine) dans les échantillons d'urine.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. Dosage quantitatif de l'hormone lutéinisante dans le sérum humain (ELISA LH)

Introduction

Ce test est utile dans le diagnostic et le traitement de la dysfonction gonadique.

L'hormone lutéinisante (LH) est produite chez les hommes et les femmes à partir de l'hypophyse antérieure en réponse à l'hormone de libération de l'hormone lutéinisante (LH-RH ou Gn-RH), libérée par l'hypothalamus. La LH, également appelée hormone interstitielle stimulante les cellules (ICSH) chez l'homme, est une glycoprotéine d'un poids moléculaire d'environ 30 000 daltons. Il est composé de deux chaînes d'acides aminés dissemblables associées de manière non covalente, alpha et bêta. La chaîne alpha est similaire à celle trouvée dans l'hormone thyroïdienne humaine (TSH), l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et la gonadotrophine chorionique humaine (hCG). Les différences entre ces hormones résident dans la composition en acides aminés de leurs sous-unités bêta, qui expliquent leur différenciation immunologique. La sécrétion basale de LH chez l'homme est épisodique et a pour fonction principale de stimuler les cellules interstitielles (cellules de Leydig) à produire de la testostérone. La variation des concentrations de LH chez les femmes est soumise au cycle ovarien complexe des femmes menstruées en bonne santé et dépend d'une séquence d'événements hormonaux le long de l'axe gonado-hypothalamo-hypophysaire. La diminution des taux de progestérone et d'œstradiol par rapport à l'ovulation précédente initie chaque cycle menstruel. En raison de la diminution des niveaux d'hormones, l'hypothalamus augmente la sécrétion de facteurs de libération des gonadotrophines (GnRF), ce qui stimule à son tour l'hypophyse pour augmenter la production et la sécrétion de FSH. L'augmentation des niveaux de FSH stimule plusieurs follicules pendant la phase folliculaire; L'un d'entre eux mûrira pour contenir l'œuf. Au fur et à mesure que le follicule se développe, l'œstradiol est sécrété lentement au début, mais au 12^e ou 13^e jour d'un cycle normal, il augmente rapidement. La LH est libérée à la suite de cette augmentation rapide de l'œstradiol en raison de la stimulation directe de l'hypophyse et de l'augmentation de la GnRF et de la FSH. Ces événements constituent la phase pré-ovulatoire. L'ovulation se produit environ 12 à 18 heures après que la LH ait atteint un niveau maximal. Après la libération de l'ovule, le corps jaune se forme et sécrète de la progestérone et de l'œstrogène, les régulateurs de rétroaction de la LH. La phase lutéale suit rapidement cette phase ovarienne et se caractérise par des taux élevés de progestérone, une deuxième augmentation de l'œstradiol et de faibles niveaux de LH et de FSH. De faibles niveaux de LH et de FSH sont le résultat des effets de rétroaction négatifs de l'œstradiol et de la progestérone sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Après la conception, l'embryon en développement produit de l'hCG, ce qui fait que le corps jaune continue à produire de la progestérone et de l'œstradiol. Le corps jaune régresse si la grossesse ne se produit pas, et la baisse correspondante des taux de progestérone et d'œstradiol entraîne les menstruations. L'hypothalamus recommence le cycle menstruel en raison de ces faibles niveaux d'hormones. Les patients souffrant d'hypogonadisme présentent des concentrations accrues de LH sérique. Une diminution de la production d'hormones stéroïdes chez les femmes est le résultat d'ovaires immatures, d'une insuffisance ovarienne primaire, d'une maladie des ovaires polykystiques ou de la ménopause. La sécrétion de LH n'est pas régulée dans ces cas. Une perte similaire d'hormones régulatrices se produit chez les mâles lorsque les testicules se développent anormalement ou qu'une anorchie existe. Des concentrations élevées de LH peuvent également être trouvées dans l'insuffisance testiculaire primaire et le syndrome de Klinefelter, bien que les niveaux de LH ne soient pas nécessairement élevés si la sécrétion d'androgènes se poursuit. Des concentrations accrues de LH sont également présentes en cas d'insuffisance rénale, de cirrhose, d'hyperthyroïdie et de famine sévère. Un manque de sécrétion par l'hypophyse antérieure peut entraîner une baisse des taux de LH. Comme on peut s'y attendre, de faibles niveaux peuvent entraîner l'infertilité chez les

hommes et les femmes. De faibles niveaux de LH peuvent également être dus à la diminution de la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus. De faibles valeurs de LH peuvent donc indiquer un dysfonctionnement de l'hypophyse ou de l'hypothalamus, mais la source réelle du problème doit être confirmée par d'autres tests. Dans le diagnostic différentiel de la dysfonction hypothalamologique, hypophysaire ou gonadique, des dosages de concentration de LH sont systématiquement effectués en conjonction avec des dosages de FSH car leurs rôles sont étroitement liés. De plus, les niveaux d'hormones sont utilisés pour déterminer la ménopause, localiser l'ovulation et surveiller l'endocrinothérapie.

Principe du dosage

L'ELISA LH est basé sur le principe d'un dosage immuno-enzymatique en phase solide. Le système de dosage utilise un anticorps monoclonal anti- α -LH de souris pour l'immobilisation en phase solide (puits de microtitration), et un anticorps monoclonal anti- β -LH de souris dans la solution conjuguée anticorps-enzyme (peroxydase de raifort). L'échantillon de test peut réagir simultanément avec les anticorps, ce qui fait que les molécules de LH sont prises en sandwich entre la phase solide et les anticorps liés aux enzymes. Après 45 minutes d'incubation à température ambiante, les puits sont lavés à l'eau pour éliminer les anticorps marqués non liés. Une solution de tétraméthylbenzidine (TMB) est ajoutée et incubée pendant 20 minutes, ce qui entraîne le développement d'une couleur bleue. Le développement de la couleur est stoppé par l'ajout de 1N HCl, et la couleur jaune résultante est mesurée spectrophotométriquement à 450 nm. La concentration de LH est directement proportionnelle à l'intensité de la couleur de l'échantillon de test.

Réactifs et matériaux fournis

1. Puits recouverts d'anticorps (96 puits). Puits de microtitration recouverts d'anticorps anti- α -LH de souris.
2. Réactif conjugué enzymatique (13 ml). Contient de l'anti-LH monoclonal de souris conjugué à la peroxydase de raifort.
3. Ensemble de normes de référence. Contient 0, 5, 15, 50, 100 et 200 mUI/ml de LH humaine dans du sérum de bovin avec des conservateurs.
4. Réactif TMB (11 ml). Contient de la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) stabilisée dans une solution tampon.
5. Solution d'arrêt - 1N HCl (11 ml). Contient de l'acide chlorhydrique dilué.

Matériel requis mais non fourni

1. Eau distillée ou désionisée
2. Pipettes de précision: 0,05, 0,1, 0,2 et 1 ml
3. Pointes de pipette jetables
4. Lecteur de puits de microtitration capable de lire l'absorbance à 450 nm
5. Mélangeur vortex ou équivalent
6. Papier absorbant
7. Papier millimétré linéaire

Instrumentation - voir TSH

Prélèvement et préparation des échantillons - voir TSH

Procédure d'analyse

1. Fixez le nombre souhaité de puits revêtus dans le support.
2. Distribuez 50 µl d'étalons, d'échantillons et de contrôles dans les puits appropriés.
3. Distribuez 100 µl de réactif de conjugué enzymatique dans chaque puits.
4. Bien mélanger pendant 30 secondes. Il est très important d'avoir un mélange complet.
5. Incuber à température ambiante (18-25°C) pendant 45 minutes.
6. Retirez le mélange d'incubation en jetant le contenu de la plaque dans un récipient à déchets.
7. Rincez et effleurez les puits de microtitration 5 fois avec de l'eau distillée ou désionisée.
8. Frappez brusquement les puits sur du papier absorbant ou des serviettes en papier pour éliminer toutes les gouttelettes d'eau résiduelles.
9. Versez 100 µl de réactif TMB dans chaque puits. Mélangez doucement pendant 5 secondes.
10. Incubez à température ambiante, dans l'obscurité, pendant 20 minutes.
11. Arrêtez la réaction en ajoutant 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits.
12. Mélangez doucement pendant 30 secondes. Assurez-vous que toute la couleur bleue passe complètement au jaune.
13. Lisez l'absorbance à 450 nm avec un lecteur de plaque de microtitration dans les 15 minutes.

Calcul des résultats

1. Calculer la valeur moyenne de l'absorbance (A450) pour chaque ensemble d'étalons de référence, de contrôles et d'échantillons.
2. Construire une courbe standard en traçant l'absorbance moyenne obtenue pour chaque étalon de référence en fonction de sa concentration en mUI/ml sur du papier millimétré linéaire, avec l'absorbance sur l'axe vertical (y) et la concentration sur l'axe horizontal (x).
3. À l'aide de la valeur d'absorbance moyenne de chaque échantillon, déterminer la concentration correspondante de LH en mIU/ml à partir de la courbe standard. Selon l'expérience et/ou la disponibilité des capacités informatiques, d'autres méthodes de réduction des données peuvent être utilisées.
4. Tout échantillon dilué doit être corrigé par le facteur de dilution approprié.

Valeurs attendues

Chaque laboratoire doit établir sa propre plage normale en fonction de la population de patients.

Adulte	mUI/ml
Mâle	1.24-7.8
Femelle	
Phase folliculaire	1.68-15
Pic ovulatoire	21.9-56.6
Phase lutéale	0.61-16.3
Ménopausées	14.2-52.3

2. Mesure urinaire de la gonadotrophine chorionique humaine (hCG)

Introduction

La gonadotrophine chorionique humaine (hCG) est une hormone glycoprotéique produite pendant la grossesse qui est fabriquée par l'embryon en développement peu de temps après la conception, puis par le syncytiotrophoblaste (partie du placenta). Son rôle est d'empêcher la désintégration du corps jaune de l'ovaire et ainsi de maintenir la production de progestérone qui est essentielle à une grossesse chez l'homme.

L'hCG peut avoir des fonctions supplémentaires; par exemple, on pense que l'hCG affecte la tolérance immunitaire de la grossesse. Le dépistage précoce de la grossesse, en général, est basé sur la détection ou la mesure de l'hCG. Parce que l'hCG est également produite par certains types de tumeurs, l'hCG est un marqueur tumoral important, mais on ne sait pas si cette production est une cause contributive ou un effet de la tumorigénèse.

En tant que structure, l'hCG est une glycoprotéine, hétérodimérique, avec une sous-unité α identique à celle de l'hormone lutéinisante (LH), de l'hormone folliculo-stimulante (FSH), de l'hormone stimulant la thyroïde (TSH) et β sous-unité unique à l'hCG.

La gonadotrophine chorionique humaine interagit avec le récepteur LHCG et favorise le maintien du corps jaune au début de la grossesse, ce qui l'amène à sécréter l'hormone progestérone.

Il a également été émis l'hypothèse que l'hCG pourrait être un lien placentaire pour le développement de l'immunotolérance maternelle locale. Il a également été suggéré que les niveaux de hCG sont liés à la gravité des nausées matinales chez les femmes enceintes. En raison de sa similitude avec la LH, l'hCG peut également être utilisée cliniquement pour induire l'ovulation dans les ovaires ainsi que la production de testostérone dans les testicules. La gonadotrophine chorionique humaine joue également un rôle dans la différenciation/prolifération cellulaire et peut activer l'apoptose.

Mesures de l'hCG

Les taux d'hCG peuvent être mesurés dans le sang ou l'urine. Le plus souvent, il s'agit d'un test de grossesse, destiné à indiquer la présence ou l'absence d'un embryon implanté. Le test de l'hCG peut également être effectué lors du diagnostic ou de la surveillance des tumeurs germinales et des maladies trophoblastiques gestationnelles. La plupart des tests utilisent un anticorps monoclonal, qui est spécifique de la sous-unité β de l'hCG (β -hCG). Cette procédure est utilisée pour s'assurer que les tests ne donnent pas de faux positifs en confondant hCG avec LH et FSH. (Les deux derniers sont toujours présents à des niveaux variables dans le corps, tandis que la présence de hCG indique presque toujours une grossesse.)

Le test d'urine peut être un dosage immunologique chromatographique ou l'un des autres formats de test, à domicile, dans le cabinet d'un médecin ou en laboratoire. Les seuils de détection publiés varient de 20 à 100 mUI/ml, selon la marque du test. Au début de la grossesse, des résultats plus précis peuvent être obtenus en utilisant la première urine du matin, lorsque les niveaux d'hCG sont les plus élevés. Lorsque l'urine est diluée (densité inférieure à 1,015), la concentration en hCG peut ne pas être représentative de la concentration sanguine et le test peut être faussement négatif.

Le test sérique, utilisant 2 à 4 ml de sang veineux, est généralement un dosage immunologique chimiluminescent ou fluorimétrique qui peut détecter des taux de β hCG aussi bas que 5 mUI/ml et permet de quantifier la concentration de β hCG. La capacité de quantifier le taux de β hCG est utile dans la surveillance des cellules germinales et des tumeurs trophoblastiques, le suivi des soins après une fausse couche, ainsi que dans le diagnostic et les soins de suivi après le traitement de la grossesse extra-utérine. L'absence de fœtus visible à l'échographie vaginale après que les taux de β hCG ont atteint 1500 UI/ml est fortement indicative d'une grossesse extra-utérine.

Les maladies trophoblastiques gestationnelles comme les grains de beauté hydatiformes (« grossesse molaire ») ou le choriocarcinome peuvent produire des niveaux élevés de β hCG (en raison de la présence de syncytialtrophoblastes, partie des villosités qui composent le placenta) malgré l'absence d'embryon. Ceci, ainsi que plusieurs autres conditions, peut entraîner des lectures élevées d'hCG en l'absence de grossesse.

Les niveaux d'hCG sont également une composante du *test triple*, un test de dépistage de certaines anomalies chromosomiques fœtales/malformations congénitales.

Niveaux de référence

Ce qui suit est une liste des taux sériques d'hCG. (La LMP est la dernière période menstruelle.)

- 3 semaines depuis LMP: 5 à 50 mUI/ml
- 4 semaines depuis LMP: 5 - 426 mUI/ml
- 5 semaines depuis LMP: 18 - 7 340 mUI/ml
- 6 semaines depuis LMP: 1 080 - 56 500 mUI/ml
- 7 à 8 semaines depuis l'aménorrhée: 7 650 à 229 000 mUI/ml
- 9 à 12 semaines depuis l'aménorrhée: 25 700 à 288 000 mUI/ml
- 13 à 16 semaines depuis l'aménorrhée: 13 300 à 254 000 mUI/ml
- 17 à 24 semaines depuis l'aménorrhée: 4 060 à 165 400 mUI/ml
- 25 à 40 semaines depuis l'aménorrhée: 3 640 à 117 000 mUI/ml
- Femelles non gravides: <5,0 mUI/ml
- Femmes ménopausées: <9,5 mUI/ml

Bandelette de test de grossesse pour l'urine

L'apparition et l'augmentation rapide de la concentration de hCG dans l'urine de la mère en font un bon marqueur pour confirmer la grossesse. La concentration d'hCG dans l'urine augmente régulièrement jusqu'à un pic de circulation pouvant atteindre 50 000 mUI/ml entre la huitième et la onzième semaine.

Principe

Le **test urinaire hCG** est un test immunologique chromatographique qui utilise des anticorps spécifiques pour identifier sélectivement l'hCG dans l'urine avec un haut degré de sensibilité. Des taux élevés d'hCG aussi bas que 20 mUI/ml peuvent être détectés en 3 minutes.

L'urine est ajoutée au kit de test et laissée migrer à travers le dispositif absorbant. Le conjugué anticorps-colorant marqué se lie à l'hCG dans l'échantillon, formant un complexe anticorps-antigène. Ce complexe se lie à l'anticorps anti-hCG dans la zone de test et produit une bande de couleur violette lorsque la concentration en hCG est égale ou supérieure à 20 mUI/ml. En l'absence d'hCG, aucune bande ne se forme dans la zone d'essai. Le mélange réactionnel continue de s'écouler à travers le dispositif absorbant au-delà des zones d'essai et de contrôle. Le conjugué non lié se lie aux réactifs dans la zone de contrôle, produisant une bande de couleur violette, démontrant que les réactifs et le kit de test fonctionnent correctement.

Collecte et stockage de l'urine

(1) L'urine du premier matin contient généralement la plus forte concentration d'hCG et constitue donc le meilleur échantillon pour effectuer le test d'urine. Cependant, n'importe quel échantillon d'urine peut être utilisé.

(2) Prélever l'échantillon d'urine dans un récipient en verre ou en plastique propre. N'utilisez pas de conservateurs.

(3) Si l'échantillon n'est pas utilisé immédiatement après le prélèvement, mais qu'il doit être utilisé dans les 48 heures, il doit être réfrigéré (2 à 8°C) et ramené à la température ambiante (4 à 30 °C) avant l'essai.

Procédure

1. Retirez la bandelette de test de sa pochette en aluminium.
2. En tenant la bande verticalement, trempez-la soigneusement dans l'échantillon. Ne plongez pas la bande au-delà de la ligne maximale (Figure 1).
3. La bande peut être retirée de l'échantillon lorsque le colorant rouge commence à migrer à travers la fenêtre de résultats.
4. Interprétez les résultats du test au bout de 3 à 5 minutes. N'interprétez pas les résultats du test après 5 minutes.

Interprétation des résultats

(1) NÉGATIF: S'il n'y a qu'une seule bande de couleur violette dans la fenêtre de résultat, cela indique que l'échantillon ne contient pas de niveau détectable d'hCG et doit être interprété comme un résultat négatif (Figure 2).

(2) POSITIF: S'il y a deux bandes de couleur violette dans la fenêtre de résultat, cela indique que l'échantillon contient de l'hCG et doit être interprété comme un résultat positif (Figure 2).

(3) INVALIDE: S'il n'y a pas de bande de couleur violette dans la fenêtre de résultat, le résultat du test n'est pas valide. La bande de contrôle n'apparaîtra pas si un volume insuffisant d'échantillon est ajouté dans le kit d'essai. Il se peut que les procédures appropriées n'aient pas été suivies lors de l'essai ou que la trousse d'essai se soit détériorée. Répétez la procédure de test à l'aide d'un nouveau kit de test.

Limites de la procédure

1. En plus de la grossesse, l'hCG a été trouvée chez des patientes atteintes de maladies trophoblastiques en gestation et en dehors de la gestation. Ces conditions doivent être exclues lors de l'interprétation des niveaux d'hCG pour établir un diagnostic de grossesse.
2. Bien que le test soit très précis pour détecter la grossesse, une faible incidence de faux résultats peut survenir. D'autres tests cliniquement disponibles sont nécessaires si des résultats douteux sont obtenus. Consultez un médecin si des résultats inattendus ou incohérents sont obtenus.
3. Une grossesse normale ne peut pas être distinguée d'une grossesse extra-utérine basée uniquement sur les niveaux d'hCG. De plus, une fausse couche spontanée peut causer de la confusion dans l'interprétation des résultats des tests.
4. Comme pour tous les tests diagnostiques, un diagnostic clinique définitif ne doit pas être basé sur les résultats d'un seul test, mais ne doit être posé par le médecin qu'après l'évaluation de tous les résultats cliniques et de laboratoire.
5. Un résultat négatif obtenu à partir d'un échantillon d'urine prélevé sur une mère en très début de grossesse peut être dû à une concentration extrêmement faible d'hCG. Dans ce cas, l'essai doit être répété sur un échantillon frais obtenu deux jours plus tard.
6. Si un échantillon d'urine est trop dilué, il peut ne pas contenir une concentration urinaire représentative de hCG. Si un résultat négatif est obtenu avec un échantillon de faible densité et qu'une grossesse est toujours suspectée, prélevez un premier échantillon d'urine le matin et refaites le test.

Valeurs normales

- < 5 mUI/ml: hommes en bonne santé ou femmes non enceintes.

On estime que les taux d'hCG dans l'urine pendant la grossesse sont les suivants:

- 10 - 30 mUI/ml: 7 à 10 jours après la conception.- 37 000 - 50 000 mUI/ml: 8 à 11 semaines après les dernières règles.

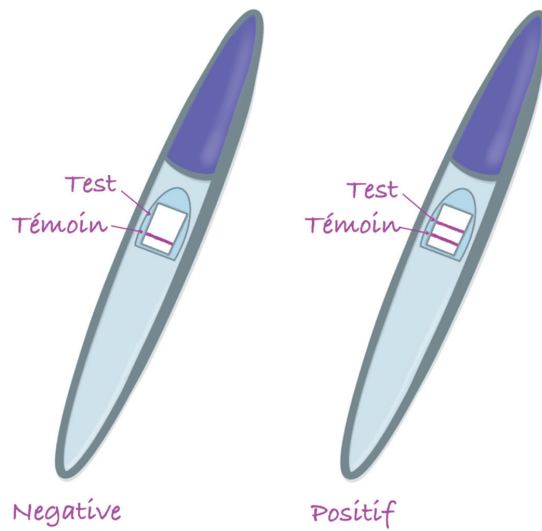


Figure 2. Test de grossesse urinaire

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L11. INVESTIGATION DE LA FONCTION RÉNALE. DOSAGE DE LA CYSTATINE C

OBJECTIFS D'APPRENTISSAGE

Identifier les principaux marqueurs de laboratoire utilisés pour évaluer la fonction rénale: urée, créatinine et cystatine C.

Expliquez les avantages de la cystatine C en tant que marqueur du débit de filtration glomérulaire (DFG) par rapport à la créatinine.

Calculez et interprétez la clairance de la créatinine comme une estimation du DFG.

Interprétez les résultats des tests de fonction rénale dans le contexte de la maladie rénale aiguë et chronique.

POINTS CLÉS

Le débit de filtration glomérulaire (DFG) est l'indice principal de la fonction rénale;

La créatinine sérique est le marqueur rénal le plus utilisé, mais son niveau est influencé par la masse musculaire, l'alimentation et la sécrétion tubulaire, ce qui réduit sa fiabilité en cas de la maladie rénale chronique (MRC) précoce.

La cystatine C est librement filtrée au niveau du glomérule et est complètement réabsorbée et catabolisée par le tubule proximal; elle n'est pas sécrétée, ce qui en fait un marqueur de DFG plus fiable que la créatinine.

La combinaison de la cystatine C sérique et des équations basées sur la créatinine fournit l'estimation la plus précise du DFG et est recommandée pour la stadification de la MRC.

ASPECTS GÉNÉRAUX

Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein. Les principales fonctions des reins comprennent:

- Régulation de l'équilibre hydrique, électrolytique et acido-basique
- Excrétion des produits résultant du métabolisme des protéines et des acides nucléiques (par exemple, l'urée, la créatinine et l'acide urique).

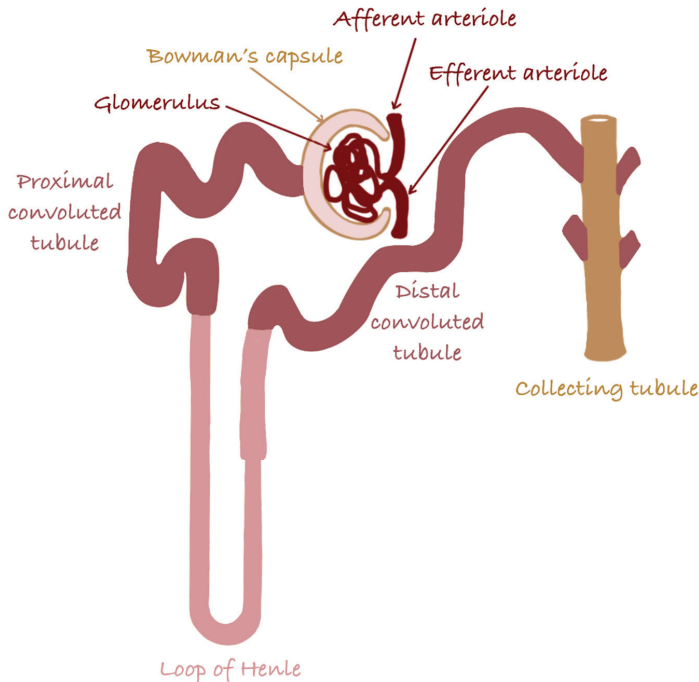


Figure 1. Le néphron

Les reins fonctionnent également comme des organes endocriniens, synthétisant diverses hormones et étant régulés par d'autres hormones. L'arginine-vasopressine (AVP) joue un rôle dans le maintien de l'équilibre hydrique, tandis que l'aldostérone influence la réabsorption du sodium dans le néphron. L'hormone parathyroïdienne facilite la réabsorption du calcium dans les tubules, l'excrétion du phosphate et la synthèse du 1,25-dihydrocholécalférol (la forme active de la vitamine D). La rénine, produite par les cellules juxtaglomérulaires, stimule la formation d'angiotensine I, ce qui conduit finalement à la production d'aldostérone. L'érythropoïétine est également formée et stimule la synthèse des globules rouges.

La fonction rénale sera discutée en termes de fonction glomérulaire et tubulaire.

FONCTION GLOMÉRULAIRE

Urée

L'azote uréique du sang a été la première substance endogène mesurée dans le sérum ou le plasma pour évaluer la fonction rénale. C'est un sous-produit majeur du métabolisme des protéines, et 90 % de l'urée est éliminée par les reins. L'urée est filtrée librement par le glomérule et non sécrétée par les tubules. Une grande partie (40 à 70 %) est réabsorbée passivement à partir des tubules rénaux; ainsi, sa concentration sous-estime le débit de filtration glomérulaire (DFG) dans les contextes de perfusion rénale diminuée, car une partie de l'urée filtrée retournera dans la circulation sanguine. Sa concentration dans le sang peut varier en fonction de l'alimentation, de la fonction hépatique et de nombreux états pathologiques.

Créatinine sérique

La filtration du plasma au niveau des glomérules représente la première étape de la formation de l'urine. Le DFG peut s'expliquer comme le volume de plasma à partir duquel une substance donnée est complètement éliminée par filtration glomérulaire par unité de temps. Chez un adulte en bonne santé, cela est d'environ 140 ml / min, mais peut fluctuer énormément avec la taille du corps, donc est généralement normalisé. En règle générale, elle est corrigée à une surface corporelle de 1,73 m² (les unités sont donc mL/min/1,73 m²). Traditionnellement, la créatinine sérique a été utilisée comme une mesure accessible de la fonction glomérulaire.

La créatine est produite dans le foie et les reins à partir de l'arginine et de la glycine et transportée vers les muscles squelettiques et le cerveau où elle est transformée en un composé macroergique (créatine phosphate). Quotidiennement, dans les muscles, la créatine phosphate se déshydrate spontanément, de manière non enzymatique en créatinine dans une proportion de 1 à 2 %. La quantité totale de créatinine produite quotidiennement dépend de la masse musculaire.

La créatinine circule dans le plasma sans se lier aux protéines, est librement filtrée et excrétée dans l'urine sans réabsorption. Une petite partie (moins de 10 %) de la créatinine urinaire est sécrétée par voie tubulaire.

La créatinine sérique n'est pas un marqueur très sensible de la fonction rénale, car sa concentration reste généralement dans la plage de référence jusqu'à ce que le DFG ait diminué de plus de 50 %. Par conséquent, la détection d'une augmentation progressive des valeurs de créatinine sérique chez le même individu, même lorsque les résultats restent dans l'intervalle normal, peut être un indicateur précoce du déclin de la fonction rénale. Chez les individus en bonne santé, les variations physiologiques des niveaux de créatinine au fil du temps sont beaucoup plus faibles que la largeur de l'intervalle de référence, ce qui rend ces tendances cliniquement significatives.

Plusieurs facteurs extrarénaux peuvent également influencer les taux de créatinine sérique, notamment la masse musculaire, l'apport alimentaire et l'activité physique. Par conséquent, les hommes ont généralement des valeurs plus élevées que les femmes en raison de leur masse musculaire plus importante; Les personnes âgées ont un taux de créatinine plus faible que celui des personnes plus jeunes. L'alimentation peut également jouer un rôle: un repas riche en viande peut augmenter transitoirement les concentrations de créatinine sérique jusqu'à 30 % en raison de l'absorption directe de la créatinine de la viande ingérée. De même, des élévations à court terme peuvent être observées après un exercice physique intense.

Clairance de la créatinine

La clairance de la créatinine est définie comme le volume de plasma (exprimé en millilitres) à partir duquel la créatinine est complètement éliminée par les reins chaque minute. Pour tenir compte des différences de taille corporelle, le résultat est généralement normalisé à une surface corporelle standard, calculée à partir du poids et de la taille du patient. Étant donné que la créatinine est filtrée au niveau du glomérule avec une réabsorption tubulaire minimale, cette mesure est largement utilisée comme estimation du débit de filtration glomérulaire (DFG). Il est particulièrement utile chez les patients atteints d'une maladie rénale suspectée ou établie, ou chez ceux qui reçoivent des médicaments ayant des effets néphrotoxiques potentiels, tels que certains antibiotiques. Pour une détermination précise, le test nécessite une collecte d'urine de 24 heures, ainsi qu'un échantillon de sang pour mesurer la créatinine sérique. Calcul de la clairance:

$$C_{cr}(ml/min) = \frac{U \times V}{P \times 1440}$$

où: U = concentration de créatinine dans l'urine (mg / ml)

V = volume d'urine (ml en 24 heures)

P = concentration de créatinine dans le sérum (ou le plasma) (mg/ml)

1440 = minutes en 24 heures

Bien que la clairance de la créatinine soit plus sensible que la créatinine sérique pour détecter un DFG réduit, la méthode est peu pratique pour les patients, sujette à l'imprécision, et a été largement remplacée par des équations de prédiction qui estiment le DFG.

DFG estimé (DFGe)

La relation inverse relativement faible entre la créatinine sérique et le DFG peut être améliorée en tenant compte de divers facteurs de confusion tels que l'âge, le sexe, l'origine ethnique et le poids corporel. L'équation créée par Cockcroft et Gault dans les années 1970, ainsi que la formule à quatre variables développées plus tard à partir de l'étude sur la modification du régime alimentaire dans les maladies rénales (MDRD), sont les plus couramment utilisées comme formules de prédiction.

Bien que les équations de prédiction représentent une amélioration de la créatinine sérique et de la clairance de la créatinine, elles ne fournissent toujours que des estimations du DFG et doivent être interprétées avec prudence. Par exemple, ils ont tendance à être moins précis chez les personnes ayant des niveaux de DFG relativement normaux. C'est pourquoi de nombreux laboratoires hospitaliers s'abstiennent de communiquer un résultat spécifique lorsque le DFG dépasse 60 mL/min/1,73 m². D'autres groupes de patients chez lesquels le DFGe peut être moins fiable comprennent ceux qui ont des formes ou des masses corporelles atypiques, comme les personnes souffrant d'atrophie musculaire ou les amputés. Enfin, la recherche indique que le DFG estimé par la formule MDRD peut être influencé par la consommation de viande.

Il est important de replacer les limites du DFGe examinées dans la section précédente dans le bon contexte. Par exemple, la formule MDRD à quatre variables fournit une estimation plus précise du DFG que l'utilisation de la créatinine sérique seule, car elle tient compte de divers facteurs de confusion. La formule de Cockcroft-Gault nécessite du poids en plus de l'âge, du sexe et de la créatinine pour être utilisée. Par conséquent, la formule MDRD, qui comprend l'âge, le sexe et l'origine ethnique mais exclut le poids, est beaucoup plus simple à appliquer. C'est l'une des principales raisons de l'utilisation généralisée de l'équation MDRD. Néanmoins, la formule de Cockcroft-Gault continue d'être couramment utilisée pour calculer les doses de médicaments.

Cystatine C

La cystatine C est une protéine de faible poids moléculaire produite par des cellules nucléées. Il s'agit d'un inhibiteur de la cystéine protéinase. Il est librement filtré par le glomérule, réabsorbé et catabolisé par le tubule proximal. Produit à un rythme constant, les niveaux restent stables si la fonction rénale est normale.

La cystatine C, comme la créatinine, est inversement corrélée au DFG. Cependant, contrairement à la créatinine, la concentration de cystatine C est indépendante du poids et de la taille, de la masse musculaire, de l'âge (>1 an) ou du sexe et n'est en grande partie pas affectée par la consommation de viande ou d'aliments ne contenant pas de viande.

La cystatine C a récemment été proposée comme nouveau marqueur sérique endogène sensible pour le débit de filtration glomérulaire. Lorsque la vitesse à laquelle le filtrat liquide se forme est réduite, ce qui indique une diminution de la fonction rénale, les taux sanguins de substances éliminées par eux (telles que la cystatine C) augmentent et sont une indication de la fonction rénale. Une augmentation de la cystatine C est souvent détectable avant qu'il n'y ait une diminution mesurable du DFG ou une augmentation de la créatinine.

La cystatine C peut être utilisée comme alternative à la créatinine et à la clairance de la créatinine pour dépister et surveiller le dysfonctionnement rénal. Bien qu'il existe de plus en plus de données et de littérature à l'appui de l'utilisation de la cystatine C, il existe encore une certaine incertitude quant au moment et à la façon dont elle devrait être utilisée. Il peut être particulièrement utile dans les cas où la mesure de la créatinine n'est pas appropriée, comme chez les patients atteints de cirrhose, d'obésité ou de malnutrition ou qui ont une masse musculaire réduite. En plus de la dysfonction rénale, il a été associé à un risque accru de maladie cardiovasculaire et d'insuffisance cardiaque chez les personnes âgées. Elle peut être mesurée par des méthodes d'immunoessai.

Plusieurs **autres marqueurs** peuvent être utilisés pour évaluer la clairance, mais ils sont souvent trop coûteux et nécessitent trop de main-d'œuvre pour une utilisation généralisée: leur application est principalement confinée à la recherche ou à des environnements de néphrologie spécialisés, tels que l'évaluation de donneurs de rein potentiels. Ces marqueurs comprennent l'inuline, l'iothalamate, l'iohexol et les marqueurs radio-isotopiques comme le ⁵¹Cr-EDTA. Ce dernier est fréquemment utilisé dans les services d'oncologie pédiatrique pour évaluer la fonction rénale avant de déterminer les doses de chimiothérapie.

Protéinurie

La protéinurie peut être classée en: protéinurie glomérulaire, protéinurie tubulaire, protéinurie par débordement, protéinurie de Tamm-Horsfall. En ce qui concerne la fonction glomérulaire, nous incluons la protéinurie glomérulaire; Ceci est présenté séparément dans Analyse biochimique de l'urine (TP 4).

Note ! Le taux de filtration glomérulaire, comme les taux cardiaques et respiratoires, fluctue tout au long de la journée. Une modification du DFG allant jusqu'à 20 % entre deux clairances consécutives de la créatinine peut ne pas indiquer de véritable modification de la fonction rénale.

FONCTION TUBULAIRE RÉNALE

Les glomérules jouent un rôle crucial dans le filtrage efficace des déchets et des toxines du corps. Pour prévenir la perte de substances essentielles telles que l'eau, le sodium, le glucose et les acides aminés, la réabsorption tubulaire doit être tout aussi efficace. Par exemple, sur les 180 litres de liquide qui pénètrent quotidiennement dans le filtrat glomérulaire, plus de 99 % sont réabsorbés. Contrairement au débit de filtration glomérulaire (DFG), qui est une mesure standard de la fonction rénale, il n'existe pas de tests simples pour évaluer quantitativement la fonction tubulaire.

Certains troubles de la fonction tubulaire sont héréditaires; par exemple, certaines personnes ne peuvent pas abaisser le pH de leur urine en dessous de 6,5 en raison d'une sécrétion défectueuse d'ions hydrogène. Cependant, les lésions tubulaires rénales sont plus souvent une conséquence secondaire d'autres affections ou blessures. En fait, toute cause d'insuffisance rénale aiguë peut entraîner un dysfonctionnement tubulaire rénal.

Afin d'étudier la fonction tubulaire, certains des tests suivants peuvent être effectués.

Mesures d'osmolalité dans le plasma et l'urine

Les tubules rénaux remplissent un large éventail de fonctions complexes. Cependant, dans la pratique clinique, l'osmolalité urinaire est souvent utilisée comme indicateur général de la fonction tubulaire. En effet, la fonction tubulaire la plus souvent affectée dans la maladie est la capacité de concentrer l'urine. Lorsque les tubules et les canaux collecteurs fonctionnent correctement et que l'hormone antidiurétique (ADH) est présente, ils réabsorbent efficacement l'eau. Cette capacité peut être évaluée en mesurant la concentration d'urine, généralement par osmolalité. L'osmolalité urinaire est ensuite comparée à l'osmolalité plasmatique. Une osmolalité urinaire de 600 mmol/kg ou plus indique généralement une fonction tubulaire intacte. À l'inverse, si l'osmolalité urinaire est similaire à l'osmolalité plasmatique (rapport d'osmolalité urine/plasma ~ 1), cela suggère que les tubules ne réabsorbent pas correctement l'eau.

Le pH de l'urine et le test de charge acide

Les mesures du pH de l'urine peuvent être une première étape utile dans le diagnostic de l'acidose tubulaire rénale (ATR), une affection couramment associée à l'acidose métabolique hyperchlorémique. Le ATR peut être classé comme suit:

- Type I. - Sécrétion d'ions hydrogène défectueuse héréditaire ou acquise dans le tubule distal
- Type II. - Réduction de la capacité de réabsorption du bicarbonate dans le tubule proximal.
- Type III. - Est une variante pédiatrique de l'ATR de type I
- Type IV. - La réabsorption du bicarbonate par le tubule rénal est altérée en raison d'un déficit en aldostérone, de défauts des récepteurs de l'aldostérone ou de médicaments qui inhibent l'action de l'aldostérone.

Pour diagnostiquer l'ATR, la première étape consiste à confirmer la présence d'une acidose métabolique persistante et inexpliquée. Si l'on soupçonne un ATR après avoir écarté d'autres affections, un échantillon d'urine frais doit être analysé pour déterminer le pH, car une analyse retardée peut entraîner des lectures faussement élevées en raison de l'activité bactérienne. Normalement, l'acidose métabolique déclenche une augmentation de l'excrétion d'acide, ce qui entraîne un pH urinaire inférieur à 5,3; Si l'urine n'est pas suffisamment acide, des tests supplémentaires sont nécessaires. Un test de charge acide avec du chlorure d'ammonium peut être utilisé pour évaluer l'acidification de l'urine, mais il doit être évité chez les patients gravement acidotiques ou atteints d'une maladie du foie en raison des effets secondaires potentiels. Au lieu de cela, un test de furosémide est préféré, car il induit une urine acide par des mécanismes d'échange de sodium. Dans les deux tests, l'absence de production d'urine avec un pH inférieur à 5,3 soutient le diagnostic d'ATR.

Protéinurie spécifique

La présence de protéines dans l'urine a déjà été notée comme un signe de fuite des glomérules. La β 2-microglobuline et l' α 1-microglobuline sont de petites protéines qui traversent les glomérules et sont généralement réabsorbées par les cellules tubulaires. Des niveaux élevés de ces protéines dans l'urine servent de marqueur sensible des lésions des cellules tubulaires rénales.

Glycosurie

La présence de glucose dans l'urine malgré une glycémie normale indique généralement un défaut tubulaire qui altère la réabsorption du glucose. Dans ce cas, le seuil rénal (la capacité des tubules à réabsorber le glucose) a été dépassé, conduisant à une affection bénigne connue sous le nom de glycosurie rénale. La glycosurie peut également survenir en même temps que d'autres troubles de la fonction tubulaire, tels que le syndrome de Fanconi, qui se caractérise par des anomalies tubulaires généralisées, notamment l'acidose tubulaire rénale, l'aminocidurie et la protéinurie tubulaire.

Aminocidurie

Les acides aminés du filtrat glomérulaire sont généralement réabsorbés dans les tubules proximaux. Cependant, des quantités excessives peuvent apparaître dans l'urine si leur concentration plasmatique dépasse le seuil rénal ou s'il existe un défaut spécifique de réabsorption tubulaire. Cette déficience peut résulter d'un trouble métabolique héréditaire de cystinurie ou, plus fréquemment, d'une lésion tubulaire rénale acquise.

Défauts tubulaires spécifiques

Le syndrome de Fanconi

Le syndrome de Fanconi fait référence à une affection caractérisée par des anomalies tubulaires généralisées, notamment l'acidose tubulaire rénale, l'aminocidurie et la protéinurie tubulaire. Il peut résulter d'un empoisonnement aux métaux lourds, d'une exposition à des toxines ou de troubles métaboliques héréditaires tels que la cystinose.

Calculs rénaux

Les calculs rénaux (calculs) causent une douleur et une gêne intenses et sont une cause fréquente d'obstruction des voies urinaires. L'analyse chimique de ces pierres est essentielle pour comprendre leur formation. Les principaux types de calculs rénaux comprennent:

- Phosphate de calcium: peut être une conséquence d'une hyperparathyroïdie primitive ou d'une acidose tubulaire rénale.
- Le magnésium, l'ammonium et le phosphate sont souvent associés aux infections des voies urinaires.
- Oxalate: peut être une conséquence de l'hyperoxalurie.
- Acide urique: peut être une conséquence de l'hyperuricémie
- Cystine: rares et ont une caractéristique de la cystinurie (trouble métabolique héréditaire)

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

Dosage de la cystatine C dans le sérum humain à l'aide du test ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Principe du dosage

Dans l'ELISA de cystatine C humaine, les étalons, les contrôles de qualité et les échantillons sont incubés dans des puits de plaque microtitrés pré-enduits d'anticorps polyclonaux anti-cystatine C humaine. Après 30 minutes d'incubation et de lavage, un anticorps polyclonal anti-cystatine C humaine, conjugué à de la peroxydase de raifort (HRP), est ajouté aux puits et incubé pendant 30 minutes avec de la cystatine C capturée. Après une autre étape de lavage, le conjugué HRP restant est autorisé à réagir avec la solution de substrat (TMB). La réaction est arrêtée par l'ajout d'une solution acide et l'absorbance du produit jaune résultant est mesurée. L'absorbance est proportionnelle à la concentration de cystatine C. Une courbe standard est construite en traçant les valeurs d'absorbance par rapport aux concentrations d'étalons de cystatine C, et les concentrations d'échantillons inconnus sont déterminées à l'aide de cette courbe standard.

Procédure d'analyse

1. Pipetez **100 µL** d'échantillons dans les puits appropriés
 2. Incubez la plaque à température ambiante (env. 25 °C) pendant **15 minutes**, en l'agitant à env. 300 tr/min sur un agitateur de microplaques orbital.
 3. Lavez les puits **3 fois** avec la solution de lavage (0,30 ml par puits). Après le lavage final, retournez et tapotez fortement l'assiette contre l'essuie-tout.
 4. Ajoutez **100 µL** de solution conjuguée dans chaque puits.
 5. Incubez la plaque à température ambiante (env. 25 °C) pendant **15 minutes**, en l'agitant à env. 300 tr/min sur un agitateur de microplaques orbital. L'incubation sans agitation est une alternative qui nécessite une incubation prolongée avec substrat – voir l'étape 8 ci-dessous.
 6. Lavez les puits **3 fois** avec la solution de lavage (0,35 ml par puits). Après le lavage final, retournez et tapotez fortement l'assiette contre l'essuie-tout.
 7. Ajoutez **100 µL** de solution de substrat dans chaque puits. Évitez d'exposer la plaque de microtitration à la lumière directe du soleil. Il est recommandé de recouvrir la plaque avec, par exemple, une feuille d'aluminium.
 8. Incubez la plaque pendant **10 minutes** à température ambiante. La durée d'incubation peut être prolongée (jusqu'à 20 minutes) si la température de réaction est inférieure à 20 °C. Ne pas secouer avec la plaque pendant l'incubation.
 9. Arrêtez le développement de la couleur en ajoutant **100 µL** de solution d'arrêt.
 10. Déterminez l'absorbance de chaque puits à l'aide d'un lecteur de microplaques réglé à 450 nm, de préférence avec la longueur d'onde de référence réglée à 630 nm (plage acceptable: 550 - 650 nm).
- L'absorbance doit être lue dans les 5 minutes suivant l'étape 9.**

Valeurs normales:

Enfants:

0-3 mois: 0,81-2,32 mg/L

4-11 mois: 0,65-1,49 mg/L

1-17 ans: 0,5-1,27 mg/L

Adultes: 0,49-1,13 mg/L

ÉTUDE DE CAS

1. Patient: **GH**, sexe: **F**, **75 ans**.

Le patient présente les symptômes suivants: anorexie, mictions fréquentes (petites quantités surtout la nuit), dysurie, hypertension. Le médecin recommande d'effectuer l'analyse ci-dessous. Établissez un diagnostic éventuel.

Examen biochimique du sang

Dénomination	Résultat	Plage de référence	Dénomination	Résultat	Plage de référence
Glycémie à jeun	80 mg/dl	75 à 115 mg/dl	Bilirubine directe	0,2 mg/dl	<0,2 mg/dl
HbA1c	5 %	4-6 %	Bilirubine totale	0,9 mg/dl	<1 mg/dl
L'ALAT	15 U/l	F: 10-22 U/l M: 10-29 U / l	Protéines totales	5,0 g/dl	6,2 à 8 g/dl
ASAT	19 U/l	F: 10-21 U/l M: 10-25 U / l	Hémoglobine	8,5 g/dl	F: 12-16 g/dl M: 14-18 g/dl
Urée	149 mg/dl	15 à 45 mg/dl	hsCRP	19 mg/l	<1 mg/l de risque CV faible 1-3 mg/l risque CV moyen >3mg/l de risque CV élevé
Créatinine	4,3 mg/dl	F<0,9 mg/dl M<1,1 mg/dl	cTnI	0,06 ng/ml	0,01 à 0,40 ng/ml
Clairance de la créatinine	9 ml/min	95 à 150 ml/min	Cystatine C	6,99 mg/l	0,49 à 1,13 mg/l
Acide urique	15 mg/dl	F: 2,5-7 mg/dl M: 3-9 mg/dl	Réserve alcaline	12 mEq/l	22 à 27 mEq/l
Amylase	89 U/l	50 à 100 U/l	Na+	120 mEq/l	135 à 145 mEq/l
Cholestérol total	189 mg/dl	140- 200 mg/dl	K+	7,3 mEq/l	3,8 à 5,4 mEq/l
Cholestérol HDL	45 mg/dl	F:45-65 mg/dl M: 35 à 55 mg/dl	TSH	3,1 mU/ml	0,27 à 4,20 µUI/ml
Triacylglycérols	130 mg/dl	F: 40-140 mg/dl M:60-165mg/dl	ft3	2,9 pg/ml	2,2 à 5,5 pg/ml
La LDH	155 U/l	F:135-215 U/l M: 135-225 U / l	ft4	1,8 ng/dl	0,7 à 2,2 ng/dl
CKMB	9 U/l	2-10 U/l	GGT	20 U/l	F: 5-40 U/l M: 8-61 U/l
			Phosphatase alcaline	135 U/l	F: <240 U/l M:<270 U/l

Examen biochimique de l'urine

Dénomination	Résultat	Plage de référence
Densité	1.002	1.015- 1.025
pH	7.0	6.5
Protéine	+++ (1000mg/dl)	Négatif
Glucose	Négatif	Négatif
Corps cétoniques	Négatif	Négatif
UBG	Normal	Normal
Bilirubine	Négatif	Négatif
Nitrites	+	Négatif
Leucocytes	+++ (500/µl)	Négatif
Globules rouges	++ (50/µl)	Négatif

2. Patient: EF, sexe: F, 65 ans.

Le patient présente les symptômes suivants: surpoids, frissons, douleur et gonflement de l'articulation interphalangienne distale, démangeaisons cutanées (prurit), dysurie, douleur hypogastrique. Le médecin recommande d'effectuer l'analyse ci-dessous. Établissez un diagnostic éventuel.

Examen biochimique du sang

Dénomination	Résultat	Plage de référence	Dénomination	Résultat	Plage de référence
Glycémie à jeun	81 mg/dl	75 à 115 mg/dl	Bilirubine directe	0,2 mg/dl	<0,2 mg/dl
HbA1c	4.9 %	4-6 %	Bilirubine totale	0,9 mg/dl	<1 mg/dl
L'ALAT	19 U/l	F: 10-22 U/l M: 10-29 U / l	Protéines totales	7,2 g/dl	6,2 à 8 g/dl
ASAT	22 U/l	F: 10-21 U/l M: 10-25 U / l	Hémoglobine	12,9 g/dl	F: 12-16 g/dl M: 14-18 g/dl
Urée	39 mg/dl	15 à 45 mg/dl	hsCRP	12,0 mg/l	<1 mg/l de risque CV faible 1-3 mg/l risque CV moyen >3mg/l de risque CV élevé
Créatinine	1,0 mg/dl	F<0,9 mg/dl M<1,1 mg/dl	cTnI	0,08 ng/ml	0,01 à 0,40 ng/ml
Clairance de la créatinine	100 ml/min	95 à 150 ml/min	Cystatine C	1,0 mg/l	0,49 à 1,13 mg/l
Acide urique	12 mg/dl	F: 2,5-7 mg/dl M: 3-9 mg/dl	Réserve alcaline	26 mEq/l	22 à 27 mEq/l
Amylase	89 U/l	50 à 100 U/l	Na+	144 mEq/l	135 à 145 mEq/l
Cholestérol total	310 mg/dl	140- 200 mg/dl	K+	4,5 mEq/l	3,8 à 5,4 mEq/l
Cholestérol HDL	20 mg/dl	F:45-65 mg/dl M: 35 à 55 mg/dl	TSH	3,1 mU/ml	0,27 à 4,20 µUI/ml
Triacylglycérols	380 mg/dl	F: 40-140 mg/dl M:60-165mg/dl	fT3	2,9 pg/ml	2,2 à 5,5 pg/ml
La LDH	203 U/l	F:135-215 U/l M: 135-225 U / l	fT4	1,8 ng/dl	0,7 à 2,2 ng/dl
CKMB	9 U/l	2-10 U/l	GGT	10 U/l	F: 5-40 U/l M: 8-61 U/l
			Phosphatase alcaline	146 U/l	F: <240 U/l M:<270 U/l

Examen biochimique de l'urine

Dénomination	Résultat	Plage de référence
Densité	1.025	1.015- 1.025
pH	8.0	6.5
Protéine	Négatif	Négatif
Glucose	Négatif	Négatif
Corps cétoniques	Négatif	Négatif
UBG	Normal	Normal
Bilirubine	Négatif	Négatif
Nitrites	+	Négatif
Leucocytes	++(75/µl)	Négatif
Globules rouges	Négatif	Négatif

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L12. ENZYMOLOGIE CLINIQUE. DÉTERMINATION CINÉTIQUE DE CK-MB DANS LE SÉRUM

OBJECTIFS D'APPRENTISSAGE

Expliquez le principe de détermination de l'activité enzymatique cinétique.

Décrivez la signification clinique de la CK-MB en tant que biomarqueur cardiaque spécifique dans le diagnostic d'infarctus du myocarde.

Comprenez la relation entre l'activité du CK-MB, la masse du CK-MB et leurs fenêtres temporelles de diagnostic respectives.

Effectuez et calculez la détermination cinétique de l'activité CK-MB dans le sérum.

POINTS CLÉS

Les tests enzymatiques cinétiques mesurent la vitesse de consommation de substrat ou de formation de produit au fil du temps, rapportant l'activité enzymatique dans U/L ou nkat/L.

CK (créatine kinase) existe sous la forme de trois isoenzymes: CK-MM (principalement dans le muscle squelettique), CK-MB (myocarde et muscle squelettique) et CK-BB (cerveau).

Le CK-MB augmente 4 à 6 heures après l'infarctus du myocarde, atteint un pic entre 12 et 24 heures et revient à la normale dans les 48 à 72 heures; Il est utilisé pour détecter un réinfarctus après l'élévation de la troponine.

Un rapport CK-MB/CK total > 5 % suggère fortement une origine myocardique; La masse CK-MB (immunodosage) est plus sensible que l'activité CK-MB pour un diagnostic précoce de AMI.

LES ENZYMES SÉRIQUES DANS LA MALADIE

Les enzymes sont évaluées à la fois en termes d'activité et de masse à l'aide de techniques immunochimiques. Les enzymes peuvent être divisées en deux groupes. Certains, tels que les enzymes en cascade de coagulation, ont une fonction définie dans le sang. D'autres émergent accidentellement dans le sang, et leur mesure est utile pour le diagnostic. Les dommages aux tissus d'origine, ou la prolifération des cellules d'où proviennent ces enzymes, entraîneront une augmentation de leur activité dans le plasma. Il convient de noter que l'augmentation de l'activité enzymatique sérique n'est qu'à peu près proportionnelle au degré de lésion tissulaire.

Il a été démontré que les enzymes suivantes ont une valeur diagnostique:

- Alanine aminotransférase (ALT): un indicateur de lésions hépatocellulaires.
- Aspartate aminotransférase (AST): un indicateur de lésions hépatocellulaires ou un marqueur de lésions musculaires/myocardique
- Créatine kinase (CK): un marqueur des lésions musculaires et de l'IM aigu.
- Phosphatase alcaline (ALP): augmentation de la maladie hépatique cholestatique et marqueur de l'activité des ostéoblastes dans la maladie osseuse.
- Phosphatase acide (ACP): augmentation de l'activité du cancer de la prostate et des ostéoclastes
- γ -Glutamyl transpeptidase: un marqueur sensible mais non spécifique de la maladie du foie.
- L'amylase: un indicateur de lésions cellulaires dans la pancréatite aiguë.
- Lipase: un indicateur de lésions cellulaires dans la pancréatite aiguë.
- Lactate déshydrogénase (LDH): enzyme non spécifique, augmentation des lésions tissulaires
- Cholinestérase: normalement impliquée dans la conduction neuromusculaire, décompose accidentellement le suxaméthonium (succinyl-choline), un médicament relaxant musculaire utilisé en anesthésie. Les patients présentant un cholinestérase anormal peuvent être incapables de métaboliser le médicament normalement et, par conséquent, souffrir d'une paralysie prolongée après l'anesthésie. Cette condition est appelée apnée scoline. Les déterminations du cholinestérase sont également utiles dans le diagnostic de l'intoxication par des pesticides qui inhibent le cholinestérase.

Dosage des isoenzymes

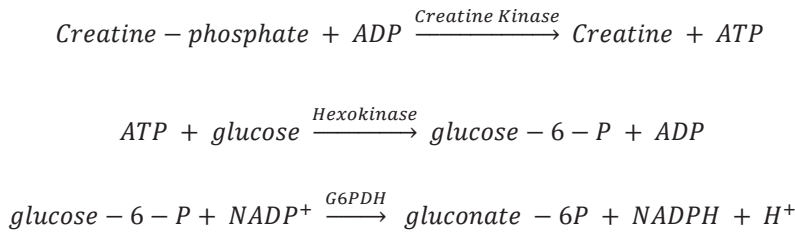
Certaines enzymes sont présentes dans le plasma sous deux ou plusieurs formes moléculaires. Ces formes sont appelées isoenzymes et, malgré leurs structures distinctes, elles remplissent le même rôle catalytique. Diverses isoenzymes peuvent provenir de tissus distincts, et leur identification spécifique peut fournir des informations sur l'emplacement de la maladie. Une isoenzyme spécifique de la créatine kinase (CK-MB) est bénéfique pour l'identification précoce de l'infarctus du myocarde. Le muscle cardiaque a une proportion plus élevée de cette isoenzyme par rapport au muscle squelettique, et des taux élevés de CK-MB suggèrent qu'un infarctus du myocarde a eu lieu.

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

Détermination de l'activité de CK-MB dans le sérum

Principe

Les anticorps, qui sont incorporés au réactif enzymatique, se lient à la sous-unité M de CK-MB et l'inhibent. L'activité restante de la sous-unité B est mesurée selon la réaction suivante:



G6PDH= Glucose-6-phosphate déshydrogénase

En multipliant les valeurs de l'activité par le facteur 2, on obtiendra l'activité de CK-MB dans le sérum.

Réactifs

1. Tampon réactif R1: (imidazole 100 mM (pH = 6,7), glucose 20 mM, Mg-acétate 10 mM)
2. Réactif R2 (réactif enzyme/anticorps): 5 mM ADP, 5 mM AMP, 10 µM diadénosine-P-5P, 2 mM NADP, 30 mM de créatine phosphate, 2500 U/L d'hexokinase, 1500 U/L de G-6-PDH, 20 mM de N-acétylcystéine et anticorps contre CK-MB

Préparation du réactif de travail: Dissoudre le contenu du réactif enzymatique R2 avec le volume correspondant de tampon R1. Agitez doucement jusqu'à dissoudre complètement les réactifs. Ne secouez pas !

Procédure

Pipeter dans le tube à essai comme suit:

Réactifs, µl	Échantillon
Réactif de travail	1000
Sérum	40

Incuber les tubes pendant 7 minutes à température ambiante et lire l'absorbance de l'échantillon à $\lambda = 340 \text{ nm}$, en mettant le spectrophotomètre à zéro avec de l'air ou de l'eau distillée (A1). Attendre 5 min et relire l'absorbance de l'échantillon à $\lambda = 340 \text{ nm}$, en mettant le spectrophotomètre à zéro avec de l'air ou de l'eau distillée (A2). Calculer $\Delta A = A2 - A1$

Calcul

Calculez ΔA , puis l'activité de CK-MB est calculée avec la formule:

$$\text{Activité CK - MB} = \Delta A \times 1651 \text{ (U/L)}$$

Une atteinte myocardique est indiquée lorsque les 3 facteurs suivants sont présents:

- CK hommes > 80 U/L,
- CK femme > 70 U/L et
- CK-MB > 10 U/L et le
- Activité CK-MB entre 6 % et 25 % de l'activité CK-total.

Modifications pathologiques

- *Augmentations importantes*: infarctus du myocarde, dermatomyosites, dystrophie musculaire progressive, rhabdomyolyse, myoglobulinurie.
- *Augmentations modérées*: après des arrêts intramusculaires, une hypothyroïdie.
- *Après certains médicaments*: les statines peuvent provoquer une élévation des taux de CK-MB, souvent modérée, indiquant une atteinte musculaire légère.

Facteurs d'erreur possibles dans la quantification enzymatique de la nécrose:

- Le grade de perfusion locale: la zone centrale de nécrose non perfusée ne libère pas l'enzyme, de sorte que les nécroses massives et compactes sont sous-estimées.
- La vitesse de dégradation des enzymes, dans le tissu nécrotique et dans la circulation.
- La vitesse d'élimination rénale de l'enzyme.
- L'apparition de la reperfusion myocardique: le flux de reperfusion envoie en circulation une quantité élevée d'enzymes et mime une nécrose étendue, mais réduit, de l'autre côté, par oxygénation, des masses de tissu nécrotique.

Parmi les conditions qui peuvent affecter la spécificité CK-MB pour l'infarctus aigu du myocarde et qui peuvent influencer le diagnostic, il y a:

- L'augmentation modérée de CK-MB, parfois observée après un effort physique sévère, en particulier chez les athlètes de performance.
- Augmentation limite possible de CK-MB dans l'angine instable, en l'absence d'une certaine cardiomyocyte lyses.

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour des notes manuscrites pendant la séance pratique.

RÉFÉRENCES

1. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto Jr. GJ, Stryer L, Biochemistry, 9th Edition, 2019.
2. Murphy M, Srivastava R, Deans K. Clinical Biochemistry-E-Book: An Illustrated Colour Text. Elsevier Health Sciences; 2023.
3. Devlin TM, editor. Textbook of biochemistry with clinical correlations. John Wiley & Sons; 2010.
4. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. Clinical Chemistry: Techniques, Principles, and Correlations. The Netherlands: Wolters Kluwer; 2018.
5. Meisenberg G, Simmons WH. Principles of Medical Biochemistry E-Book: Principles of Medical Biochemistry E-Book. Elsevier Health Sciences; 2016.
6. Ciaccio M, editor. Clinical and laboratory medicine textbook. Springer Nature; 2024.
7. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2017.
8. Abali EE, Carman R, Spicer DB. Biochemistry Behind the Symptoms. 1st ed. Wolters Kluwer Health; 2023.
9. Lee M, editor. Basic skills in interpreting laboratory data. 6th ed. American Society of Health-System Pharmacists; 2017.
10. Murphy M, Srivastava R, Deans K. Clinical biochemistry: an illustrated colour text. 7th ed. Elsevier; 2023.
11. Ahmed N, editor. Clinical biochemistry. 3rd ed. Oxford University Press (Fundamentals of Biomedical Science); 2025.
12. Marshall WJ, Lapsley M, Day AP, Ayling RM. Clinical biochemistry: metabolic and clinical aspects. 3rd ed. Elsevier; 2014.
13. Bhagavan NV, Ha CE. Essentials of medical biochemistry. With Clinical Cases, Second edition Academic Press, London, UK. 2015.
14. Rajdl D. Clinical Biochemistry. Charles University in Prague, Karolinum Press; 2016.
15. Hegyi G, Kardos J, Kovács M, Málnási-Csizmadia A, Nyitray L, Pál G, Radnai L, Reményi A, Venekei I. Introduction to practical biochemistry. Eötvös Loránd University, 2013.
16. Koolman J., Roehm K.H. Color atlas of biochemistry. New York; Thieme, 2005.
17. Gisterå A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. Nature reviews nephrology. 2017.
18. Viswanathan J, Govindasamy G. Biosensors and its transducers. In Biomedical engineering and its applications in healthcare, Singapore: Springer Singapore, 2019.
19. De Sibio MT, de Oliveira M, Moretto FC, Olimpio RM, Conde SJ, Luvizon AC, Nogueira CR. Triiodothyronine and breast cancer. World Journal of Clinical Oncology. 2014.
20. Marian C, Anghel A, Şeclăman E, Kaycsa A, Sîrbu IO, Tămaş L, Biochemistry of Metabolism for medical students, Victor Babeş Publishing House, 2016.
21. Anghel A, Tămaş L, Şeclăman E, Metabolic biochemistry with clinical applications, Eurostampa Publishing House, 2017.
22. Anghel A, Şeclăman E, Tămaş L, Motoc M, Şişu E, Kaycsa A, David D, Sîrbu IO, Marian C, Samoilă C, Grecu D, Sfrijan F, Georgescu A, Marcu A, Buzatu R, Bonţe D, Gurban C, Alexa A, Bujor G, Mărieş L, Mihala A, Sala-Cârtoag M, Practical works of medical chemistry and biochemistry for medical students, Victor Babeş Publishing House, 2019.]