

CAHIER DE

Formation

Biologie médicale

N° 05

juillet 96

HORMONOLOGIE
GAZOMÉTRIE





Cher confrère,

BIOFORMA a le plaisir de vous faire parvenir le numéro 5 des Cahiers de Formation de Biologie médicale

En liaison avec la Direction des Contrôles et des Laboratoires de l'Agence du Médicament, ce cahier fait suite à deux contrôles de qualité nationaux portant sur l'hormonologie et la gazométrie

Nous espérons que ce document vous apportera des informations substantielles de mise à jour de vos connaissances dans ces deux domaines et qu'ils vous aideront dans votre pratique quotidienne.

Nous vous en souhaitons une bonne réception et vous prions d'agréer, Cher Confrère, nos confraternelles et cordiales salutations.

Adrien BEDOSSA

Président
Laboratoires

Professeur Christian JANOT
Directeur Division des

et des Contrôles.
Agence du Médicament.

H O R M O N O L O G I E e t M A R Q U E U R S T U M O R A U X

EDITORIAL 5

LISTE DES AUTEURS 7

IMMUNODOSAGES DES HORMONES STEROIDIENNES

R. Cohen, H. Dechaud 9

ANTIGENE CARBOHYDRATE 15-3 (CA 15-3)

A. Beaudonnet, R. Cohen 35

ANTIGENE CARBOHYDRATE 125 (CA 125)

A. Beaudonnet, R. Cohen 45

G A Z O M E T R I E

PHYSIOLOGIE DE L'EQUILIBRE ACIDE BASE

A. Feuillu 57

CAUSES D'ERREURS DANS LA DETERMINATION DE LA GAZOMETRIE SANGUINE

A. Feuillu 63

CO-OXYMETRIE ET FORMES USUELLES D'HEMOGLOBINE

J.-F. Mollard 67

CAHIER DE

Formation

Biologie médicale



Ceci est la VERSION NUMERIQUE des CAHIERS BIOFORMA déjà parus et distribués à l'ensemble des LABORATOIRES D'ANALYSES de BIOLOGIE MEDICALE en FRANCE.

]

TOUT LE CONTENU DE CE FICHER RESTE LA PROPRIETE DE BIOFORMA.
LES DROITS D'AUTEURS SONT PROTEGES A LA B.N.F.

]

Toute reproduction, toute utilisation, partielle ou totale, des textes, schémas et photos de cet ouvrage, sans l'autorisation écrite de BIOFORMA, seront poursuivies devant les tribunaux compétents.

]

Seule une impression pour une copie personnelle (étudiant, interne, biologiste de labm) est permise.



BIOFORMA

HORMONOLOGIE

et

MARQUEURS TUMORAUX

Les pages qui suivent ont été écrites à l'occasion de la douzième opération de Contrôle National en immunoanalyse (décembre 1994). Il s'agissait de la seconde opération de l'année et de la première entièrement organisée par l'Agence du Médicament. Le financement en a été partiellement assuré par Bioforma.

Les sujets traités ont été choisis pour compléter ceux abordés dans le Cahier de Formation N° 02 (mai 95) consacré à l'immunoanalyse (hormones, marqueurs tumoraux).

Après les problèmes posés par les immunodosages d'hormones glycoprotéiques (hCG, TSH), nous avons voulu analyser les difficultés inhérentes aux dosages de molécules de masse molaire plus faible. Une mise au point sur les immunodosages d'hormones stéroïdiennes nous a paru s'imposer. C'est l'objet du premier chapitre qui comporte des rappels sur les principes des méthodes, les marqueurs, les méthodologies, les indications des dosages et l'interprétation des résultats. Les causes d'erreur et les pièges de ces dosages sont illustrés par les données issues du Contrôle National de Qualité depuis sa mise en place dans le domaine de l'immunoanalyse.

Les deux autres chapitres concernent les marqueurs tumoraux. Après avoir évoqué dans le précédent numéro l'antigène carbohydrate 19-9 (CA 19-9) et l'antigène spécifique de la prostate (PSA), nous faisons l'état des connaissances sur un marqueur du cancer du sein, l'antigène carbohydrate 15-3 (CA 15-3) et sur un marqueur du cancer de l'ovaire, l'antigène carbohydrate 125 (CA 125).

LISTE DES AUTEURS

■ Mademoiselle Andrée BEAUDONNET

Praticien Hospitalier
Laboratoire de Biologie
Hôpital de l'Hôtel Dieu - Hôpitaux de Lyon
1, place de l'Hôpital - 69288 LYON CEDEX 02

■ Monsieur Richard COHEN

Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier
Laboratoire de Biophysique - Faculté de Pharmacie
8, avenue Rockefeller - 69373 LYON CEDEX 08
Service de Radiopharmacie et Radioanalyse - Hôpital Neuro-Cardiologique
59, boulevard Pinel - 69394 LYON CEDEX 03

■ Monsieur Henri DECHAUD

Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier
Laboratoire de Biophysique - Faculté de Pharmacie
8, avenue Rockefeller - 69373 LYON CEDEX 08
Laboratoire Central de Biochimie - Hôpital de l'Antiquaille
1, rue de l'Antiquaille - 69321 LYON CEDEX 05

IMMUNODOSAGES DES HORMONES STEROIDIENNES

R. COHEN, H. DECHAUD

I - INTRODUCTION

II - PRINCIPES GENERAUX DES IMMUNODOSAGES D'HORMONES STÉROÏDIENNES

III - MARQUEURS UTILISES : ASPECTS GENERAUX

IV - PRINCIPALES METHODOLOGIES MISES EN ŒUVRE

V - PROBLEMES PARTICULIERS LIES AUX IMMUNODOSAGES DES HORMONES STÉROÏDIENNES

VI - EXEMPLES D'IMMUNODOSAGES D'HORMONES STÉROÏDIENNES

VII - ETAPE PREANALYTIQUE - CONSERVATION DES SPECIMENS

VIII - RESULTATS DES ENQUETES INTERLABORATOIRES - ETAT DE L'ART

IX - INTERET PHYSIO-PATHOLOGIQUE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

X - CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

IMMUNODOSAGES DES HORMONES STÉROÏDIENNES

R. COHEN, H. DECHAUD

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

I. INTRODUCTION

Avant les années 1965-1970, le dosage plasmatique des hormones stéroïdiennes était impossible à réaliser en pratique courante à cause du manque de sensibilité des méthodes utilisées.

Seuls les dosages de catabolites ou de groupes de catabolites effectués dans les urines permettaient une exploration partielle du métabolisme des hormones correspondantes. Avec le développement des dosages radioimmunologiques, la quasi totalité des hormones stéroïdiennes plasmatiques ont pu être mesurées. Les premiers dosages incluait des étapes d'extraction et/ou de purification préalables et utilisaient le tritium comme marqueur (1). Des simplifications au niveau méthodologique apparurent ensuite avec le développement des méthodes directes utilisant l'iode 125 comme marqueur et des phases solides. Enfin, l'emploi de marqueurs non radioactifs (enzymes puis luminophores) permit le développement des dosages d'hormones stéroïdiennes dans la plupart des Laboratoires d'Analyses Médicales.

Dans ce chapitre sont abordés successivement les principes de mesure des hormones stéroïdiennes dans le plasma, les marqueurs utilisés avec leurs avantages et leurs inconvénients, les différentes méthodologies mises en œuvre et les problèmes posés par les immunodosages de ces molécules de masse molaire faible (haptènes). Ensuite sont présentés des exemples de dosages d'hormones stéroïdiennes, la nature et les conditions de prélèvement de différents milieux biologiques. Quelques rappels physiopathologiques sur le cortisol, la testostérone, l'estradiol et la progestérone et les principales indications de leur dosage sont abordés. Enfin, le point est fait sur l'état de l'art en 1995 des dosages d'hormones stéroïdiennes à partir des données provenant des programmes externes de contrôle de qualité.

II. PRINCIPES GÉNÉRAUX DES IMMUNODOSAGES DES HORMONES STÉROÏDIENNES

En raison de la faible masse molaire des molécules de stéroïdes, 250 à 350 g.mol⁻¹ pour la plupart d'entre elles, les méthodes les plus utilisées actuellement sont les immunodosages par compétition. Cependant, quelques méthodes de dosage de ces haptènes faisant appel à un excès d'anticorps sont en cours de développement. Elles permettront probablement de réaliser des dosages aussi performants que les dosages d'analytes de masse molaire élevée (supérieure à 5 000 g.mol⁻¹), en termes de rapidité, détectabilité, précision et spécificité.

II.1- Méthodes par compétition

Deux types de méthodes existent :

- Les méthodes par compétition avec antigène (stéroïde) marqué

Ce sont les plus couramment utilisées. Dans ces méthodes, il y a compétition entre le stéroïde à doser en quantité variable et le stéroïde marqué en quantité définie, vis à vis d'un nombre limité de sites anticorps en quantité définie.

A l'équilibre, la quantification de la réaction immunologique peut se faire de deux manières :

a) si le stéroïde marqué libre et le stéroïde marqué lié à l'anticorps délivrent le même signal, une séparation des formes libre (F) et liée (B) du stéroïde est obligatoire. Les méthodes sont alors appelées « **méthodes avec séparation de phases** ».

Les principales méthodes de séparation sont :

- les méthodes au charbon-dextran dans lesquelles il y a adsorption du stéroïde libre sur les particules de charbon-dextran,
- les méthodes de précipitation chimique des complexes [anticorps-stéroïde] par le polyéthylèneglycol ou le sulfate d'ammonium,
- les méthodes d'immunoprécipitation des complexes [anticorps-stéroïde] avec des immunoglobulines dirigées contre les anticorps des complexes,
- les méthodes utilisant des phases solides sur lesquelles sont fixées les anticorps anti-stéroïdes (macro et microbilles, tubes de polypropylène, polystyrène,...) et qui sont, de loin, les plus répandues en raison de leur praticabilité.

Après la séparation de phases, la mesure du signal s'effectue alors le plus souvent sur la fraction B, parfois sur la fraction F.

b) Si le stéroïde marqué libre et le stéroïde marqué lié à l'anticorps délivrent un signal différent, la mesure du signal peut alors être réalisée sans séparation de phases. Les méthodes sont alors appelées « **méthodes en phase homogène** ». Les courbes d'étalonnage obtenues sont croissantes lorsque le signal délivré par l'antigène marqué libre est supérieur à celui délivré par le complexe antigène marqué-anticorps ou décroissantes dans le cas contraire.

- Les méthodes par compétition avec anticorps marqué

Dans ces méthodes, il y a compétition entre le stéroïde en quantité définie, fixé sur une phase solide, et le stéroïde à doser en quantité variable vis à vis d'une quantité définie et en défaut d'anticorps marqué.

Comme dans les méthodes par compétition avec antigène marqué, plus la concentration d'antigène à doser augmente, plus le signal délivré par la fraction B (sur phase solide) diminue (**figure 1**).

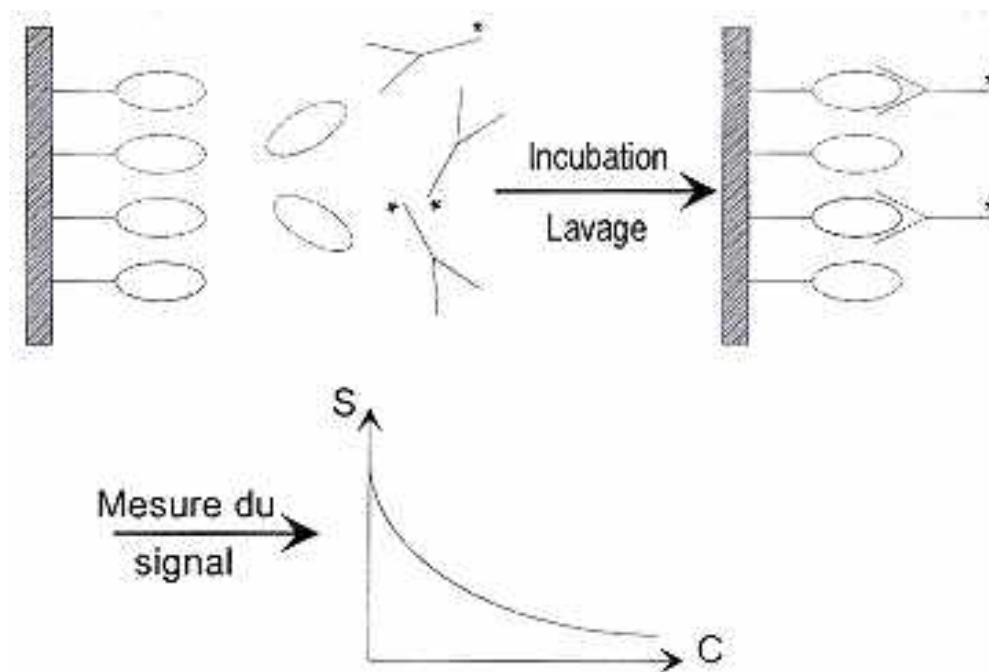


Figure 1 : Principe et courbe d'étalonnage des méthodes par compétition avec anticorps marqué.

II.2- Méthodes immunométriques

Au cours de ces dernières années, les progrès les plus importants réalisés dans le domaine de l'immunoanalyse ont concerné les dosages des molécules de masse molaire élevée. En effet, la présence sur ces substances de plusieurs épitopes capables de fixer simultanément des anticorps différents a permis le développement d'immunosages non compétitifs, en excès de réactifs. Ce type de dosages permet la détermination de concentrations faibles d'analyte puisqu'il est possible de mesurer avec exactitude une faible augmentation du signal par rapport au bruit de fond (signal fourni par la solution étalon de concentration nulle).

Bien qu'elles ne soient pas encore utilisées en routine, nous décrivons brièvement quelques méthodes immunométriques développées dans le but d'obtenir pour les dosages d'haptènes les mêmes avantages (rapidité, détectabilité, précision et spécificité) que ceux obtenus pour les dosages d'analytes de masse molaire élevée (2).

- Dosage immunométrique anticomplexe :

L'anticorps de révélation est dirigé contre le complexe [anticorps de capture-haptène]. Il ne se lie à l'anticorps de capture que si celui-ci a fixé l'haptène (3,4).

- Dosage immunométrique par anticorps sélectif ou dosage idiométrique :

L'anticorps de révélation (ou anticorps sélectif) est, comme précédemment, capable de se lier au complexe [anticorps de capture-haptène]. Dans ce cas, cependant, l'anticorps de révélation ne se fixe pas sur les sites libres de l'anticorps de capture non pas en raison de sa spécificité mais en raison de l'addition d'un agent bloquant qui possède la double propriété de se lier à l'anticorps de capture et de ne pas se lier à l'anticorps de révélation. Ce bloqueur peut être un conjugué de l'analyte avec une protéine - par exemple, l'immunogène utilisé pour préparer l'anticorps de capture - ou un anticorps spécifique anti-idiotypique dirigé contre l'anticorps de capture, d'où le nom de la méthode (5).

- Dosage immunométrique par liaisons multiples :

Les immunodosages d'haptènes par compétition ne mettent en jeu qu'un seul événement de reconnaissance dans la détermination de l'analyte, ce qui limite leur spécificité. Pour remédier à cet inconvénient, un système incluant la liaison séquentielle à deux anticorps différents avec des étapes de lavage pour éliminer les problèmes de réactions croisées et de bruit de fond, a été développé. Ainsi, dans une première étape, l'analyte est capturé par un anticorps spécifique fixé sur une phase solide et les composés non liés sont éliminés par un lavage. Au cours d'une deuxième étape d'incubation, l'analyte est transféré à un anticorps différent en phase liquide par simple diffusion ou par addition d'un agent dissociant le premier complexe [anticorps fixé à la phase solide-analyte]. Le complexe soluble est ensuite récupéré sur une phase solide sur laquelle est fixé un anticorps anti-idiotypique, par exemple. Enfin, après un nouveau lavage, le second complexe [anticorps-analyte] est révélé par un réactif anticomplexe marqué. Dans ce système, le gain de spécificité est dû à la liaison séquentielle de l'analyte à deux anticorps différents (4).

■ III. MARQUEURS UTILISES : ASPECTS GENERAUX

Les principaux types de marqueurs (radioéléments, enzymes, luminophores) sont utilisés ou potentiellement utilisables dans les immunodosages d'hormones stéroïdiennes, Nous décrivons brièvement (voir également Cahier de Formation n° 2, mai 95, pp 28-39) les natures, propriétés, avantages et inconvénients des différentes catégories de marqueurs.

III.1- Les marqueurs radioactifs

Deux marqueurs radioactifs sont employés dans les immunodosages d'hormones stéroïdiennes :

- l'iode 125 (^{125}I)

C'est un émetteur γ et X. Sa période est de 59,7 jours, l'énergie du γ émis voisine de 35 keV.

Son activité molaire est élevée : 2 200 Ci/mmol soit 81 TBq/mmol, Il est détecté par spectrométrie γ .

- le tritium (^3H)

Cet isotope de l'hydrogène est un émetteur β . Sa période est de 12,3 ans. L'énergie maximale du β émis est de 18,5 keV. Son activité molaire est plus faible que celle de ^{125}I : 29 Ci/mmol soit 1,1 TBq/mmol. Il est détecté par spectrométrie β (scintillation en milieu liquide).

- Avantages :

Les masses molaires de ces marqueurs sont faibles. Les problèmes d'encombrement stérique sont donc peu importants, voire négligeables notamment pour ^3H .

Ils émettent : - un signal spontané et direct
- un signal non perturbé par l'environnement.

Pour ces raisons, le signal émis est spécifique. De plus, il est précis si le taux de comptage est suffisant. Avec $N = 10\ 000$ ipm (impulsions par minute), l'incertitude au seuil de 68 % est égale à \sqrt{N} / N soit 1%.

- Inconvénients :

L'acquisition du signal est relativement longue.

Ces marqueurs ne sont pas stables dans le temps (décroissance radioactive).

Les phénomènes de radiolyse, qui augmentent avec le taux de marquage, diminuent l'immunoréactivité du traceur vis à vis de l'anticorps.

Les méthodes en phase homogène sont difficiles à développer (seule la méthode SPA, c'est à dire « scintillation proximity assay », utilisant le tritium a été mise au point).

Les problèmes concernant la réglementation des installations, la gestion des stocks et des déchets radioactifs et la radioprotection des individus sont contraignants.

III.2- Les marqueurs enzymatiques

Les principales enzymes utilisées en immunoanalyse sont la peroxydase de raifort et la phosphatase alcaline surtout, mais aussi la β -D-galactosidase, la glucose oxydase et la glucose-6-phosphate deshydrogénase.

La détection du signal se fait par absorption ou par émission.

- Avantages

Les marqueurs sont stables.

Les mesures d'absorbance sont faciles à mettre en œuvre puisqu'il existe des spectrophotomètres d'absorption dans tout laboratoire.

L'acquisition du signal est rapide.

Les immunodosages en phase homogène sont possibles (méthode EMIT).

- Inconvénients

Les masses molaires des enzymes sont élevées. Il existe donc des problèmes d'encombrement stérique qui peuvent diminuer l'immunoréactivité d'un stéroïde marqué par une enzyme vis à vis de l'anticorps anti-stéroïde correspondant.

Le signal émis est indirect (étape supplémentaire de l'ajout du substrat).

Le signal d'absorption est peu spécifique.

Le signal d'absorption présente une dynamique faible (environ 0,05 à 2,00).

Le signal d'émission nécessite l'emploi d'un fluorimètre ou d'un luminomètre.

III.3- Les marqueurs luminescents

a) Les marqueurs fluorescents

Ces marqueurs émettent de la lumière après une excitation photonique de longueur d'onde appropriée.

Les principaux marqueurs utilisés sont :

- les fluorophores conventionnels : fluorescéine, rhodamine, ombelliférone ; leur détection est réalisée par fluorimétrie conventionnelle ; certains peuvent être employés dans les immunodosages par polarisation de fluorescence,
- les chélates de lanthanides (Eu^{3+} , Tb^{3+} , Sm^{3+}) ; ils sont détectés par fluorimétrie à résolution temporelle.

- Avantages

. des fluorophores conventionnels : facilité de marquage, stabilité, possibilité d'immunodosages en phase homogène.

. des chélates de lanthanides : déplacement de Stokes (décalage en longueur d'onde entre le rayonnement excitateur et le rayonnement émis) important, émission dans le rouge, déclin de fluorescence lent rendant possible la résolution

temporelle, détection très sélective, faible bruit de fond et signal intense permettant d'atteindre des limites de détection très basses, enfin signal présentant une grande dynamique.

- Inconvénients

- des fluorophores conventionnels : signal peu spécifique, limites de détection peu favorables, reproductibilité peu satisfaisante.
- des chélates de lanthanides : complexité de l'appareillage (fluorimètre à résolution temporelle), possibilité de contamination externe par Eu^{3+} , fuites possibles de Eu^{3+} hors des agents chélatants.

b) Les marqueurs et systèmes chimiluminescents

Les marqueurs chimiluminescents émettent de la lumière après absorption d'énergie chimique. Les principaux marqueurs ou systèmes utilisés sont :

- les phtalhydrazides (luminol, isoluminol et dérivés),
- les esters d'acridinium,
- le système phosphatase alcaline-AMPPD (adamantyl méthoxy-phénylphosphate dioxétane),
- le système luciférine-luciférase.

Ils sont détectés par luminométrie.

- Avantages : stabilité, signal très spécifique (pas de lumière parasite), acquisition rapide et grande dynamique du signal.

- Inconvénients : nécessité de posséder un luminomètre, signal souvent fugace (imprécision de la mesure), atténuation (« quenching ») possible.

Pour conclure ce paragraphe sur les marqueurs utilisés dans les immunodosages par compétition des hormones stéroïdiennes, il faut insister sur le fait que le marqueur n'est pas le « facteur limitant » mais que la qualité d'un dosage dépend plutôt de la présence ou de l'absence d'un traitement préliminaire (extraction, purification) des spécimens, des propriétés de l'anticorps et du degré d'automatisation.

■ IV. PRINCIPALES METHODOLOGIES MISES EN ŒUVRE

Les hormones stéroïdiennes circulent dans le sang

- soit sous **forme estérifiée** (sulfates et glycuronides, esters d'acides gras à plus ou moins longues chaînes)
- soit sous **forme non estérifiée**.

Ces formes non estérifiées, les plus souvent étudiées, sont véhiculées dans le sang liées à des protéines de transport plus ou moins spécifiques. **Les formes non estérifiées libres** (non liées aux protéines de transport) sont en général en concentrations plasmatiques beaucoup plus faibles que les formes non estérifiées liées aux protéines.

Les méthodes sont différentes selon la forme à doser.

IV.1- Dosage des formes non estérifiées (stéroïde non estérifié libre + lié aux protéines = stéroïde dit « total »)

Les stéroïdes non estérifiés, lipophiles, sont :

- soit extraits du plasma par des solvants organiques dans les méthodes avec extraction
- soit libérés des protéines de liaison par divers réactifs chimiques (agents dits « bloquants »), ce qui permet la pratique des méthodes dites « directes ».

a) Méthodes avec extraction

Il s'agit le plus souvent d'une extraction liquide-liquide (**figure 2**) dans laquelle il y a transfert sélectif du stéroïde à doser d'une phase aqueuse (plasma ou sérum) à une phase organique non miscible (éther diéthylique, dichlorométhane,...).

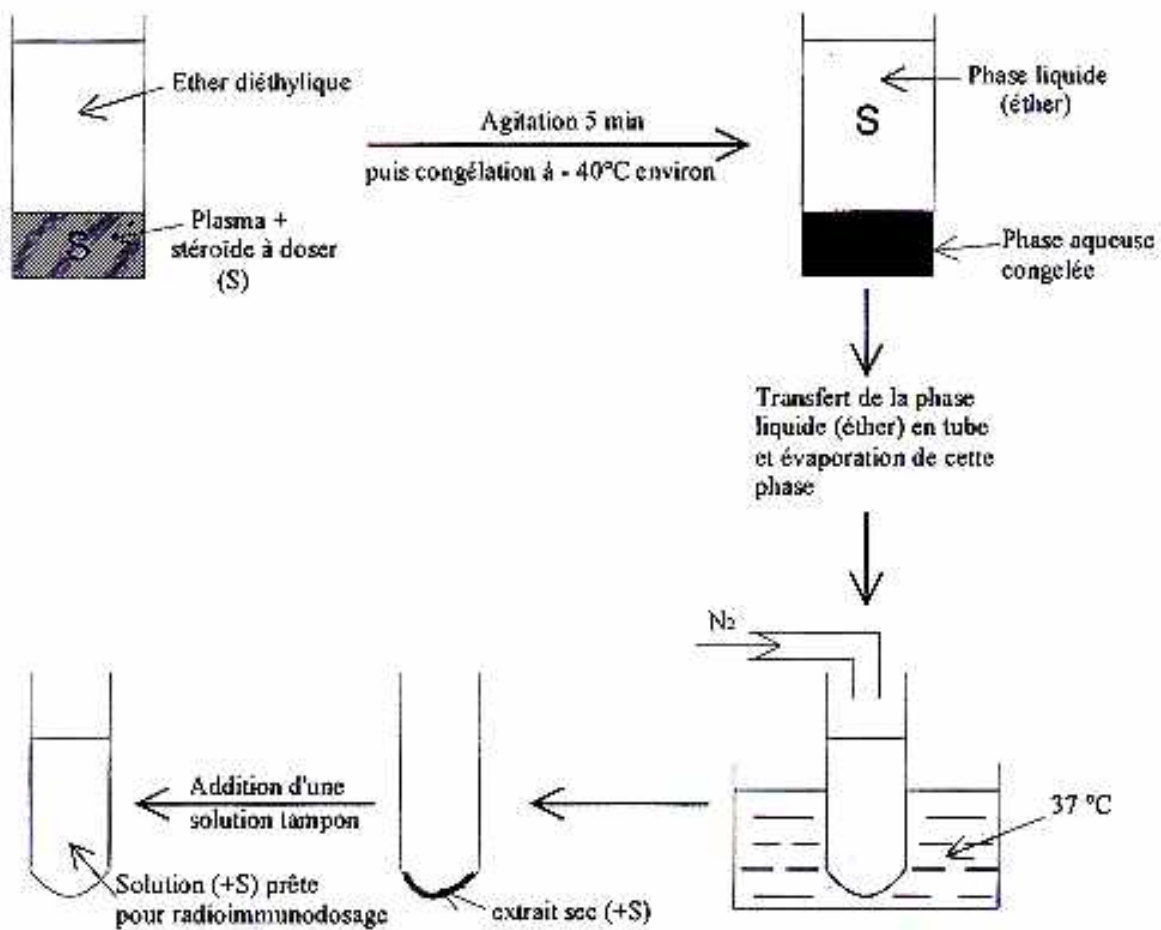


Figure 2 : Schéma de principe d'une extraction des hormones stéroïdiennes par l'éther diéthylique.

Ces méthodes avec extraction du stéroïde à doser sont fréquemment suivies d'une purification chromatographique. Cette étape a pour but d'éliminer la plupart des molécules de structure voisine de celle du stéroïde à doser, susceptibles d'interférer dans le radioimmunos dosage. Les méthodologies les plus souvent employées sont :

- la chromatographie de partage sur colonne de célite,
- la chromatographie sur séphadex LH 20[®],
- l'HPLC.

Exemple de purification par chromatographie :

Séparation de progestérone (P), 17 α -hydroxyprogestérone (17OHP), 11 déoxycortisol (S) et cortisol (F) par chromatographie de partage sur colonne de célite (**Figures 3 et 4**). Ces hormones stéroïdiennes sont ici séparées selon leur polarité :

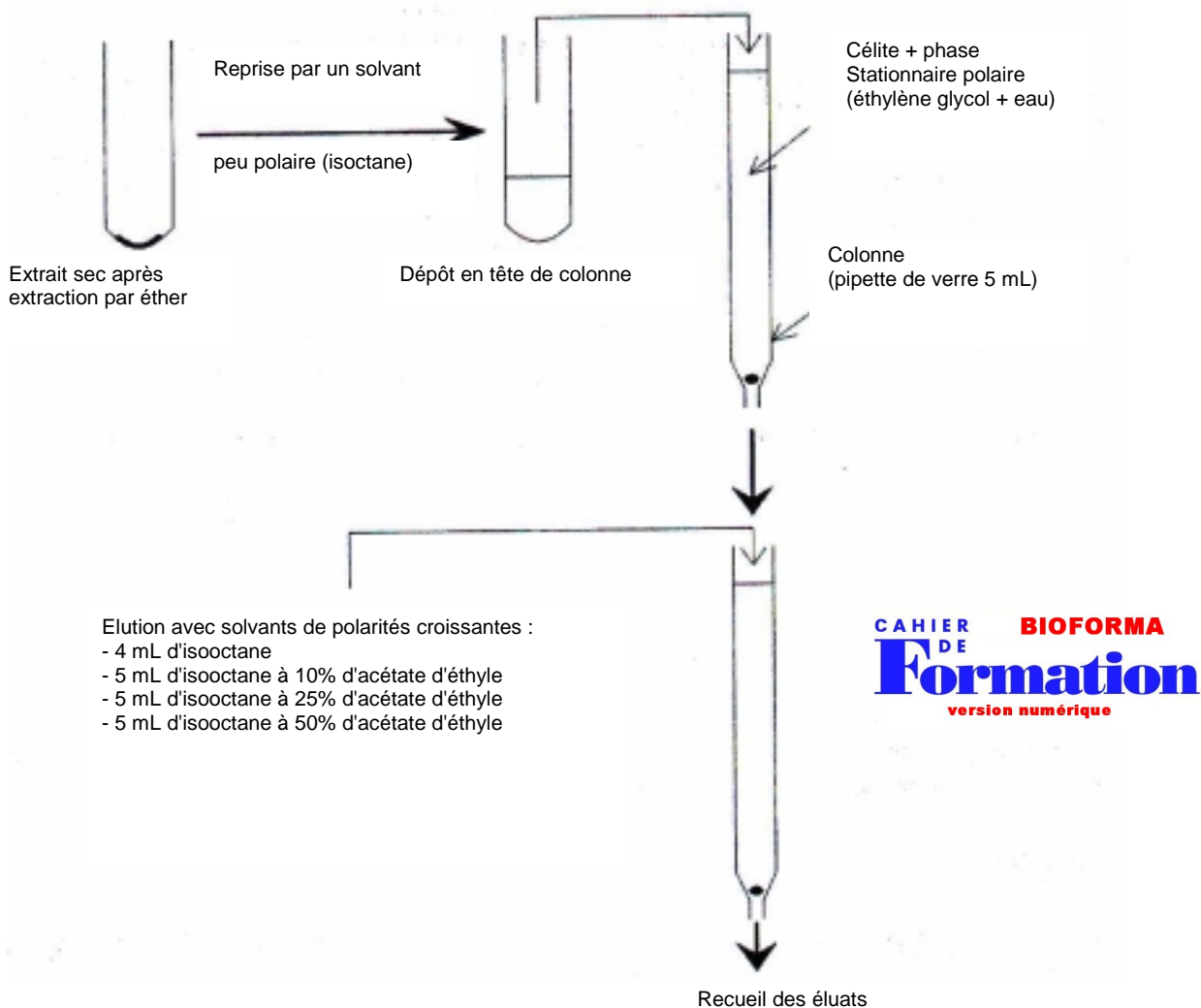


Figure 3 : Schéma de principe d'une chromatographie de partage d'hormones stéroïdiennes sur colonne de célite.

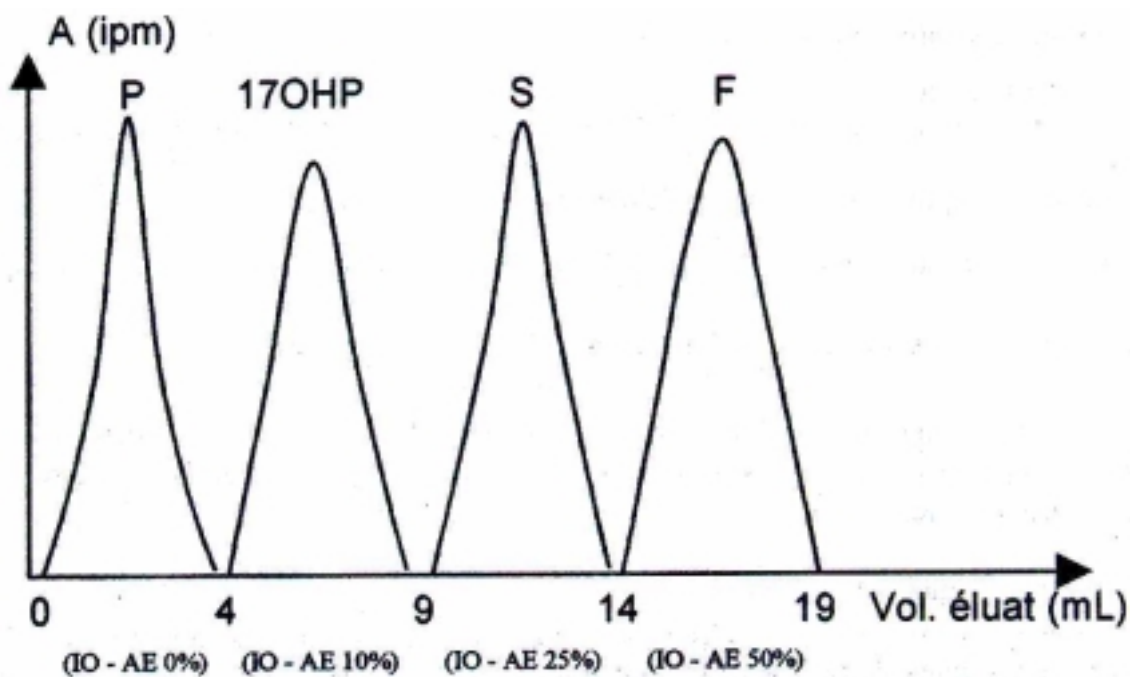


Figure 4 : Chromatogramme obtenu avec les stéroïdes (P, 17OHP, S et F) marqués au tritium. A : radioactivité (en impulsions par minute), IO : isooctane, AE : acétate d'éthyle.

Pour tout dosage de stéroïde, après l'extraction et l'étape chromatographique, les éluats contenant les stéroïdes à doser sont évaporés à 37 °C sous jet d'azote, Les extraits secs sont ensuite dissous dans du tampon (phosphate albumine ou gélatine à 1 g/l, pH = 7,4, par exemple). Les solutions sont alors prêtes pour le dosage (radioimmunos dosage par compétition avec stéroïde tritié le plus souvent).

Des pertes en stéroïde à doser peuvent se produire au cours des étapes d'extraction et de chromatographie. C'est pourquoi, avec ces méthodes, il est indispensable de déterminer le taux de récupération (rendement) en stéroïde par rapport au taux de départ. Pour ce faire, seuls les stéroïdes tritiés sont utilisables en raison de la faible modification physico-chimique et structurale de la molécule de stéroïde induite par le remplacement d'atomes d'hydrogène par des atomes de tritium. Le stéroïde tritié, dans lequel deux à six atomes de tritium en général, remplacent des atomes d'hydrogène, se comporte de manière identique au stéroïde à doser dans les étapes d'extraction et de chromatographie. Comme, de plus, il est dilué de manière homogène parmi les molécules de stéroïde à doser et lié aux protéines de transport dans les mêmes proportions, le rapport

$$R = \frac{\text{radioactivité du stéroïde marqué récupérée après extraction et chromatographie}}{\text{radioactivité du stéroïde marqué incorporée au départ}}$$

permet d'estimer les pertes en stéroïde à doser et de corriger le résultat obtenu après le radioimmunos dosage (RID) :

$$\text{concentration plasmatique en stéroïde à doser} = \frac{\text{concentration mesurée par RID}}{R}$$

Signalons que, si l'emploi de stéroïde tritié est obligatoire pour la détermination de R, des marqueurs comme l'iode 125 ou éventuellement des marqueurs luminescents et enzymatiques peuvent convenir au niveau du dosage par compétition.

Les avantages et inconvénients liés à l'utilisation de ces méthodes avec extraction et chromatographie suivies le plus souvent d'un radioimmunos dosage avec marqueur tritié sont exposés dans le paragraphe V.

b) Méthodes directes

Ces méthodes directes font appel :

- soit à des méthodes avec séparation de phases utilisant le plus souvent des phases solides (billes, tubes, particules d'oxyde de fer,...) sur lesquelles est fixé l'anticorps anti-stéroïde à doser,
- soit à des méthodes en phase homogène telles que EMIT (« enzyme multiplied immunoassay technique »), FPIA (« fluorescence polarisation immunoassay »), FETIA (« fluorescence energy transfer immunoassay ») et FQIA (« fluorescence quenching immunoassay »).

Ces méthodes directes nécessitent :

- soit une inhibition de la liaison du stéroïde à doser avec sa protéine de liaison spécifique par un réactif chimique,
- soit une destruction de la protéine de liaison spécifique par un réactif chimique.

Ces méthodes directes utilisent comme marqueurs : l'iode 125, les marqueurs enzymatiques ou les marqueurs luminescents.

Les inconvénients liés à l'utilisation de ces méthodologies sont exposés dans le paragraphe V.

IV.2- Dosage des formes non estérifiées libres (stéroïde non estérifié libre, non lié aux protéines) :

Les mêmes principes méthodologiques peuvent être utilisés pour les mesures d'hormones thyroïdiennes libres et d'hormones stéroïdiennes libres :

- méthode par extraction-saturation

Dans une première étape, la forme libre à doser est « extraite » du plasma par l'anticorps en excès fixé sur une phase solide. Dans une seconde étape, après aspiration du milieu réactionnel, les sites inoccupés de l'anticorps sont « saturés » par un léger excès de stéroïde marqué. Après élimination du surnageant et lavage, le signal est mesuré sur la phase solide.

Le développement de cette méthodologie est extrêmement délicat. Les constantes d'affinité des anticorps fixés sur la phase solide et la durée d'incubation, notamment, doivent être parfaitement déterminées afin qu'en théorie, seul le stéroïde libre soit extrait, du plasma. Ce type de dosage présente l'avantage, par rapport aux méthodes utilisant un traceur « analogue », de ne pas être sensible aux variations des protéines de liaison puisque le contact entre le stéroïde marqué et les protéines de liaison est évité,

NB : si l'affinité de l'anticorps pour le stéroïde est très supérieure à celle des protéines de liaison, toutes les formes du stéroïde sont extraites et l'on dispose alors d'un dosage du stéroïde « total ».

- méthodes utilisant des traceurs dits « analogues »

Ceux-ci sont des stéroïdes marqués (à l'iode 125 en général). Théoriquement, ils ont la propriété de se lier à l'anticorps et de ne pas se lier aux protéines de liaison. De ce fait, une compétition a lieu uniquement entre le stéroïde libre à doser et le traceur analogue vis à vis du nombre limité de sites anticorps.

- méthode de dialyse à l'équilibre

Cette méthode dite « de référence » utilise des stéroïdes (S) tritiés. Elle permet la mesure de la fraction libre dialysable que l'on exprime en pourcentage (% S libre). La concentration en stéroïde libre est obtenue en effectuant le produit du pourcentage de stéroïde libre par la concentration en stéroïde total :

$$[S \text{ libre}] = \% S \text{ libre} \times [S \text{ total}]$$

- méthode par ultrafiltration

IV.3- Dosage des formes estérifiées

Les formes estérifiées peuvent être mesurées par méthode directe ou par méthode indirecte (dosage du stéroïde libéré après hydrolyse de la liaison ester).

Exemple

1) Méthode directe : immunodosage de sulfate de DHEA (déhydroépiandrostérone).

2) Méthode indirecte : dosage du glycuronide de 5 α -androstane 3 α , 17 β diol(3 α D-G).

Le 3 α D-G est un catabolite de la 5 α dihydrotestostérone qui serait un « bon marqueur » l'hirsutisme idiopathique.

Le 5 α -androstane 3 α , 17 β diol (3 α D) non estérifié est éliminé du plasma par une extraction à l'éther diéthylique.

Le 3 α D-G est ensuite hydrolysé par traitement du plasma à la β -glycuronidase (48h à 45 °C, pH = 5,5). Le 3 α D libéré est mesuré par radioimmunodosage après une extraction et une séparation chromatographique.

■ V. PROBLÈMES PARTICULIERS LIÉS AUX IMMUNODOSAGES DES HORMONES STÉROÏDIENNES

Les problèmes posés par le dosage des hormones stéroïdiennes plasmatiques sont dus/

- à leurs caractéristiques physico-chimiques,
- aux faibles concentrations de certaines d'entre elles,
- au milieu environnant qui contient :
 - de nombreux stéroïdes de structures voisines de celle du stéroïde à doser, en concentrations parfois très supérieures,
 - des substances pouvant interférer au niveau de la réaction antigène-anticorps,
 - des protéines de liaison du stéroïde à doser.
- à leur métabolisme.

De ce fait, selon les réactifs (anticorps, marqueurs, ...) et les méthodologies employées, différents types de difficultés peuvent apparaître, tant au niveau des dosages que de leur interprétation.

V.1- Problèmes posés par les anticorps anti-stéroïdes

a) Problèmes posés par la préparation d'anticorps de haute affinité

Pour obtenir des limites de détection satisfaisantes avec les méthodes par compétition, qui sont encore les plus répandues, il est nécessaire d'utiliser des anticorps de haute affinité. Cette dernière condition est impérative pour doser certaines hormones dont la concentration plasmatique est faible, comme l'estradiol chez l'homme et la femme ménopausée ou la testostérone chez la femme.

Si les anticorps monoclonaux améliorent la spécificité, ils présentent en général une affinité souvent insuffisante. C'est pourquoi, dans le domaine des stéroïdes, les anticorps polyclonaux restent très utilisés.

b) Problèmes posés par la préparation d'anticorps spécifiques

La préparation d'anticorps antistéroïdes nécessite de conférer à ces petites molécules la propriété d'immunogénicité. Pour cela, on les couple chimiquement par l'intermédiaire d'un bras de liaison, à une molécule de masse molaire plus élevée telle que l'albumine bovine, la thyroglobuline animale ou l'hémocyanine, qui possède elle-même la propriété précédente (6, 7, 8). Ainsi par exemple, il est possible de greffer jusqu'à quarante molécules de stéroïde par molécule d'albumine bovine. Le conjugué immunogène obtenu est ensuite injecté à un animal dans le but d'obtenir des anticorps antistéroïdes. Dans ces conditions, on comprend aisément que les anticorps produits puissent être dirigés contre des épitopes appartenant à la « molécule porteuse », au bras de liaison ou au stéroïde et que la spécificité des anticorps dépende étroitement de la position du couplage sur le noyau de stéroïde. Les nombreuses études concernant l'influence de la position de couplage sur la spécificité des anticorps ont permis de bien définir, pour chaque stéroïde, les positions de couplage les plus favorables (7).

c) Problèmes liés à la détermination de la spécificité analytique

La spécificité analytique d'un immunodosage d'hormone stéroïdienne dans un milieu biologique (plasma, urine, salive, liquide céphalo-rachidien) dépend non seulement de la spécificité des anticorps utilisés mais aussi :

- de la concentration relative du stéroïde à doser, dans le milieu biologique, par rapport à celle des stéroïdes de structure voisine qui risquent d'interférer dans le dosage,
- de la présence de composés possédant une structure non stéroïdienne mais susceptibles de modifier la liaison du stéroïde marqué à l'anticorps (interférences non spécifiques),
- de l'inclusion ou non d'étape(s) de purification du milieu biologique.

Pour étudier la spécificité d'un anticorps antistéroïde, on mesure les pourcentages de réaction croisée obtenus avec différents stéroïdes présentant une structure voisine de celle de l'analyte (voir Cahier de Formation n° 2, mai 95, p 14).

V.2- Problèmes particuliers posés par les marqueurs

a) Tritium

Les stéroïdes tritiés ont l'avantage de présenter une immunoréactivité pratiquement identique à celle du stéroïde non marqué correspondant.

En revanche :

- ils ne sont pas utilisables dans les méthodes par compétition de type direct en raison des difficultés de détection (phénomènes de « quenching » principalement),
- l'emploi des stéroïdes tritiés nécessite en général l'utilisation d'une méthode de séparation des formes libre et liée assez longue et non automatisable (méthode au charbon-dextran),
- la mesure de la radioactivité β^- des stéroïdes tritiés nécessite l'emploi de liquide scintillant (3 à 10 ml par fiole de comptage). En raison de la période du tritium (12,3 ans) et de la plus ou moins grande toxicité des solvants organiques entrant dans la constitution de ces liquides, il est nécessaire de manipuler ces produits avec précaution, de stocker les déchets dans des lieux adaptés à cet usage puis de les faire enlever régulièrement par une société de service spécialisée.

b) Iode 125

Les stéroïdes iodés présentent les avantages. Suivants :

- ils sont détectés sans liquide scintillant,

- les formes libre et liée du stéroïde (marqué et non marqué) sont séparées par des méthodologies simples (phases solides par exemple),
- les déchets radioactifs, moins volumineux que ceux du tritium, peuvent être éliminés avec les effluents naturels après stockage pendant le temps nécessaire à l'obtention d'une radioactivité résiduelle conforme aux normes ministérielles en vigueur
- le rayonnement gamma émis par l'iode 125 n'est pas soumis à des phénomènes de « quenching »,
- la radioactivité molaire de l'iode 125 est environ soixante quinze fois supérieure à celle du tritium. Une molécule de stéroïde sur laquelle est fixé un atome d'iode a donc une radioactivité environ vingt fois supérieure à celle d'une molécule de stéroïde quatre fois tritiée. Pour cette raison, les faibles quantités de traceur iodé mises en jeu dans les immunodosages par compétition permettent d'obtenir des limites de détection plus basses.

Cependant certains problèmes apparaissent lors de leur utilisation :

- l'immunoréactivité des stéroïdes iodés est très différente de celle des stéroïdes non marqués correspondants, contrairement à ce que l'on observe pour les stéroïdes tritiés. Ceci est lié à leur structure. L'atome d'iode 125 est en général fixé sur un noyau histamine ou tyramine lui-même fixé sur le squelette cyclopentanoperhydrophénanthrénique. Il s'ensuit des perturbations au niveau des limites de détection attendues,
- la période de l'iode 125 (59,7 jours) est un handicap dans la mesure où les stéroïdes marqués, et par voie de conséquence les trousseaux de réactifs, ont des durées de validité le plus souvent inférieures à deux mois,
- enfin, l'inconvénient majeur de l'iode 125 n'est pas dû à l'iode 125 lui-même, mais aux méthodologies de type direct qui accompagnent très souvent son emploi (voir paragraphe VIII. 4. b).

c) Autres marqueurs

Les avantages liés aux marqueurs luminescents et enzymatiques ont été recensés dans le paragraphe III. À ces avantages d'ordre général, il faut ajouter leur relative facilité d'automatisation et l'absence des contraintes liées à l'emploi des marqueurs radioactifs.

Les problèmes spécifiques dus à leur utilisation portent, là encore, sur la différence d'immunoréactivité entre stéroïdes marqués et non marqués (problèmes au niveau des limites de détection). De plus, comme pour l'iode 125, l'inconvénient majeur n'est pas dû au marqueur lui-même, mais à son emploi dans le cadre de méthodes directes (voir paragraphe VIII. 4. b),

V.3- Problèmes particuliers posés par les méthodologies utilisées

Le milieu réactionnel environnant l'analyte est appelé « matrice ». L'identité de composition de cette « matrice » entre les solutions étalons et les spécimens à doser ou même d'un spécimen à l'autre conditionne de manière très étroite l'exactitude des résultats obtenus par immunodosage. Ce problème est d'autant plus crucial avec les méthodes directes.

Il existe deux types d'inconvénients liés au milieu réactionnel :

a) Les phénomènes d'interférences

- Interférences spécifiques : elles sont dues à la présence dans le milieu de stéroïdes interférents à des concentrations suffisantes pour que l'exactitude du dosage soit altérée. Ces phénomènes sont fréquemment observés en pathologie et au cours de traitements médicamenteux (7).
- Interférences non spécifiques : ces phénomènes d'interférences dits non spécifiques, sont dus à la présence dans le milieu réactionnel de molécules de structures différentes de celles des stéroïdes à doser. Ces molécules (acides gras, molécules médicamenteuses, ...) qui se lient aux anticorps avec une faible affinité peuvent néanmoins affecter la qualité des résultats en raison de leurs concentrations plasmatiques très élevées.

b) Les effets dits « de matrice »

D'un spécimen à un autre ou d'un spécimen à une solution étalon, on peut observer des **variations** de pH, de force ionique, de concentration en protéines, lipides et, surtout pour les hormones stéroïdiennes, de concentration en protéines de liaison spécifique (« Sex steroid-Binding Protein » ou SBP, « Corticosteroid-Binding Globulin » ou CBG). Celles-ci peuvent modifier l'intensité de la réaction antigène-anticorps et perturber éventuellement la séparation des formes libre et liée de l'antigène ou l'émission et la mesure du signal.

Lorsque l'on utilise des méthodes directes, les phénomènes d'interférences non spécifiques et les effets de « matrice » peuvent exister malgré l'amélioration progressive de la qualité des phases solides et des anticorps et la confection de solutions étalons possédant des « matrices » sensiblement identiques à celles des spécimens à doser. De plus, les phénomènes d'interférences spécifiques peuvent également être présents, même lorsque des anticorps

monoclonaux sont utilisés. Ces différents effets, qui se produisent de manière plus ou moins intense sur quelques uns des spécimens à doser, constituent le principal inconvénient des méthodes directes, quel que soit le marqueur utilisé.

Lorsque l'on utilise des méthodes avec extraction (plus chromatographie éventuellement), la plupart des effets précités sont minimisés voire supprimés. Les protéines, les protéines de liaison spécifiques et les formes estérifiées du stéroïde à doser sont éliminées lors de l'étape d'extraction puisqu'elles restent dans la phase aqueuse (plasma). Les acides gras, les lipides et la plupart des molécules susceptibles d'interférer (médicaments, stéroïdes endogènes...) sont éliminés lors de l'étape chromatographique. Le stéroïde à doser se trouve alors à la fin des opérations dans les mêmes conditions que le stéroïde étalon, c'est-à-dire environné d'une « matrice » pratiquement identique, représentée par une solution tampon à pH neutre, contenant de l'albumine ou de la gélatine le plus souvent.

■ VI. EXEMPLES D'IMMUNODOSAGES D'HORMONES STÉROÏDIENNES

Parmi les hormones stéroïdiennes, la testostérone, l'estradiol et la progestérone sont couramment mesurés dans le sang périphérique. Les principales méthodes utilisées pour le dosage de ces hormones sont rappelées ci-dessous.

VI.1- Testostérone

a) dosage de testostérone « totale »

Celui-ci apprécie la testostérone non conjuguée (fraction libre + fraction liée à l'albumine + fraction liée à la SBP). On trouve des :

- méthodes avec extraction suivies d'un radioimmunos dosage au tritium (ou à ^{125}I)
- méthodes avec extraction et chromatographie suivies d'un radioimmunos dosage au tritium,
- méthodes directes
 - avec marqueur enzymatique et détection par spectrophotométrie d'absorption,
 - avec marqueur fluorescent et détection par fluorimétrie,
 - avec marqueur radioactif (^{125}I) et détection de la radioactivité.

Les principaux problèmes rencontrés se situent surtout au niveau des dosages de testostérone chez la femme ou le nouveau-né (9, 10) lorsque les méthodes utilisées sont directes. L'ensemble (effets de matrice + interférences) conduit en général à l'obtention de valeurs anormalement élevées par rapport à celles observées avec la méthode de référence (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) ou avec les immunodosages au tritium.

Chez l'homme, ces effets sont moins sensibles en raison de la plus grande concentration de testostérone à doser.

En résumé, chez la femme ou le nouveau-né, les méthodes les plus satisfaisantes pour l'instant restent celles qui incluent une extraction et de préférence une chromatographie. Chez l'homme, les autres méthodes, à savoir les méthodes directes, fournissent des résultats acceptables.

b) Dosage de testostérone non liée à la SBP

Il s'agit de la forme biodisponible qui peut être évaluée par dosage de la testostérone dans les surnageants après précipitation des spécimens de plasmas par le sulfate d'ammonium à demi-saturation (11).

c) Dosage de testostérone libre

Il est possible d'apprécier la forme libre par une méthode utilisant un analogue marqué à ^{125}I ou par dialyse à l'équilibre.

VI.2- Estradiol

a) Dosage d'estradiol total

Celui-ci apprécie l'estradiol non conjugué (fraction libre + fraction liée à l'albumine + fraction liée à la SBP). On trouve des :

- méthodes avec extraction suivies d'un radioimmunodosage au tritium (OU à ^{125}I),
- méthodes avec extraction et chromatographie suivies d'un radioimmunodosage au tritium,
- méthodes directes (12)
 - avec marqueur enzymatique et détection par spectrophotométrie d'absorption ou luminorimétrie ou luminométrie,
 - avec marqueur fluorescent et détection par fluorimétrie,
 - avec marqueur radioactif (^{125}I) et détection de la radioactivité.

Les *problèmes* sont à peu près identiques à ceux observés pour le dosage de testostérone. Pour les fortes concentrations en estradiol (induction d'ovulation par gonadotrophines, femmes enceintes, femmes en phase lutéale ou éventuellement en phase folliculaire), les méthodes directes sont à l'heure actuelle acceptables. Pour les faibles concentrations (femmes ménopausées, hommes), les méthodes avec extraction (et chromatographie) sont pour l'instant supérieures en qualité.

Certaines méthodes directes peuvent également conduire à des résultats erronés dans une autre circonstance : il s'agit des femmes ménopausées subissant un traitement hormonal substitutif par voie orale (13, 14). Deux raisons ont été avancées pour expliquer les discordances observées dans ce cas avec les méthodes incluant une extraction : l'augmentation de la concentration en SHBG (« Sex Hormone-Binding Globulin ») consécutive à la stimulation de sa sécrétion par le traitement estrogénique et l'augmentation des concentrations de métabolites susceptibles d'interférer dans le dosage (estrone, œstrogènes conjugués). Dans de telles conditions, la spécificité analytique de l'anticorps utilisé prend toute son importance.

b) Dosage d'estradiol libre

Il peut être réalisé par dialyse à l'équilibre.

VI.3- Progestérone

Les principales méthodes de dosage de la progestérone (fraction libre + fraction liée à l'albumine + fraction liée à la CBG) sont :

- les méthodes avec extraction suivies d'un radioimmunodosage au tritium (ou à ^{125}I),
- les méthodes avec extraction et chromatographie suivies d'un radioimmunodosage au tritium,
- les méthodes directes
 - avec marqueur enzymatique et détection par spectrophotométrie d'absorption ou luminométrie,
 - avec marqueur fluorescent et détection par fluorimétrie,
 - avec marqueur radioactif (^{125}I) et détection de la radioactivité.

■ VII. ÉTAPE PRÉANALYTIQUE - CONSERVATION DES SPÉCIMENS

Les immunodosages d'hormones stéroïdiennes peuvent être réalisés sur différents milieux biologiques.

VII.1- Sang

La concentration obtenue représente un instantané qui résulte de l'équilibre entre sécrétion et épuration (15).

Le sang veineux, prélevé au pli du coude, est le plus fréquemment utilisé. L'anticoagulant le mieux adapté est l'héparine sous forme d'héparinate de sodium ou de lithium (15 UI/mL de sang). Il est possible de recueillir le sang sur tube sec et d'utiliser le sérum. Après le prélèvement, la centrifugation (pendant 3 à 5 minutes à 2000-3000 g) et la décantation doivent être rapides. Le plasma est ensuite conservé à $+4^{\circ}\text{C}$ s'il est utilisé dans de brefs délais ou à -20°C pour des périodes plus longues (16).

Les prélèvements sont généralement réalisés chez un sujet à jeun, au repos et allongé (augmentation de 300 à 400 % de la concentration d'aldostérone en position debout, par exemple), non stressé. L'heure du prélèvement et

éventuellement le jour du cycle menstruel doivent être indiqués dans le but de faciliter l'interprétation des résultats.

VII.2- Urine

Les hormones stéroïdiennes sont transformées en de nombreux métabolites (plus d'une vingtaine pour le cortisol par exemple) qui sont généralement excrétés dans l'urine sous forme conjuguée. L'urine constitue aujourd'hui un milieu biologique secondaire en exploration endocrinienne, à l'exception de l'aldostérone et du cortisol libre urinaire (15).

Les dosages urinaires portent le plus souvent sur la diurèse de 24 heures. La mesure de la créatininurie a été souvent préconisée pour contrôler le débit urinaire. L'excrétion de la créatinine est en effet stable chez un sujet dont le fonctionnement rénal est normal ($16,5 \pm 5,0$ mmol par jour chez l'homme et $12,5 \pm 4,0$ mmol par jour chez la femme).

Le développement microbien peut entraîner une alcalinisation de l'urine responsable de la dégradation rapide des métabolites (cortisol, aldostérone). Le recueil de l'urine sur un agent conservateur est souhaitable : Merseptyl® (0,05 g/L), azide de sodium. Le dosage d'aldostérone est réalisé sur une diurèse recueillie sur 10 mL d'acide acétique à 30 % (5 mol/L).

VII.3- Salive

La salive peut être assimilée à un ultrafiltrat plasmatique. La concentration salivaire en hormones stéroïdiennes est donc voisine de celle de la forme libre (biodisponible) de ces hormones dans la circulation sanguine. La salive est facile à prélever avec ou sans stimulation de sa sécrétion. Le prélèvement est centrifugé puis, conservé à $+4^\circ\text{C}$ ou à -20°C . On y retrouve différents stéroïdes (cortisol, testostérone,...)

■ VIII. RESULTATS DES ENQUETES INTERLABORATOIRES - ETAT DE L'ART

Depuis la mise en place du contrôle de qualité national en immunoanalyse (1984), quatre hormones stéroïdiennes ont été soumises aux dosages par les participants : cortisol neuf fois (1984, 1985 et de 1988 à 1994), estradiol sept fois (1984, 1990, 1991, 1992, 1993 et 1994 lors des deux opérations), progestérone et testostérone cinq fois (1984 et de 1991 à 1994).

VIII.1- Participation

Tableau I : Nombre de participants (par hormone et par année) au contrôle de qualité national pour les immunodosages d'hormones stéroïdiennes.

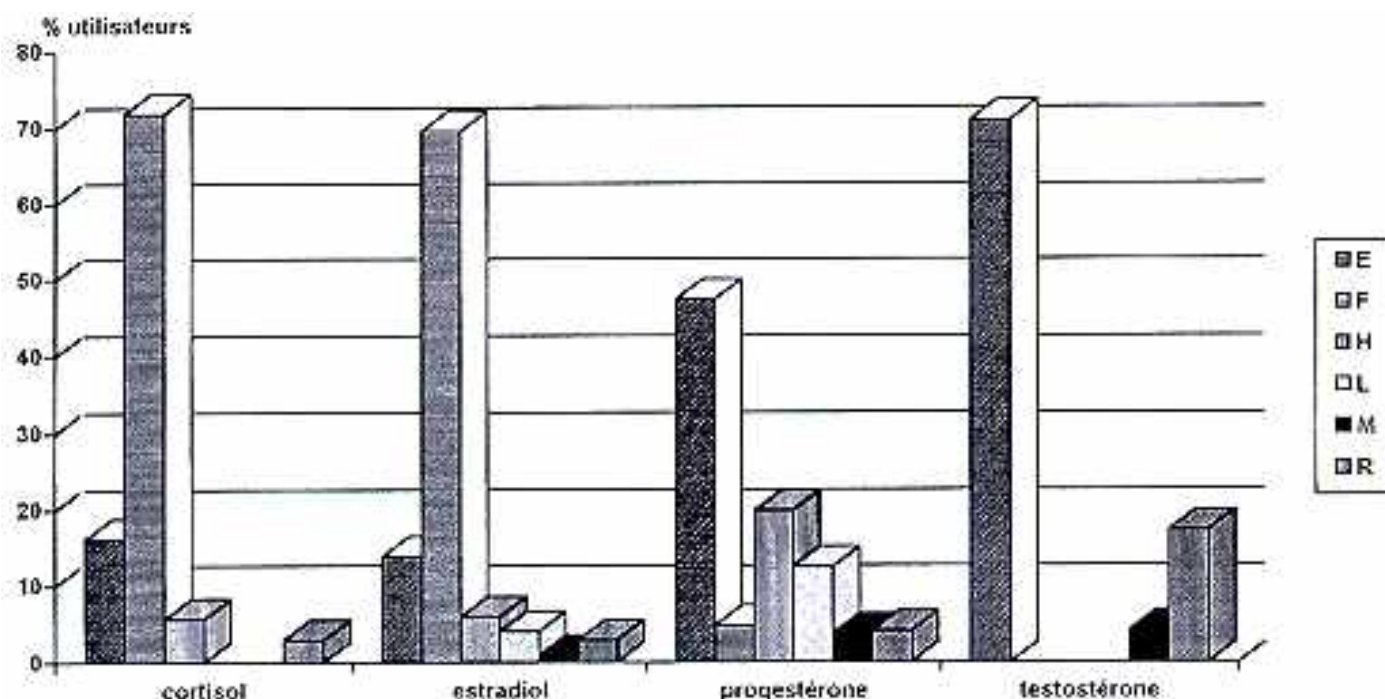
analyte \ année	année									
	1984	1985	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994 (1)	1994 (2)
cortisol	103	144	739	902	1 089	1 324	1 563	1 824	1 527	—
estradiol	38	—	—	—	813	1 066	1 592	2 310	1 969	2 074
progestérone	39	—	—	—	—	965	1 228	1 304	908	—
testostérone	34	—	—	—	—	219	341	332	294	—

L'augmentation régulière de la participation (**Tableau I**) depuis 1984, date à laquelle seuls des radioimmunos dosages existaient, à l'exception de quelques méthodes spectrofluorimétriques pour la mesure du cortisol, s'explique par la disponibilité de plus en plus grande de trousse avec marqueur non radioactif. Bien que cette disponibilité ait été plus précoce pour le cortisol, le nombre de laboratoires réalisant le dosage d'estradiol est devenu le plus important à partir de 1992. La diminution de la participation observée en 1994 par rapport à 1993 s'explique par le regroupement des laboratoires pour effectuer ce type d'analyses. Le dosage de progestérone suit la même évolution avec un léger retard. Enfin, le nombre de participants pour le dosage de testostérone est limité en raison de la législation actuelle qui recommande, notamment pour le dosage de testostérone, chez la femme, l'utilisation d'une étape préalable d'extraction (et éventuellement de chromatographie), conditions qui ne sont réalisées que dans la pratique de certains radioimmunos dosages.

VIII.2- Popularité des techniques

Le nombre total de trousse disponibles en France (1994) est d'environ quinze pour cortisol et estradiol et d'environ dix pour progestérone et testostérone.

La grande majorité des trousse adoptées par les laboratoires (**Figure 5**) est représentée par des méthodes directes (plus de 99 % pour cortisol, estradiol et progestérone et plus de 95 % pour testostérone). Seule la trousse WB avec marqueur tritié (5 utilisateurs pour estradiol et 13 pour testostérone) présente une extraction. Les réactifs avec marque enzymatique et mesure de fluorescence adaptés sur automates, sont majoritaires pour cortisol et estradiol (employés respectivement par 72 % et 70 % des biologistes). Les utilisateurs de trousse à ^{125}I représentent 3 % du total pour cortisol et estradiol, 4 % pour progestérone et 13 % pour testostérone.



- E** Méthodes avec marque enzymatique et mesure spectrophotométrique (Biotrol « 7000S », Boehringer ES, SR1, EIA manuelle)
- F** Méthodes avec marque enzymatique et mesure de fluorescence (AIA 600/1200, IMx, Stratus, Vidas)
- H** Méthodes avec marque enzymatique et mesure de luminescence (Access, Amerlite)
- L** Méthodes avec marque chimique et mesure de luminescence (ACS 180, Magic Lite)
- M** Méthodes avec marque chimique et mesure de fluorescence (Delfia)
- R** Méthodes avec marque radioisotopique et mesure de radioactivité

Figure 5 : Popularité des techniques (% des utilisateurs) lors de l'opération 1994/1 de contrôle de qualité nationale pour les immunodosages d'hormones stéroïdiennes.

VIII.3- Spécimens de contrôle

En raison du volume important de sérum humain nécessaire, les spécimens distribués lors des opérations de contrôle national ont été le plus souvent des préparations d'origine commerciale. Le cahier des charges transmis au fabricant depuis 1993 (spécimen J017) stipule que la concentration en stéroïdes de structure voisine de l'estradiol (estrone et estriol) susceptibles d'interférer dans son dosage doit être faible et correspondre aux situations physiopathologiques les plus couramment rencontrées. Les performances des dosages d'hormones stéroïdiennes (estradiol, progestérone et testostérone) ont également été évaluées à partir de spécimens (H015 en 1991 et H016 en 1992) préparés au laboratoire par enrichissement en ces composés de plasma de donneurs. Par ailleurs, depuis 1990, les hormones stéroïdiennes sont dosées dans tous les spécimens par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en dilution isotopique (CPG-SMDI) (17, 18). Les concentrations obtenues avec cette méthode, qui peuvent être considérées comme une bonne estimation de la « valeur vraie », sont communiquées aux participants.

VIII.4- Performances analytiques des dosages

a) Concordance entre immunodosages et CPG-SMDI

- Cortisol :

La **figure 6a** représente la régression linéaire entre les moyennes générales obtenues sur les six spécimens distribués dans le cadre du contrôle national entre 1990 et 1994, et les valeurs obtenues par CPG-SMDI. On peut constater que celle-ci est très proche de la droite d'identité $Y=X$ même si, comme le montre le graphique des différences (**figure 6b**), les valeurs des immunodosages sont toujours légèrement supérieures à celles de la CPG-SMDI.

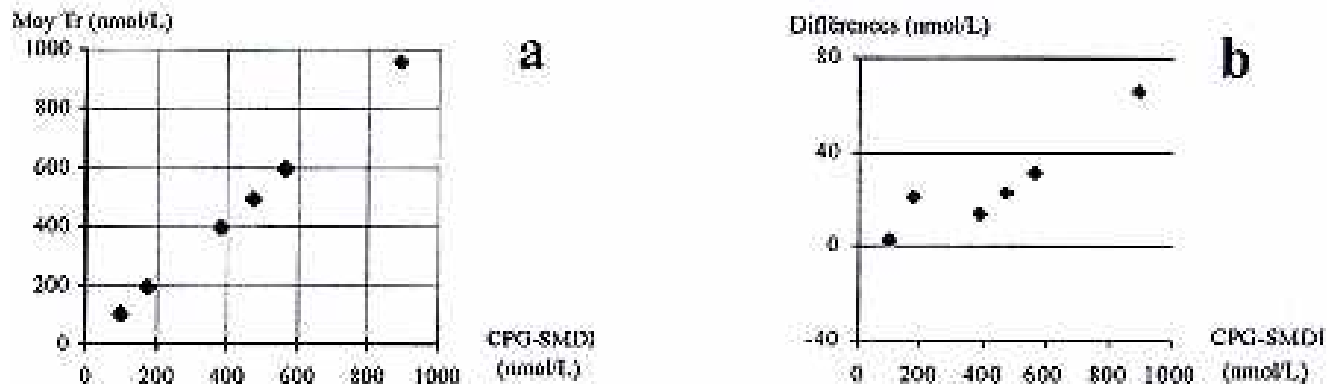


Figure 6 : a) régression linéaire entre moyennes générales des immunodosages de cortisol et valeurs obtenues par CPG-SMDI ;
b) graphique des différences.

- Estradiol :

La meilleure concordance des valeurs fournies par les deux types de méthodes est observée (**Figure 7a et 7b**) lorsque les spécimens sont préparés par enrichissement de sérum de donneurs (spécimen H015 à 554 pmol/L distribué en 1991 et H016 à 1116 pmol/L distribué en 1992) ou lorsque la concentration en composés de structure voisine de l'estradiol est faible. D'autre part, les écarts relatifs les plus grands sont relevés pour les spécimens d'origine commerciale dont la concentration en estradiol est inférieure à 1000 pmol/L (spécimens F013 et J017 distribués respectivement en 1990 et 1993).

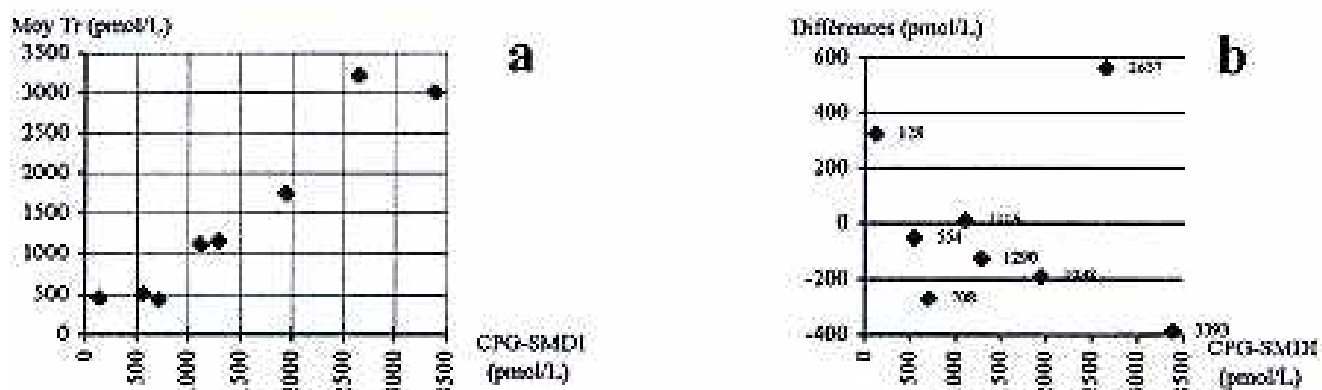


Figure 7 : - a) régression linéaire entre moyennes générales des immunodosages d'estradiol et valeurs obtenues par CPG-SMDI ;
b) graphique des différences.

• Progestérone et testostérone :

Pour ces deux hormones stéroïdiennes, la concordance entre les deux méthodes peut être considérée comme satisfaisante bien que les valeurs moyennes des immunodosages de progestérone soient systématiquement inférieures à celles de CPG-SMDI.

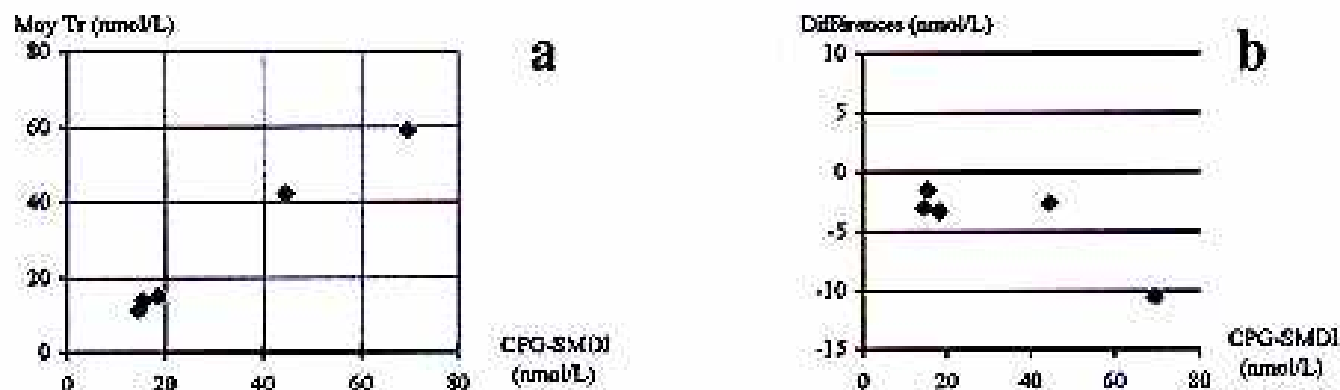


Figure 8 : a) régression linéaire entre moyennes générales des immunodosages de progestérone et valeurs obtenues par CPG-SMDI ;
b) graphique des différences.

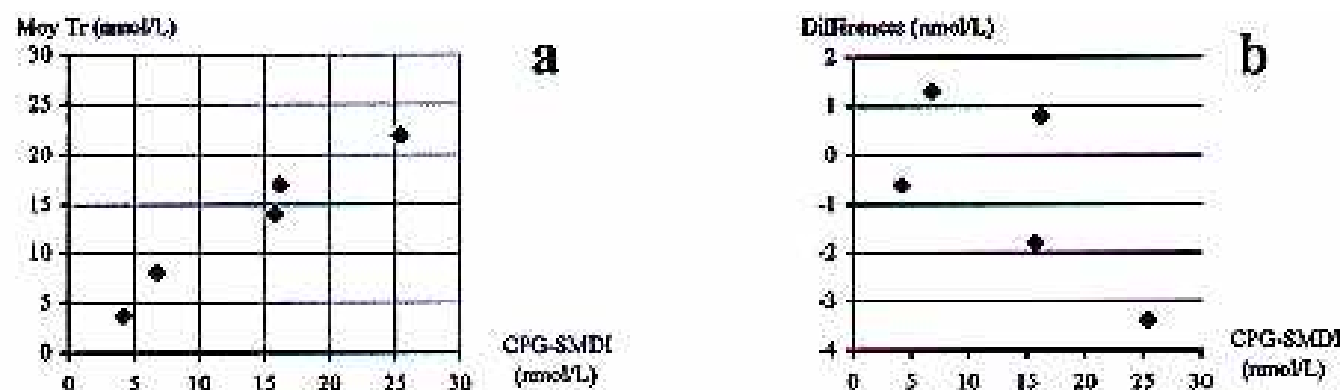


Figure 9 : a) régression linéaire entre moyennes générales des immunodosages de testostérone et valeurs obtenues par CPG-SMDI ;
b) graphique des différences.

b) Concordance entre les différentes trouses

Le **tableau II** résume les performances des immunodosages d'hormones stéroïdiennes appréciées à partir des données les plus récentes du contrôle de qualité national.

• Cortisol :

La variabilité totale dépend peu de la concentration dans le domaine exploré (100 à 1 000 nmol/L). Elle se situe à un niveau tout à fait acceptable (CV Tr voisin de 15 %), ce qui signifie que les trouses disponibles (environ 15) fournissent en moyenne des valeurs peu différentes. De plus, les coefficients de variation obtenus par les utilisateurs de la même trousse sont inférieurs à 13 % pour la moitié des trouses (CV Tr médian) et inférieurs à 15 % pour 80 % d'entre elles. La situation satisfaisante de ce dosage en France est également retrouvée par les organisateurs de programmes de contrôle de qualité externe d'autres pays (19) ; elle est probablement en étroite relation avec le niveau élevé des concentrations à mesurer.

Tableau II : Variabilité totale (CV Tr) et variabilité médiane des utilisateurs de la même trousse (CV Tr médian) dans les différents domaines de concentration explorés au cours du contrôle de qualité national pour les immunodosages d'hormones stéroïdiennes.

Analyte	Concentration	CV Tr (%)	CV Tr médian (%)
cortisol	100 à 300 nmol/L	16	13
	300 à 600 nmol/L	13	11
	600 à 1 000 nmol/L	17	13
estradiol	< 1000 pmol/L	53	19
	1000 à 2000 pmol/L	18	12
	>2000 pmol/L	30	12
progestérone	10 à 20 nmol/L	33	15
	40 à 70 nmol/L	20	14
testostérone	3 à 8 nmol/L	32	21
	14 à 22 nmol/L	19	14

• Estradiol :

La variabilité des valeurs obtenues dépend étroitement de la concentration (**tableau II**). Dans le domaine de concentrations (inférieures à 1000 pmol/L) qui correspond aux valeurs observées au cours du cycle menstruel normal, les écarts entre trousse peuvent être très importants (CV Tr = 53 %). Dans ce domaine, il est également possible de noter une altération de la reproductibilité des techniques (CV compris entre 10 % et 81 % avec un CV Tr médian à 19 %), indiquant la proximité de leur limite de détection. En revanche pour les concentrations plus élevées (supérieures à 1000 pmol/L), si la reproductibilité des techniques est satisfaisante (CV Tr médian = 12 % et CV inférieur à 15 % pour 12 trousse sur 16), la variabilité totale diminue mais demeure à un niveau important et semble dépendre du spécimen (CV Tr à 18 % et 30 % respectivement pour les spécimens IA20 et IA21 de concentrations voisines en estradiol).

De nombreuses études (19, 20, 21, 22) ont souligné les discordances des méthodes directes, soit entre elles, soit par rapport aux immunodosages avec extraction ou aux dosages par spectrométrie de masse. Ces discordances peuvent s'expliquer par une différence de comportement vis à vis de l'anticorps ou des protéines de liaison, entre le stéroïde à doser et le stéroïde marqué dans lequel la marque (^{125}I , enzyme, luminophore,...) est fixée au stéroïde par l'intermédiaire d'un bras de liaison. Ainsi, les agents bloquants déplacent plus difficilement ces stéroïdes marqués que les stéroïdes à doser des protéines de liaison plasmatiques (23). De plus, l'hétérogénéité de concentration et de composition moléculaire des protéines de liaison entre individus (24, 25) rend possible des différences de liaison du stéroïde marqué d'un spécimen à l'autre. Un dosage direct fournit donc des valeurs faussement augmentées pour les spécimens dans lesquels le stéroïde marqué est plus fortement lié que dans les solutions étalons puisque la quantité de stéroïde marqué disponible pour la liaison à l'anticorps est plus faible. L'inverse peut se produire pour les spécimens présentant une capacité de liaison du stéroïde marqué moindre que celle des solutions étalons. Rappelons que la même cause d'erreur se retrouve pour les dosages d'hormones thyroïdiennes libres utilisant des analogues marqués de la T_3 ou de la T_4 qui, en réalité, se fixent sur les protéines de transport (albumine surtout) alors qu'ils sont censés ne pas le faire (26). Un moyen de s'affranchir de cette interférence consiste, par conséquent, à éviter le contact entre le spécimen et l'analogue marqué. Cette condition est réalisée dans les méthodes en deux étapes (26).

• Progestérone et testostérone :

Les immunodosages de ces deux hormones stéroïdiennes, pour lesquels peu de trousse sont actuellement disponibles, sont caractérisés par une importante variabilité totale (CV Tr supérieur à 30 %) pour les faibles concentrations. Les problèmes rencontrés notamment pour le dosage de testostérone chez la femme sont très voisins de ceux qui viennent d'être exposés pour l'estradiol. Les CV obtenus par les utilisateurs d'une même trousse sont légèrement supérieurs à ceux obtenus pour le dosage des deux autres hormones stéroïdiennes (**tableau II**).

■ IX. INTERET PHYSIO-PATHOLOGIQUE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Dans ce paragraphe, toutes les valeurs sont données à titre indicatif en raison des écarts entre méthodes.

IX.1- Cortisol plasmatique

Le cortisol est sécrété dans les zones fasciculée et réticulée des glandes corticosurrénales.

Chez l'homme, dans les conditions physiologiques, le cortisol circule sous forme libre (5 à 10 %) dans le plasma. Le reste est lié à l'albumine (environ 10 %) et pour la plus grande partie (environ 80 à 85 %) à la transcortine (ou CBG), protéine de liaison spécifique de masse molaire égale à 52 000 g.mol⁻¹.

La fraction libre du cortisol est la fraction diffusible donc la fraction biologiquement active. Elle dépend essentiellement des concentrations respectives de cortisol et de CBG.

Par exemple, lorsque la concentration plasmatique de cortisol chez un patient est supérieure à environ 25 µg/100 mL (690 nmol/L.), la CBG (de concentration environ égale à 35 mg/L soit 675 nmol/L) est quasiment saturée. Les concentrations des fractions libre et liée à l'albumine sont alors supérieures aux valeurs normales.

La sécrétion de cortisol est sous contrôle d'un axe neuro-endocrinien (axe hypothalamus-hypophyse-surrénales). Le CRF (« corticotropin-releasing factor ») et l'AVP (arginine-vasopressine), libérés par l'hypothalamus, traversent le système porte et stimulent la libération d'ACTH (« adreno corticotropic hormone ») au niveau de l'antéhypophyse. Celle-ci stimule la sécrétion de cortisol et d'autres stéroïdes par les corticosurrénales.

De ce fait, la sécrétion de cortisol :

- subit un rythme circadien,
- est sensible au stress,
- obéit à un rétrocontrôle par les glucocorticoïdes (une diminution du cortisol libre plasmatique entraîne une stimulation de l'axe hypothalamus-hypophyse, et inversement).

a) Principales variations physiologiques

- Rythme circadien chez un sujet normal :

Heure	Concentration (µg/100mL)	Concentration (nmol/L)
8	7,4 à 19,8 ($\bar{\chi}$ =13,6)	204 à 546 ($\bar{\chi}$ =375).
12	4,9 à 14,9 ($\bar{\chi}$ =9,9)	135 à 411 ($\bar{\chi}$ =273)
16	4,4 à 10,7 ($\bar{\chi}$ =7,5)	121 à 295 ($\bar{\chi}$ =207)
20	0,5 à 8,1 ($\bar{\chi}$ =4,3)	14 à 223 ($\bar{\chi}$ =119)
24	0,5 à 5,9 ($\bar{\chi}$ =2,9)	14 à 163 ($\bar{\chi}$ =80)

- Femme sous œstro-progestatifs ou femme enceinte :

En raison de l'augmentation de la synthèse de la CBG liée à l'imprégnation estrogénique, les valeurs ci-dessus sont augmentées, voire quasiment doublées.

Cependant, le rythme circadien est conservé et les concentrations de cortisol libre pratiquement normales.

b) Principales variations pathologiques

- Syndrome de Cushing (hypercorticisme)

Les concentrations de cortisol à 8 h sont élevées (mais parfois normales). En revanche, il y a toujours perte du rythme circadien.

Exemples :

<i>Corticosurréalome malin (syndrome de Cushing ACTH indépendant)</i>	<i>Maladie de Cushing (syndrome de Cushing ACTH dépendant)</i>
8 h 39,7 µg/100 mL (1 095 nmol/L)	8 h 14,9 µg/100 mL (411 nmol/L)
12 h 40,3 µg/100 mL (1 112 nmol/L)	12 h 17,2 µg/100 mL (475 nmol/L)
16 h 41,5 µg/100 mL (1 145 nmol/L)	16 h 12,8 µg/100 mL (353 nmol/L)
20 h 40,0 µg/100 mL (1 104 nmol/L)	20 h 15,5 µg/100 mL (428 nmol/L)
24 h 39,9 µg/100 mL (1 100 nmol/L)	24 h 12,5 µg/100 mL (345 nmol/L)

- Insuffisances surrénales lente et aiguë

Le cortisol est diminué à 8 h le matin puis dans le reste du nyctémère. Si l'insuffisance est d'origine périphérique (corticosurrénale), l'ACTH est très augmentée.

- Hyperplasies congénitales des surrénales :

Les déficits en 17, 21 et 11-hydroxylase entraînent une diminution de la concentration de cortisol.

- Situations de stress psychique ou physique prolongé (syndromes dépressifs, anorexie mentale, affections graves aiguës ou chroniques,...) provoquant une perturbation du rythme circadien, voire son abolition.

- Hypercorticisme médicamenteux.

- Hypercorticisme d'entraînement chez l'obèse : le cortisol plasmatique est augmenté.

Pour préciser le diagnostic, une batterie de tests dynamiques suivis d'un dosage de cortisol sont à la disposition du clinicien et du biologiste : test au Synacthène®, test à la métopirone, test au CRF, hypoglycémie insulinique, tests de freinage au Dectancyl®, etc... (27, 28, 29)

IX.2- Cortisol libre urinaire (CLU)

Environ 1 % du cortisol est éliminé dans les urines sans être préalablement métabolisé ou conjugué. Cette fraction est appelée cortisol libre urinaire. La concentration de CLU peut être mesurée à l'aide d'un immunodosage avec marqueur

- directement sur les urines,

- après extraction liquide-liquide (dichlorométhane le plus souvent),

- après extraction puis purification chromatographique (célite, Séphadex LH20®, HPLC).

La concentration de CLU peut être mesurée également après extraction, HPLC puis détection par fluorimétrie ou spectrophotométrie d'absorption.

• Valeurs de référence :

chez l'homme de 15 à 145 nmol/24 h

chez la femme de 10 à 105 nmol/24 h

• Variations pathologiques :

le CLU est augmenté dans le syndrome de Cushing,

le CLU est subnormal dans l'obésité.

Les concentrations de CLU peuvent être mesurées également au cours de tests dynamiques (tests de freinage au Dectancyl®) pour affiner le diagnostic (27, 28, 29).

IX.3- Testostérone plasmatique

Chez l'homme, la testostérone (T) est sécrétée par les cellules endocrines de Leydig du testicule. Cette sécrétion est sous contrôle d'une gonadotrophine hypophysaire, « l'interstitial cell stimulating hormone » (ICSH) ou LH (« luteinizing hormone ») chez la femme, appelée à tort LH chez l'homme.

Chez la femme, la T provient de la surrénale (environ 10 à 15 %), de l'ovaire (environ 30 %) et de la conversion périphérique, surtout hépatique et cutanée, de stéroïde (environ 55 à 60 %).

La T circule dans le sang en partie libre (environ 1 à 2 %), en partie liée à l'albumine (environ 30 à 40 %) et en partie liée à la SHBG appelée aussi TeBG (« Testosterone estradiol-Binding Globulin ») ou SBP (environ 60 à 70 %).

La T biodisponible est la fraction de la T non liée à la SHBG. Elle est donc représentée par la T libre et la T liée à l'albumine. Il existe des méthodes de mesure de la T non liée à la SHBG.

Les méthodes habituelles dosent la T totale (T libre + T liée à l'albumine + T liée à la SHBG).

a) Variations physio-pathologiques chez l'homme (30)

• Variations physiologiques :

la T totale est élevée chez le nouveau-né. Elle diminue ensuite dans les jours suivant la naissance puis remonte sous l'effet d'une sécrétion des gonadotrophines. Elle reste élevée pendant les trois premiers mois de la vie (concentration égale à la moitié de la concentration d'un adulte). Pendant l'enfance, le testicule est au repos et la concentration de T totale basse. À la puberté, la concentration augmente pour devenir maximale chez l'adulte jeune (10,4 à 31,2 nmol/L selon les individus).

Il existe chez le sujet jeune un rythme circadien avec une concentration maximale le matin et minimale en fin d'après-midi.

La T totale diminue avec l'âge de manière progressive et variable selon les individus.

• Variations pathologiques :

- une diminution de la concentration de T totale met en évidence un déficit de la sécrétion endocrine du testicule (**hypogonadisme**), qu'il soit d'origine périphérique (testiculaire) ou central (hypothalamo-hypophysaire) ; des tests dynamiques avec dosages de T totale sont possibles pour affiner le diagnostic (27, 28, 29).

- Une- augmentation de la concentration de T totale est rare. Elle a souvent pour origine une augmentation de la concentration de SHBG (par exemple au cours de l'hyperthyroïdie).

b) Variations physio-pathologiques chez la femme

• Variations physiologiques :

la concentration de T totale mesurée en début de phase folliculaire est comprise entre 0,35 et 1,39 nmol/L ; cette concentration est légèrement plus élevée au moment du pic ovulatoire et en phase lutéale.

• Variations pathologiques :

une augmentation de la production d'androgènes et en particulier de la T chez la femme est à l'origine d'un hirsutisme associé de façon variable à des troubles des règles, à une acné, à une alopecie, ... ; l'exploration doit déterminer l'origine surrénalienne, ovarienne ou mixte de l'hyperandrogénie.

Principales causes d'hirsutisme, avec T totale augmentée :

- tumeurs virilisantes
- . corticosurréalomes
- . tumeurs ovariennes virilisantes

Les concentrations de T totale sont en général supérieures à 5,2 nmol/L.

- hyperandrogénies ovariennes :
syndrome des ovaires polykystiques (OPK) principalement.
- hyperandrogénies surrénaliennes :
déficit en 21-hydroxylase à révélation tardive.
- hyperandrogénies d'origine mixte.

Dans ces trois dernières pathologies, les concentrations de T totale sont en général comprises entre 1,39 et 3,47 nmol/L.

NB : il existe des hirsutismes sans augmentation des androgènes. La concentration de T totale est normale. Il s'agit de l'hirsutisme idiopathique dû, semble-t-il, soit à une diminution de la concentration de SHBG ayant pour conséquence une augmentation de la T biodisponible, soit à une augmentation de l'activité 5 α -réductase de la peau et du follicule pileux entraînant une augmentation de la 5 α DHT.

IX.4- Estradiol plasmatique

Chez la femme, l'estradiol est sécrété par les cellules de la granulosa en phase folliculaire, puis par les cellules de la thèque interne du corps jaune en phase lutéale. Cette sécrétion est soumise à une régulation hypothalamo(GnRH « gonadotropin releasing hormone »)-hypophysaire (FSH, LH).

Chez l'homme, l'estradiol plasmatique provient de la sécrétion testiculaire d'une part, de l'aromatation périphérique de la testostérone d'autre part.

L'estradiol circule en partie libre (environ 1 %) et en partie lié à des protéines de liaison spécifique (environ 40 % à la SHBG) et non spécifique (environ 60 % à l'albumine).

a) Valeurs de référence

- chez l'homme de 48 à 165 pmol/L
- Chez la femme, la sécrétion d'estradiol est faible en début de phase folliculaire. Elle augmente ensuite rapidement avec un maximum avant l'ovulation, puis décroît :
 - concentration en phase folliculaire de 92 à 367 pmol/L,
 - concentration en phase lutéale de 283 à 1 100 pmol/L.

b) Principales indications

- Chez l'homme, l'estradiol peut être augmenté :
 - dans les leydigomes, les corticosurrénales, la gynécomastie,
 - lors des augmentations de la SHBG (hyperthyroïdie par exemple).
- chez la femme, le dosage d'estradiol est nécessaire, souvent couplé à d'autres dosages (progestérone, FSH, LH, prolactine), aux diagnostics suivants :
 - aménorrhées I et II,
 - dysoovulations et anovulations,
 - infertilité,
 - ménopause (diagnostic et surveillance du traitement),

Il est également très utile lors des inductions d'ovulation. Sa mesure à l'aide d'une méthode rapide permet d'adapter au jour le jour les doses de gonadotrophines et d'éviter ainsi les risques d'hyperstimulation.

IX.5- Progestérone plasmatique

Chez la femme, la progestérone est sécrétée par les cellules lutéales granuleuses du corps jaune, après l'ovulation. Sa concentration plasmatique est donc faible en phase folliculaire. Elle augmente après la constitution du corps jaune pour atteindre sa valeur maximale vers le 21^{ème} jour du cycle. La progestérone circule en partie libre, en partie liée à la CBG et en partie liée à l'albumine.

a) Valeurs de référence

Chez la femme en phase folliculaire : valeurs inférieures à 0,8 µg/L (<2,5 nmol/L).

Chez la femme en phase lutéale (21^{ème} jour du cycle soit environ J+6 après ovulation) : la concentration de progestérone doit être supérieure à 10 µg/L (>31,8 nmol/L).

Chez l'homme : valeurs inférieures à 0,8 µg/L (<2,5 nmol/L).

b) Intérêt du dosage de progestérone en pathologie

Chez la femme avec anovulation, dysoovulation, infertilité,... :

- une concentration (à 14 < J < 30) inférieure à 0,8 µg/L (2,5 nmol/L) signe une absence d'ovulation,
- une concentration comprise entre 0,8 et 10 µg/l (2,5 et 31,8 nmol/l) à J+3, J+6 et J+9 après l'ovulation signe une insuffisance lutéale,
- une concentration de progestérone normale pendant une durée insuffisante signe une phase lutéale courte.

■ X. CONCLUSION

Les principaux enseignements de ce chapitre peuvent être résumés de la manière suivante :

- pour les stéroïdes, **les méthodologies de dosage doivent être d'autant plus performantes que la concentration du stéroïde à doser est faible**. Ainsi, pour des stéroïdes de concentration plasmatique relativement élevée (sulfate de déhydroépiandrostérone, cortisol, testostérone chez l'homme), les méthodes directes sont satisfaisantes quelle que soit la nature du marqueur utilisé ;
- la variabilité plus grande, liée à la détection des marqueurs non radioactifs est souvent compensée par une variabilité plus faible au niveau de la réaction immunochimique, non précédée d'une étape d'extraction voire de chromatographie, mais en revanche souvent automatisée ;
- **pour les stéroïdes de concentration plasmatique relativement faible** (estradiol chez l'homme et la femme ménopausée, testostérone chez la femme,...). **les méthodes avec extraction et chromatographie éventuelle suivies d'un dosage radioimmunologique avec stéroïde tritié sont pour l'instant de meilleure qualité que les méthodes directes** ;
- cependant, les **progrès réalisés** dans les domaines de l'application des **méthodes immunométriques** aux dosages d'haptènes, de la fabrication des anticorps et des phases solides, des marqueurs et de leur détection et de l'**automatisation** laissent envisager à moyen terme la mise sur le marché probable de méthodes directes permettant la détermination avec précision et justesse de la concentration de toutes les hormones stéroïdiennes dans le sang périphérique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ABRAHAM GE. Radioimmunoassay of steroids in biological materials. Acta Endocrinol Suppl, 1974, 183,1-41
- 2- SELF CH, DESSI JL, WINGER LA. High performance assays of small molecules: enhanced sensitivity, rapidity and convenience demonstrated with a noncompetitive immunometric anti-immune complex assay system for digoxin. Clin Chem, 1994, 40, 2035-41
- 3- ULLMAN EF, MILLBURN G, JELESKO J, RADIKA K, PIRIO M, KEMPE T et al Anti-immune complex antibodies enhance affinity and specificity of primary antibodies. Proc Natl Acad Sci, USA 1993, 90, 1184-9
- 4- SELF CH, DESSI JL, WINGER LA. Novel developments in immunoassay. Proc UK NEQAS Meeting, 1994, 1, 171-5
- 5- BARNARD G, KOHEN F. Idiometric assay : noncompetitive immunoassay for small molecules typified by the measurement of estradiol in serum. Clin Chem 1990, 36, 1945-50
- 6- FRANEK M. Structural aspects of steroid-antibody specificity. J Steroid Biochem, 1987, 28, 95-108
- 7- FIET J, GALONS H, VILLETTE JM, BOUDOU P, GUECHOT J, GUEUX B, GOURMEL B et al. Problèmes particuliers posés par l'immunodosage des stéroïdes. Immunoanal Biol. Spec, 1990, 22, 41-52.
- 8- PIKETTY ML et al. La réaction croisée en immuno-analyse. Immunoanal Biol. Spec, 1994, 9, 285-92
- 9- FUQUA JS, SHER ES, MIGEON CJ, BERKOVITZ GD. Assay of plasma testosterone during the first six months of life : importance of chromatographic purification of steroids. Clin Chem, 1995, 41/8, 1146-9
- 10- MAKELA SK, ELLIS G. Nonspecificity of a direct 17 α -hydroxyprogesterone radioimmunoassay kit when used with samples from neonates. Clin Chem, 1988, 34, 2070-5
- 11- DECHAUD H, LEJEUNE H, GAROSCLO-CHOLET M, MALLEIN R, PUGEAT M. Radioimmunoassay of testosterone not bound to sex-steroid binding protein in plasma. Clin Chem, 1989, 35/8, 1609-14
- 12- DUPRET-CARRUEL J, NGUYEN DHIN T, COURTE C. Les générations successives d'immunodosages. Réflexions sur le dosage direct de l'estradiol-17 β , Immunoanal Biol Spéc, 1990, 20, 81-6
- 13- COOK NJ, READ GF. Oestradiol measurement in women on oral replacement therapy : the validity of commercial test kits. Br J Biomed Sci, 1995, 52, 97-101
- 14- LICHTENBURG V, SCHULTE-BAUKLOH A, LINDNER C, BRAENDLE W. The results of serum oestradiol determination from women receiving oestrogen replacement therapy are discrepant using different immunoassay kits. Lab Med, 1992, 16, 412-18

- 15- REVOL A. Méthodes d'analyses utilisées dans l'exploration des systèmes hormonaux, pp 17-47 dans *Endocrinologie, diabète, nutrition pour le praticien* (J. TOURNIAIRE). Simep (éd). 1994
- 16- DIVER MJ, HUGHES JG, HUTTON JL., WEST CR, HIPKIN LH. The long-term stability in whole blood of 14 commonly-requested hormones analytes. *Ann Clin Biochem*, 1994, 31, 561-5
- 17- DEHENNIN L. Estradiol-17 β determined in plasma by gaz chromatographic-mass spectrometry with selected ion monitoring of mixed silyl ether-perfluoracyl ester derivatives and use of various stable-isotope-labelled internal standards. *Clin Chem*, 1989, 35/4, 532-6
- 18- PATRICOT MC, MATHIAN B, SERPENTIE S, REVOL A. Determination of urinary estradiol using an enzymatic method during the menstrual cycle. Comparison with a method using isotope dilution - mass spectrometry. *Clin Chim Acta*, 1986, 158, 139-46
- 19- MIDDLE JG, SINGH GK. UK National quality assessment schemes for steroid hormones. *Proc UK NEQAS Meeting*, 1994, 1, 182-194
- 20- BADONNEL Y, BARBE F, LEGAGNEUR H, BARBARINO P, LANDES P, GUILLET-MAY F. Problèmes méthodologiques du dosage de l'estradiol au cours des procréations médicalement assistées. *Immunoanal Biol Spéc*, 1994, 9, 172-6
- 21- SCHIOLER V, THODE J. Six direct radioimmunoassays of oestradiol evaluated. *Clin Chem*, 1988, 34, 949-52
- 22- LEE CS, SMITH NM, KAHN SN. Analytic variability and clinical significance of different assays for serum estradiol. *J Reprod Med*, 1991, 36, 156-60
- 23- MICALLEF JV, HAYES MM, LATIF A, AHSAN R, SUFI SB. Serum binding of steroid tracers and its possible effects on direct steroid immunoassay. *Ann Clin Biochem*, 1995, 32, 566-74
- 24- HAMMOND GL. Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sex-steroid binding proteins. *Endocr Rev*, 1990, 11, 65-79
- 25- CORNELISSE MM, BENNET PE, CHRISTIANSEN M, BLAAKAER J, GLUUD R, ANDERSEN JR. Sex hormone binding globulin phenotypes : their detection and distribution in healthy adults and in different clinical conditions. *Clin Chim Acta*, 1994, 225, 115-21
- 26- EKINS R. The free hormone hypothesis and the remeasurement of free hormone. *Clin Chem*, 1992, 38, 1289-93
- 27- TOURNIAIRE J. *Endocrinologie, diabète, nutrition pour le praticien*. Simep (éd). 1994
- 28- HAZARD J, PERLEMUTER L. *Endocrinologie (Abrégés)*. Masson (éd). 1990
- 29- BRICAIRE H, BAULIEU E, LEPRAT J. *Glandes endocrines*. Flammarion Médecine Sciences (éd).
- 30- LEJEUNE H, DECHAUD H. Dosage de la testostérone plasmatique chez l'homme. *Andrologie*, 1994, 2, 216-22

ANTIGENE CARBOHYDRATE 15-3 (CA 15-3)

A. BEAUDONNET, R. COHEN

I - INTÉRÊT PHYSIOPATHOLOGIQUE

II - STRUCTURE

III - TECHNIQUES DE DOSAGE

IV - RÉSULTATS DES ENQUÊTES INTERLABORATOIRES

V - RÉSULTATS OBTENUS SUR LES SÉRUMS DE PATIENTS

VI - ÉTAPE PRÉANALYTIQUE - CONSERVATION DES SPÉCIMENS

VII - INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

VIII - MCA - CAM26 - CAM29 - CA 549

IX - LÉGISLATION

X - CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

■ I. INTÉRÊT PHYSIOPATHOLOGIQUE

L'antigène carbohydrate 15-3 (CA 15-3) est un antigène circulant associé plus particulièrement aux tumeurs mammaires humaines. Il a été défini par deux anticorps monoclonaux différents (115D8 et DF3).

Les études immunohistochimiques ont montré la présence de CA 15-3 à la surface et dans le cytoplasme de 87 % des tumeurs malignes primaires du sein et dans le cytoplasme de près de 100 % des métastases des cancers du sein quelle qu'en soit la localisation (ganglionnaire ou métastases à distance). Cet antigène est aussi retrouvé en bordure apicale des cellules épithéliales différenciées des lésions mammaires bénignes (1, 2).

L'anticorps 115D8 reconnaît l'antigène de différenciation situé à la surface des cellules épithéliales de la glande mammaire et se lie à une glycoprotéine appelée MAM-6 présente sur la plupart des cellules épithéliales normales et cancéreuses de plusieurs organes (sein, utérus, ovaires, prostate, vessie, estomac, côlon et poumons) (2).

L'anticorps DF3 reconnaît un autre épitope du complexe MAM-6 présent au pôle apical des cellules épithéliales mammaires les plus différenciées et dans le cytoplasme des cellules moins différenciées (1). L'antigène DF3 a été aussi mis en évidence dans le cytoplasme des tumeurs malignes de l'ovaire et au pôle apical des tumeurs bénignes de l'ovaire (3).

Le CA 15-3 est le marqueur le plus utilisé en **pathologie tumorale du sein**. Cependant, comme pour les autres marqueurs tumoraux, sa spécificité est limitée et sa sensibilité est faible au moment du diagnostic, puisque seulement 5 à 39 % des patientes avec un cancer localisé ont une concentration sérique élevée (4, 5, 6, 7, 8).

Les résultats de différentes études évaluant une éventuelle corrélation entre la concentration de CA 15-3 et les facteurs pronostiques (taille de la tumeur primitive, envahissement ganglionnaire, degré de différenciation histologique et récepteurs hormonaux d'œstrogènes et de progestérone) sont contradictoires. Certains auteurs ont trouvé une corrélation entre la concentration de CA 15-3 et la taille de la tumeur, ainsi qu'avec l'envahissement ganglionnaire (9). D'autres auteurs ont noté une corrélation uniquement entre la fréquence de positivité du CA 15-3 et la taille de la tumeur (8), alors que d'autres études n'ont montré aucune corrélation (7, 10).

Les principales indications du dosage sérique du CA 15-3 en pathologie tumorale du sein sont les suivantes :

- au **moment du diagnostic pour avoir une valeur de référence**,
- au **cours de la surveillance d'un cancer du sein**, en raison de la corrélation existante entre les variations de ce marqueur et l'évolution clinique de la maladie (11). L'augmentation du CA 15-3 est souvent le premier signe de métastases d'un Cancer du sein (5, 12, 13). Cette augmentation peut précéder de plusieurs mois la découverte clinique des métastases, en particulier osseuses ou hépatiques. Lors de la découverte des métastases, le taux de CA 15-3 a une valeur prédictive de survie, des valeurs élevées de CA15-3 sont associées à un mauvais pronostic à court terme (14). En cas de récurrence loco-régionale, la sensibilité de ce marqueur est faible, mais son augmentation constitue alors un facteur pronostique important de métastases ultérieures (12).
- au **cours de la surveillance d'une chimiothérapie ou d'une hormonothérapie** en raison de la bonne corrélation entre la concentration du CA 15-3 et la réponse clinique au traitement (7, 10, 11).

Le CA 15-3 ne possède pas de spécificité d'organe, les deux anticorps monoclonaux utilisés pour son dosage reconnaissant des glycoprotéines présentes dans de nombreux tissus, On observe des taux pathologiques dans 10 à 51 % des cancers autres que mammaires, en particulier les cancers ovariens, pulmonaires, gastriques, colorectaux, pancréatiques ainsi que les cancers du col utérin et de l'endomètre (5, 7, 11).

Moins fréquemment, **les pathologies bénignes** peuvent également être à l'origine d'une élévation du CA 15-3.

Dans ce cas, l'augmentation est modérée et est observée :

- dans les maladies bénignes du sein (5, 7),
- au cours des maladies hépatiques (hépatites, cirrhoses du foie) (16, 17),
- au cours des sarcoïdoses, tuberculoses, maladies auto-immunes, gastro-entérites, ulcères duodénaux et polyposes du côlon (5).

■ II. STRUCTURE

Le CA 15-3 a été défini par deux anticorps monoclonaux (115D8 et DF3) qui reconnaissent des épitopes répétitifs situés sur des glycoprotéines de type mucine. Ces glycoprotéines possèdent une masse molaire élevée (de 300 000 à 450 000 g.mol⁻¹) et sont codées par le gène MUC-1. La partie protéique est constituée par la répétition de séquences de vingt acides aminés riches en sites de glycosylation. L'anticorps **115 D8**, obtenu à partir de souris immunisées avec des membranes de globules lipidiques de lait humain, est dirigé contre une partie carbohydrate de la molécule. L'anticorps **DF3**, obtenu à partir de souris immunisées avec une lignée cellulaire (MCF-7) provenant d'un carcinome du sein métastatique, est dirigé contre une partie protéique de la molécule.

Dans le sérum, la molécule circule sous forme de complexe polymérique de masse molaire élevée. La demi-vie plasmatique du CA 15-3 est de 8 à 10 jours.

■ III TECHNIQUES DE DOSAGE

III.1- Principe

Les méthodes de dosage du CA 15-3 utilisant les anticorps 115D8 et DF3 sont de type immunométrique avec marqueur.

Le premier test décrit en 1982 utilisait un marqueur radioactif (¹²⁵I) et des billes de polystyrène comme support (18). Depuis, des techniques de dosage utilisant d'autres marqueurs (enzymatique, luminescent) et d'autres supports (microplaques, tubes, tubes « revêtus » de streptavidine, microparticules, billes) ont été développées et commercialisées.

Lors de l'enquête du contrôle national de qualité de juin 1994, les techniques avec détection d'un signal photométrique et radioactif étaient utilisées par respectivement 87,6 et 6,7 % des 803 laboratoires effectuant ce dosage (5,7 % des techniques n'étant pas codées ou insuffisamment représentées). Depuis, des méthodes avec détection d'un signal fluorescent et chimiluminescent ont été développées.

III.2- Anticorps

La plupart des méthodes actuelles de dosage du CA 15-3 utilisent les deux anticorps monoclonaux 115D8 et DF3 décrits initialement (anticorps 115D8 fixé sur le support et anticorps DF3 marqué).

Ces deux anticorps étant protégés par un brevet, des anticorps monoclonaux reconnaissant d'autres épitopes ont été développés par d'autres firmes et sont utilisés dans différents tests récemment commercialisés sous les noms de BR, BR-MA et BCA.

Le test BR, de type compétitif en chimiluminescence, utilise l'anticorps B27-29 qui reconnaît une partie protéique voisine de celle reconnue par l'anticorps DF3. Les tests BR-MA et BCA sont des dosages immunométriques utilisant deux anticorps différents.

Ces différents dosages sont enregistrés auprès de l'Agence du Médicament pour la détermination du CA 15-3.

III.3.- Étalon

Il n'existe pas actuellement de référence internationale. Les étalons sont préparés avec du CA15-3 extrait d'une lignée cellulaire provenant d'un cancer du sein (18). Les résultats sont exprimés en unités arbitraires U/mL ou kU/L.

III.4- Causes d'erreurs

- Effet « crochet »

Les techniques immunométriques et en particulier les techniques en un temps sont sensibles à l'effet « crochet » qui apparaît pour des concentrations très élevées en antigène. Cet effet « crochet » est à l'origine d'une sous-estimation des résultats (voir cahier de formation en immunoanalyse n° 2, mai 1995, pp 21-22). La concentration à partir de laquelle cet effet « crochet » peut apparaître doit être déterminée avec chaque méthode de dosage. Dans le cas du CA 15-3, des concentrations pouvant atteindre 10 000 kU/L ont été décrites dans certains cancers du sein avec métastases (7).

- Anticorps hétérophiles

La présence éventuelle d'anticorps humains anti-souris (HAMA) chez des patients ayant reçu des préparations d'anticorps monoclonaux de souris à des fins diagnostiques ou thérapeutiques peut entraîner des résultats erronés, en général surestimés (voir cahier de formation en immunoanalyse, n° 2, mai 1995, pp 22-24).

■ IV. RÉSULTATS DES ENQUÊTES INTERLABORATOIRES

Le dosage du CA 15-3 a été proposé pour la première fois lors de la onzième enquête du contrôle national (juin 1994). Deux sérums, l'un de concentration proche du seuil de positivité (27,8 kU/L pour MT18) et l'autre de concentration élevée (82,3 kU/L pour MT19) ont été distribués.

Les variations intertechniques sont moins importantes que celles que l'on peut observer lors du dosage du CA 19-9. En effet, les CV tronqués, toutes techniques confondues, observés lors de cette enquête, sont respectivement de 13,2 et 15,7 % pour les sérums MT 18 et MT 19.

Sur la **figure 1** ci-dessous, sont indiquées les moyennes des techniques les plus utilisées exprimées en pourcentage de la moyenne générale.

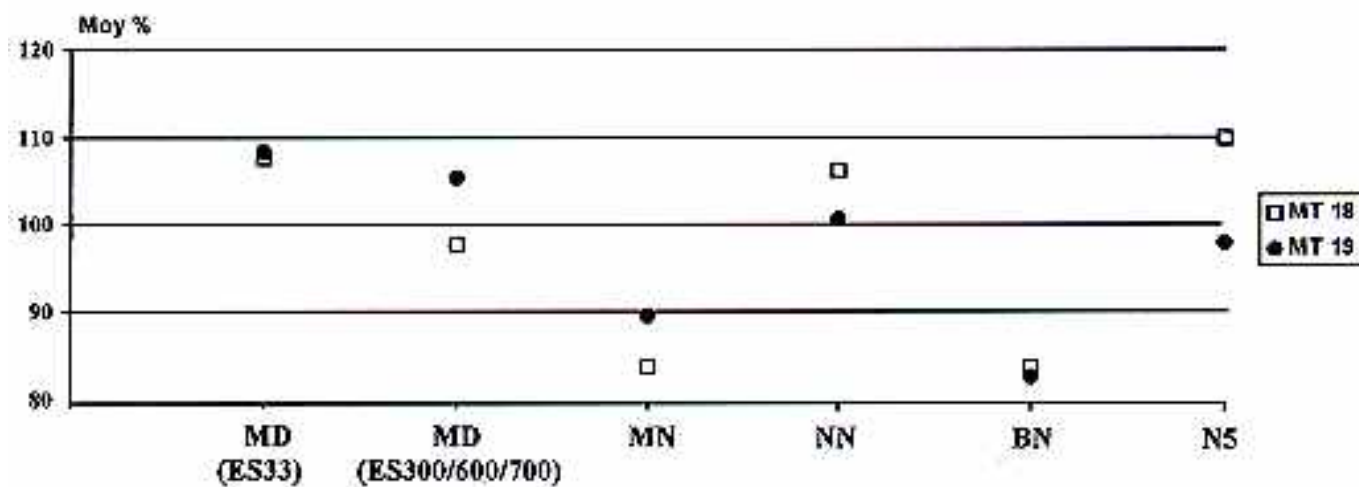


Figure 1 : Moyenne des techniques les plus utilisées, exprimées en % de la moyenne générale, au cours de l'opération de contrôle national (juin 1994.).

En ce qui concerne la reproductibilité interlaboratoire, les CV Tr obtenus par technique sont inférieurs ou proches de 10 % avec la majorité des systèmes analytiques représentés (**figure 2**).

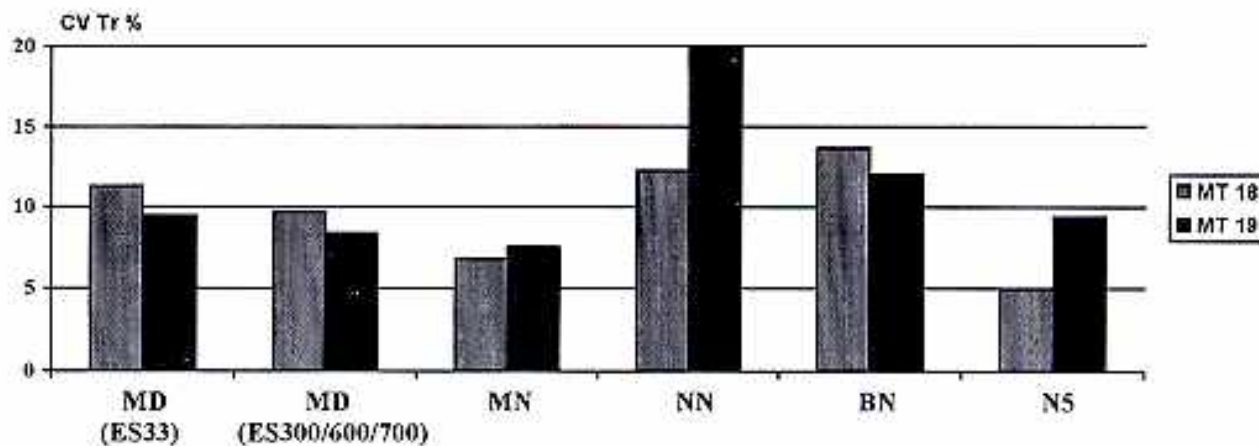


Figure 2 : Reproductibilité interlaboratoire des techniques les plus utilisées, au cours de l'opération de contrôle national (juin 1994).

■ V. RÉSULTATS OBTENUS SUR LES SÉRUMS DE PATIENTS

Les études comparatives intertechniques (réalisées avec les méthodologies utilisant les anticorps 115D8 et DF3 initialement décrits) montrent en général une bonne concordance des résultats (19, 20, 21). La fréquence de discordances est de l'ordre de 3 %, donc plus faible que celles que l'on peut observer lors du dosage de CA 125 ou de CA 19-9 (19). Néanmoins, pour certains sérums, ces discordances peuvent être importantes et entraîner une interprétation différente. Comme pour les autres marqueurs, les valeurs de référence doivent être déterminées pour chaque technique et le suivi d'un même patient effectué avec la même méthode.

■ VI. ÉTAPE PRÉANALYTIQUE - CONSERVATION DES SPÉCIMENS

VI.1- Prélèvement

Le prélèvement (avec ou sans anticoagulant) doit être effectué selon les recommandations du fabricant, En cas de suivi d'un patient, il est conseillé de toujours utiliser le même type de prélèvement. Les interférences éventuelles dues à l'hémolyse, à l'hyperbilirubinémie et à l'hypertriglycémie doivent être testées avec chaque système analytique.

Le prélèvement doit subir une nouvelle centrifugation avant analyse, s'il n'est pas limpide.

VI.2- Conservation des spécimens

Les prélèvements peuvent être conservés à + 4 °C pendant vingt-quatre heures et il est conseillé de les congeler si le dosage est réalisé au-delà de cette période.

Les cycles de congélation-décongélation sont à éviter.

■ VII. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats de CA 15-3 peuvent dépendre des techniques utilisées, les valeurs ci-dessous ne sont donc données qu'à titre indicatif. Par ailleurs, les données indiquées ci-dessous ont été obtenues à partir d'études réalisées avec les méthodologies utilisant les premiers anticorps monoclonaux décrits pour la détermination du CA 15-3 (115D8 et DF3).

VII.1- Valeurs de référence

Les valeurs de CA 15-3 déterminées dans une population indemne de toute pathologie sont inférieures à 25 kU/L ou inférieures à 30 kU/L (valeurs variables selon les études).

VII.2- Variations physiologiques

- Sexe

On ne note pas de différence selon le sexe (16,22).

- Âge

Les valeurs obtenues chez les femmes en pré-, péri- et post-ménopause ne sont pas statistiquement différentes bien qu'elles soient plus dispersées et un peu plus élevées dans le groupe des femmes ménopausées par rapport au groupe de femmes non ménopausées (9).

- Grossesse

Les résultats de différentes études sont contradictoires. Selon certains auteurs, les concentrations de CA 15-3 ne sont pas influencées par la grossesse (10, 17) alors que pour d'autres, les concentrations sont augmentées chez 8 % à 46 % des femmes enceintes, avec des valeurs jusqu'à 80 kU/L (7, 23). Cette augmentation pourrait être due à des modifications de la glande mammaire entraînant une augmentation de la sécrétion des mucines.

- Lactation

La lactation ne semble pas influencer les valeurs de CA 15-3 (10, 17).

- Tabac

Le tabac ne modifie pas les valeurs de CA 15-3 (10, 18).

VII.3- Variations au cours des pathologies cancéreuses

Des concentrations de CA 15-3 supérieures à 50 kU/L sont hautement suggestives de la présence d'un cancer, ces valeurs n'étant retrouvées que chez 0,3 % de patients présentant une pathologie bénigne (5).

- CA 15-3 et cancer du sein

• Diagnostic de la tumeur primitive

La faible sensibilité clinique du CA 15-3 au moment du diagnostic de la tumeur primitive ne permet pas d'utiliser cet antigène dans le cadre d'un diagnostic précoce de cancer du sein. En effet, le CA 15-3 n'est augmenté que chez 5 à 39 % (pourcentage variable en fonction du seuil de positivité choisi) de ces patientes (4, 5, 6, 7, 8).

Par ailleurs, au moment du diagnostic, les valeurs de CA 15-3 ne semblent pas être corrélées avec les facteurs pronostiques, à l'exception de la taille de la tumeur et de l'envahissement ganglionnaire (corrélation non retrouvée par tous les auteurs),

• Recherche d'une récurrence locale et de métastases

La sensibilité du CA15-3 lors de la découverte d'une récurrence locale est faible, 14 à 18 % des patientes ayant une valeur pathologique à ce moment (12, 13). Mais l'intérêt pronostique est important, car 88 % des patientes ayant une valeur augmentée développeront des métastases (12).

Par ailleurs, chez les patientes, opérées d'un cancer du sein et sans signes cliniques de maladie, la médiane de survie est plus courte pour les patientes ayant une valeur de CA 15-3 augmentée par rapport à celles ayant une valeur normale (16).

En présence de métastases, la concentration de ce marqueur est augmentée chez 63 à 94 % des patientes (5, 8, 11, 17, 23, 24). D'après certaines études, la fréquence et l'importance de l'augmentation du CA 15-3 semblent dépendre du site des métastases, Les métastases osseuses, hépatiques et multiples sont associées à des valeurs pathologiques de CA 15-3 dans respectivement près de 70, 80 et 90 % des cas (5, 7, 21). La valeur prédictive positive du CA15-3 dans le diagnostic précoce des métastases est élevée, supérieure à 97 % (12).

Cependant, en cas de métastases ganglionnaires, cutanées ou cérébrales, la fréquence de positivité est plus faible (12). On peut également noter quelques cas d'augmentation inexplicée du CA 15-3, mais les concentrations sont rarement supérieures à 50 kU/L et on n'observe pas de cinétique croissante sur des prélèvements successifs (12).

Les valeurs de CA 15-3 peuvent atteindre 8 000 kU/L en cas de métastases osseuses et 10 000 kU/L en cas de métastases hépatiques et de métastases multiples (7).

Par ailleurs, l'augmentation du CA 15-3 peut précéder de plusieurs mois (entre trois et neuf mois et même jusqu'à deux ans) l'apparition des signes cliniques de métastases (10, 11, 12, 23). Le pourcentage de valeurs positives augmente quand on se rapproche de la découverte clinique des métastases (8).

Le dosage régulier de ce marqueur tous les deux à trois mois peut donc permettre une détection précoce des récidives (11, 12).

Les études randomisées en cours, permettront de comparer la survie des femmes traitées au moment de l'augmentation isolée du CA 15-3 (sans signes cliniques, ni radiologiques) à celle des femmes traitées seulement au moment de l'apparition des signes cliniques des métastases.

De nombreuses études comparant la sensibilité clinique du CA 15-3 et de l'antigène carcinoembryonnaire (ACE) au moment de la mise en évidence des métastases ont été effectuées, l'ACE étant le marqueur le plus utilisé en pathologie mammaire avant l'apparition du CA 15-3. Ces études montrent, en général, la supériorité du CA 15-3 par rapport à l'ACE (8, 10, 11, 13, 24).

La sensibilité peut être améliorée par le dosage couplé du CA 15-3 et de l'ACE, l'un ou l'autre de ces deux marqueurs étant augmenté dans 80 à 87 % des cas (11, 26). De même, pour Dnistrian et al. (13), le dosage simultané de l'ACE est intéressant lorsque celui-ci est le premier marqueur à se positiver. Cependant, pour d'autres auteurs (16, 17), le dosage du CA 15-3 conjointement à celui de l'ACE n'apporte pas d'informations complémentaires.

• **CA 15-3 et surveillance d'une chimiothérapie ou d'une hormonothérapie**

Il existe une bonne corrélation entre les variations du CA 15-3 et l'évolution de la maladie (7, 11). Chez 60 à 93 % des patientes traitées (pourcentage variable selon les études), la diminution du CA 15-3 indique une réponse au traitement avec une survie plus longue (8, 25), alors qu'une augmentation du CA 15-3 indique une progression de la maladie.

- **CA 15-3 et autres cancers**

L'augmentation du CA 15-3 n'est pas spécifique du cancer du sein. Des valeurs élevées de CA 15-3 peuvent être observées dans tous les types de cancer d'origine épithéliale ou non épithéliale et les valeurs sont bien corrélées avec la présence de métastases (27).

On peut noter une augmentation du CA 15-3 en particulier au cours des cancers de différents organes (ovaires, poumons, côlon, rectum, estomac, pancréas, col utérin, endomètre et également dans quelques cas de cancers hématologiques et de sarcomes (5, 7, 11, 27).

Il a été noté un fort pourcentage de positivité du CA 15-3 dans les cancers de l'ovaire aux stades III et IV, avec des valeurs de CA 15-3 atteignant 600 à 2 000 kU/L en cas de métastases hépatiques (27). Bien que le pourcentage d'augmentation du CA 125, au cours des cancers de l'ovaire, soit plus élevé que celui du CA 15-3 (84 % versus 46 %), la mesure simultanée de ces deux antigènes peut être utile, car dans certains cas on note une augmentation isolée du CA 15-3 alors que le CA 125 reste dans la zone de normalité (27).

- **CA 15-3 et pathologies bénignes**

• **Maladies bénignes du sein**

Le CA 15-3 peut augmenter dans les pathologies bénignes du sein. La fréquence d'augmentation varie entre 4 et 17 % selon les auteurs et le seuil choisi (5, 7, 10, 17). Le CA 15-3 dépasse rarement 50 kU/L dans ce type de pathologie.

• **Autres pathologies bénignes**

Des valeurs de CA 15-3 supérieures à 40 kU/L sont observées chez environ 3 % des patients atteints de pathologies bénignes incluant les maladies hépatiques, digestives, infectieuses, endocriniennes, hématopoïétiques, auto-immunes

et rénales (15, 16). Les valeurs les plus élevées sont rencontrées en cas de pancréatite chronique (86 kU/L) et de maladies chroniques du foie (99 kU/L) (15, 16, 28). Les pourcentages de positivité les plus élevés sont décrits lors des maladies hépatiques (hépatites et cirrhoses) et pulmonaires (15, 16, 28)

■ VIII. MCA - CAM26 - CAM29 - CA 549

De nombreux anticorps monoclonaux obtenus contre des cellules cancéreuses du sein ou contre les membranes des globules graisseux de lait humain réagissent avec différents épitopes présents sur des glycoprotéines de type mucine exprimées par les cellules épithéliales. Ces glycoprotéines, dont la synthèse est augmentée dans les cancers du sein et dans d'autres néoplasmes, sont caractérisées par une masse molaire élevée (supérieure à 200 000 g. mol⁻¹) et un contenu important en acide sialique. Ces antigènes dénommés **MCA, CAM26, CAM29, CA 549,...** selon les anticorps monoclonaux utilisés ont été proposés également comme marqueurs pour le suivi des cancers du sein. Selon les liquides biologiques étudiés, ces différents marqueurs montrent des concentrations distinctes. C'est ainsi que le MCA et le CAM26 sont élevés dans l'urine (en raison vraisemblablement d'une synthèse au niveau du tractus urinaire) et le liquide amniotique. Les concentrations sériques du MCA et du CAM29 augmentent de façon significative pendant la grossesse et la lactation contrairement au CAM 26 et au CA 15-3 (29). En présence de métastases du cancer du sein, les sensibilités et spécificités respectives de ces différents marqueurs sont variables, la meilleure sensibilité étant observée pour le CA 15-3 et la meilleure spécificité pour les CAM26 et CAM29, d'après certaines études (29, 30, 31).

■ IX. LEGISLATION

La législation actuelle impose une double détermination du CA 15-3/

- soit avec reprise du sérum précédent,
- soit dans deux séries différentes,
- soit dans la même série sur deux dilutions différentes du même sérum.

■ X. CONCLUSION

Le développement des anticorps monoclonaux a permis la mise en évidence et le dosage de nombreux antigènes associés à des tumeurs et en particulier aux tumeurs mammaires. Le CA 15-3 est actuellement le marqueur pour lequel on dispose du plus grand nombre d'études et du plus grand recul, Son dosage a remplacé celui de l'ACE dans le cancer du sein bien que le dosage simultané de ces deux antigènes soit complémentaire dans certaines situations, Le CA 15-3 n'est pas utile pour la détection précoce du cancer du sein en raison de sa faible sensibilité pour les cancers localisés et de sa faible spécificité d'organe. En effet, le CA 15-3 peut être augmenté dans tous les types de cancer, en particulier en présence de métastases à distance. Il ne peut donc pas être utilisé pour trouver l'origine d'une tumeur primitive chez les malades atteints de métastases d'origine inconnue.

La principale utilité du CA 15-3 est le suivi des cancers du sein traités chirurgicalement. Après chirurgie, le CA 15-3 est un indicateur de métastases, en raison de sa valeur prédictive positive élevée ; c'est un excellent Marqueur d'évolution du cancer du sein et les variations de sa concentration sont le reflet de l'efficacité ou de l'inefficacité d'un traitement hormonal ou chimique (après avoir éliminé les causes d'augmentation lors des pathologies bénignes). Enfin, s'il présente une faible sensibilité en cas de récurrence loco-régionale, une augmentation à ce stade constitue un facteur pronostique important de métastases ultérieures.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- KUFÉ D, INGHIRAMI G, ABE M, HAYES D, JUSTI-WHEELER H, SCHLOM J. Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. *Hybridoma*, 1984, 3, 223-232
- 2- HILKENS J, BUIJS F, HILGERS J, HAGEMAN Ph, CALAFAT J, SONNENBERG A et al. Monoclonal antibodies against human milk-fat globule membranes detecting differentiation antigens of the mammary gland and its tumors. *Int J cancer*, 1984, 34, 197-206
- 3- FRIEDMAN EL, HAYES DF, KUFÉ DW. Reactivity of monoclonal antibody DF3 with a high molecular weight antigen expressed in human ovarian carcinomas. *Cancer Res*, 1986, 46, 5189-5194
- 4- DUFFY MJ, SHERRY F. CA 15-3, a new marker in breast cancer. *Ann Clin, Biochem*, 1988, 25, 53-54 (supplément)
- 5- SAFI F, KOHLER I, ROTTINGER E, BEGER HG. The value of the tumor marker CA 15-3 in diagnosing and monitoring breast cancer. A comparative study with carcinoembryonic antigen. *Cancer*, 1991, 68, 574-582
- 6- PONS-ANICET DMF, KREBS BP, MIRA R, NAMER M. Value of CA 15-3 in the follow-up of breast cancer patients. *Br J Cancer*, 1987, 55, 567-569
- 7- SCHMIDT-RHODE P, SCHULZ KD, STURM G, RAAB-FRICK A, PRINZ H. CA 15-3 as a tumour marker in breast cancer. *Int J Biol Markers*, 1987, 2, 135-142
- 8- KREBS B, PONS-ANICET D, GALLAND A, ROSSI C, NAMER M. Utilité du CA 15-3 dans le cancer du sein. XII Journées Nationales de Biologie. Grenoble 1988, 85-90
- 9- GION M, MIONE R, NASCIMBEN O, VALSECCHI M, GATTI C, LEON A et al. The tumour associated antigen CA 15-3 in primary breast cancer. Evaluation of 667 cases. *Br J Cancer*, 1991, 63, 809-813
- 10- FERRERO JM, NAMER M. Intérêt clinique du CA 15-3 dans le cancer du sein. *Immunoanal Biol Spéc*, 1994, 9, 43-46
- 11- MAIGRE M, FUMOLEAU P, RICOLLEAU G, GUILLARD Y, CUSSAC A, VIGNOUD J et al. Le CA 15-3 dans le cancer du sein. Comparaison avec l'ACE. *Sem Hôp Paris*, 1988, 64, 9-13
- 12- BASUYAU JP, BRUNELLE P, CHARROT P, CHEVALLIER B, DELAPIERRE F, GRAIC Y et al. CA 15-3 et diagnostic précoce de récurrence dans les cancers du sein. *Bull Cancer*, 1993, 80, 203-218
- 13- DNISTRIAN AM, SCHWARTZ MK, GREENBERG EJ, SMITH CA, SCHWARTZ DC. CA 15-3 and carcinoembryonic antigen in the clinical evaluation of breast cancer. *Clin Chim Acta*, 1991, 200, 81-94
- 14- SCARAMUZZI M, AMOROTTI C, DE PALMA M, FALCHI AM, DE MARIA D, CASOLO P. Prognostic significance of CA 15-3 in metastatic breast cancer. *Int J Biol Markers*, 1990, 5, 35-37
- 15- RUIBAL A, GENOLLA J, ROSELL M, GRIS JM, COLOMER R. Serum CA 15-3 levels in patients with non-tumoral diseases, and establishment of a threshold for tumoral activity. Results in 1219 patients. *Int J Biol Markers*, 1986, 1, 159-160
- 16- COLOMER R, RUIBAL A, GENOLLA J, RUBIO D, DELCAMPO JM, BODI R et al. Circulating CA 15-3 levels in the postsurgical follow-up of breast cancer patients and in non-malignant diseases. *Breast Cancer Res and Treat*, 1989, 13, 123-133
- 17- HAYES DF, ZURAWSKI VR, KUFÉ DW. Comparison of circulating CA 15-3 and carcinoembryonic antigen levels in patients with breast cancer. *J Clin Oncol*, 1986, 4, 1542-1550
- 18- TOBIAS R, ROTHWELL C, WAGNER J, GREEN A, LIU YSV. Development and evaluation of a radioimmunoassay for the detection of a monoclonal antibody defined breast tumor associated antigen 115D8/DF3. *Clin Chem*, 1985, 31, 986 (abstract)
- 19- LIEFOOGHE J, FORZY G, JANNET M, PONCHAUX D, HERLIN C. Essai comparatif en routine de plusieurs méthodes de dosage des marqueurs tumoraux CA 15-3, CA 125 et CA 19-9. *Immunoanal Biol Spéc*, 1992, 31, 33-42
- 20- MAILLIAVIN A, REVENANT MC, BEAUDONNET A, CHARRIE A. Evaluation analytique du dosage du CA 15-3 sur le système IMx Abbott. *Convergence Biologie 1995*, Lille Grand Palais, 9-13 octobre 1995, 192
- 21- MARTIN PM, ROMAIN S, PIC G, KIRCHER C, PICHON MF, CHICHE M et al. Etude comparative des tests IMx CA 15-3 et Cis Elsa CA 15-3 RIA. 11ème colloque Corata, Grenoble, 19-21 octobre 1994, 83

- 22- FUJINO N, HAGA Y, SAKAMOTO K, EGAMI H, KIMURA M, NISHIMURA R et al. Clinical evaluation of an immunoradiometric assay for CA 15-3 antigen associated with human mammary carcinomas : comparison with carcinoembryonic antigen. *Jpn J Clin Oncol*, 1986, 16, 335-346
- 23- BOMBARDIERI E, PIZZICHETTA M, VERONESI P, SEREGNI E, BOGNI A, MAFFIOLI L et al. CA 15-3 determination in patients with breast cancer : clinical utility for the detection of distant metastases. *Eur J Cancer*, 1993, 29A, 144-146
- 24- TONDINI C, HAYES DF, GELMAN R, HENDERSON IC, KUFE DW. Comparison of CA 15-3 and carcinoembryonic antigen in monitoring the clinical course of patients with metastatic breast cancer. *Cancer Res*, 1988, 48, 4107-4112
- 25- PONS-ANICET D, RAMAIOLI A, KREBS BP, NAMER M. CA 15-3 : A prognostic factor for metastatic breast cancer ? *J Tumor Marker Oncol*, 1988, 3, 159-163
- 26- AL-JARALLAH MA, BEHBEHANI AE, EL-NASS SA, TEMIM L, EBRAHEEM AK, ALIMAA et al. Serum CA 15-3 and CEA patterns in postsurgical follow-up, and in monitoring clinical course of metastatic cancer in patients with breast carcinoma. *Eur J Surg Oncol*, 1993, 19, 74-79
- 27- COLOMER R, RUIBAL A, GENOLLA J, SALVADOR L. Circulating CA 15-3 antigen levels in non-mammary malignancies. *Br J Cancer*, 1989, 59, 283-286
- 28- COLLAZOS J, GENOLLA J, RUIBAL A. CA 15-3 in non malignant liver diseases. *Int J Biol Markers*, 1991, 6, 188-192
- 29- BIEGLMAYER C, SZEPESEI T, KOPP B, HOFFMANN G, PETRIK W, GUETTUCHE K et al. CA15-3, MCA, CAM26, CAM29 are members of a polymorphic family of mucin -like glycoproteins. *Tumor Biol*, 1991, 12, 138-148
- 30- DNISTRAN AM, SCHWARTZ MK, GREENBERG EJ, SMITH CA, SHWARTZ DC. Evaluation of CAM26, CAM29, CA 15-3 and CEA as circulating tumor markers in breast cancer patients. *Tumor Biol*, 1991, 12, 82-90
- 31- DNISTRAN AM, SCHWARTZ MK, GREENBERG EJ, SMITH CA, SCHWARTZ DC. Carcinoma associated mucin antigens as circulating tumor markers in breast cancer patients. *Breast Cancer Res and Treat*, 1990, 16, 163 (abstract)

ANTIGENE CARBOHYDRATE 125 (CA 125)

A.. BEAUDONNET, R. COHEN

I - INTERET PHYSIOPATHOLOGIQUE

II - STRUCTURE

III - TECHNIQUES DE DOSAGE

IV - RESULTATS DES ENQUETES INTERLABORATOIRES

V - RESULTATS OBTENUS SUR LES SÉRUMS DE PATIENTS

VI - ETAPE PRÉANALYTIQUE - CONSERVATION DES SPÉCIMENS

VII - INTERPRETATION DES RESULTATS

VIII - LEGISLATION

IX - CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

I. INTERET PHYSIOPATHOLOGIQUE

L'antigène carbohydre 125 (CA 125) a été décrit en 1981 par Bast et coll. (1). Le CA 125 est un antigène de surface reconnu par l'anticorps monoclonal « ovarian carcinoma 125 (OC 125) » obtenu par immunisation de souris avec une lignée cellulaire (OVCA 433) provenant d'ascite d'une malade atteinte d'un cystadénocarcinome ovarien.

Le CA 125 est un antigène de différenciation de l'épithélium cœlomique au cours du développement embryonnaire. Les études immunohistochimiques ont montré la présence de cet antigène dans les séreuses dérivant de cet épithélium (péritoine, plèvre, péricarde), les dérivés müllériens (endocol, trompes de Fallope, endomètre) ainsi que dans l'amnios et l'ombilic. Cet antigène n'est pas exprimé dans le tissu ovarien normal adulte, mais on le trouve dans près de 80 % des tumeurs épithéliales non mucineuses de l'ovaire, principalement à la surface des cellules (2, 3). Par ailleurs, le CA 125 a été mis en évidence dans les cystadénomes bénins de l'ovaire et dans le lait humain.

Le CA 125 est le marqueur le plus utile en pathologie gynécologique : cancers ovariens, endométriose. Le dosage du CA 125 n'est pas indiqué dans le diagnostic de cancer ovarien (manque de sensibilité et de spécificité cliniques), mais il présente un grand intérêt dans :

- l'évaluation de l'efficacité du traitement, en particulier dans les cancers d'origine épithéliale qui représentent 90 % des cancers ovariens (4),
- la détection précoce des récidives et des métastases (5, 6),
- la décision de chirurgie de contrôle (second « look »),
- la surveillance à long terme des patientes en rémission.

Au cours de l'endométriose, le CA 125 est augmenté, cette augmentation est en générale peu importante, mais les variations sont très sensibles à l'évolution de la maladie (7).

Par ailleurs, on peut noter, avec une fréquence moins importante, une **augmentation du CA 125 sérique dans les cancers de différents organes (endomètre, col, trompes, pancréas, foie, poumons, côlon, rectum et sein (8)).**

Le CA 125 peut être augmenté également dans de **nombreuses pathologies non tumorales :**

- Affections hépato-biliaires aiguës et bénignes par diminution du catabolisme hépatique ; au cours de ces pathologies bénignes, la présence d'ascite est le principal facteur d'augmentation du CA 125 (9, 10, 11),
- Pathologie des séreuses : la présence d'ascite, d'épanchements pleuraux et de péricardite (quelle qu'en soit l'origine) entraîne fréquemment une augmentation du CA 125 parfois très importante (9, 10, 11, 12),
- Affections pancréatiques aiguës et chroniques (8),
- Maladies du système et infections bactériennes (12).

II. STRUCTURE

La structure biochimique du CA 125 n'est pas complètement caractérisée. Le déterminant antigénique reconnu par l'anticorps monoclonal OC 125 serait en partie de nature peptidique, car sensible à l'action des protéases et stable en présence de glucosidases (13). Ce déterminant est porté de façon répétitive par une glycoprotéine de masse molaire d'environ 200 000 g.mol⁻¹.

Dans le sérum, le CA 125 est exprimé sur des glycoprotéines de masse molaire plus ou moins importante (de 200 000 à 1 000 000 g.mol⁻¹)(13).

Le catabolisme de la glycoprotéine portant le CA 125 est hépatique. Sa demi-vie est d'environ cinq jours (14).

■ III. TECHNIQUES DE DOSAGE

III.1- Principe

Actuellement, toutes les méthodes de dosage sont de type immunométrique avec marqueur.

Lors de l'enquête du contrôle national de qualité de juin 1994, les techniques avec détection d'un signal fluorescent, photométrique et radioactif étaient utilisées par respectivement 46,3, 46,3 et 5,2 % des 810 laboratoires effectuant le dosage du CA 125 (2,2 % des techniques n'étant pas codées ou insuffisamment représentées).

III.2- Anticorps

Comme pour le premier test immunoradiométrique (IRMA) décrit par Bast et al. (4) en 1983, la majorité des techniques de dosage utilisait le même anticorps OC 125 comme anticorps de capture et de révélation (systèmes homologues). Cependant, ces techniques tendent à être remplacées actuellement par des techniques de deuxième génération (CA 125 II) utilisant l'anticorps OC 125 comme traceur et un autre anticorps monoclonal (M 11) comme anticorps de capture (systèmes hétérologues). L'anticorps M 11 reconnaît un autre épitope sur la molécule exprimant le CA 125 (15, 16).

Dans le système MEIA (« Microparticle Enzyme Immuno Assay ») l'anticorps de révélation est également l'anticorps monoclonal OC 125 et l'anticorps de capture est un anticorps polyclonal de chèvre anti-CA 125.

Plus récemment, des techniques de dosage utilisant d'autres anticorps monoclonaux (les anticorps OC 125 et M 11 étant protégés par un brevet) ont été commercialisées sous les noms de dosage OM-MA et OCA. Ces différentes techniques sont enregistrées auprès de l'Agence du Médicament pour la détermination du CA 125.

III.3- Étalon

Actuellement, il n'existe pas de référence internationale. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (U/mL ou kU/L). Dans le cas du CA 125, les étalons sont généralement préparés par extraction de l'antigène à partir de la lignée cellulaire OVCA 433 (4). L'antigène est ensuite dilué dans du plasma humain (5) ou dans des solutions de protéines animales.

III.4- Causes d'erreurs

- Effet « crochet »

Les techniques immunométriques et en particulier les techniques en un temps sont sensibles à l'effet « crochet » qui apparaît pour des concentrations élevées en antigène. Cet effet « crochet » est à l'origine d'une sous-estimation des résultats (voir cahier de formation immunoanalyse n° 2, mai 1995, pp 21-22).

Des concentrations sériques très élevées de CA 125 peuvent être observées au cours des cancers de l'ovaire à un stade avancé avec ascite et métastases. Par ailleurs le CA 125 peut être également très élevé dans les liquides d'ascite ou de kyste, en particulier dans les kystes organiques avec des concentrations supérieures à 50 000 kU/L (17).

Selon les méthodologies, les concentrations à partir desquelles cet effet « crochet » est observé sont variables : de 9 000 kU/L à 45 000 kU/L (18, 19, 20). Dans ce cas, il est nécessaire de réaliser une ou plusieurs dilutions du sérum pour obtenir la valeur exacte du CA 125.

- Anticorps hétérophiles

De nombreuses publications font état de résultats erronés lors du dosage du CA 125 chez des patientes ayant subi une ou plusieurs immunoscintigraphies (avec injection d'anticorps monoclonaux OC 125 marqués à l'iode 131) pour surveillance postopératoire d'un cancer de l'ovaire (21, 22).

En effet, l'administration de ces anticorps marqués provoque la synthèse d'anticorps hétérophiles anti-souris (HAMA ou « Human Anti-Mouse Antibodies »). Les HAMA peuvent être dirigés contre la partie constante des immunoglobulines du réactif (anticorps anti-isotypes) et provoquent en général une surestimation des résultats en se liant à l'anticorps de capture et à l'anticorps marqué. L'addition de sérum de souris au réactif ne permet pas toujours d'éliminer complètement cette interférence. Les HAMA peuvent aussi être dirigés contre la partie hypervariable des immunoglobulines du réactif (anticorps anti-idiotypes) et se comportent alors comme l'antigène CA 125 en se fixant sur les anticorps OC 125 de capture et OC 125 marqués. Dans ce cas, l'interférence peut être très importante, avec

des résultats de CA 125 supérieurs à 100 000 kU/L (22). Les anticorps anti-idiotypes peuvent être éliminés par une chromatographie sur protéine A sépharose. Par ailleurs, il semble que l'interférence due aux HAMA soit moindre avec les techniques utilisant deux anticorps différents OC 125 et M 11 (23, 24), ainsi qu'avec celles utilisant un anticorps monoclonal et un anticorps polyclonal (20).

- Existence d'isoformes moléculaires

L'existence d'isoformes de CA 125 de masse molaire élevée peut entraîner des difficultés de dosage, en particulier dans le liquide péritonéal où les formes de masse molaire supérieure à 1 000 000 g.mol⁻¹ sont prédominantes. Les formes de masse molaire élevée, en masquant les molécules de plus faible masse molaire aux anticorps, entraînent une sous-estimation des résultats. Dans ce cas, il est nécessaire d'effectuer une dilution importante du liquide avant dosage (25).

Des problèmes de linéarité ont été également signalés lors du dosage du CA 125 sur certains sérums, indépendamment des problèmes d'effet « crochet » et en l'absence d'administration d'anticorps monoclonaux marqués (26). Les résultats sont alors plus élevés sur les sérums après dilution que sur les sérums non dilués (avec des écarts variables, mais pouvant atteindre plus de 400 % dans certains cas).

■ IV. RESULTATS DES ENQUETES INTERLABORATOIRES

Les variations intertechniques sont moins importantes que celles que l'on peut observer lors du dosage de CA 19-9. En effet, les CV tronqués toutes techniques confondues sont respectivement de 14,1 et 12,4 % pour les sérums de contrôle MT 18 et MT 19 analysés lors de l'enquête du contrôle national de juin 1994. Néanmoins, ces variations existent comme on peut le voir sur la **figure 1** qui montre, pour ces spécimens, les moyennes obtenues avec les systèmes analytiques les plus utilisés exprimées en pourcentage de la moyenne générale.

En ce qui concerne la reproductibilité par technique, les CV tronqués obtenus sont tous inférieurs ou égaux à 10,1 % pour les deux niveaux de concentration (36,3 et 98,7 kU/L) (**figure 2**).

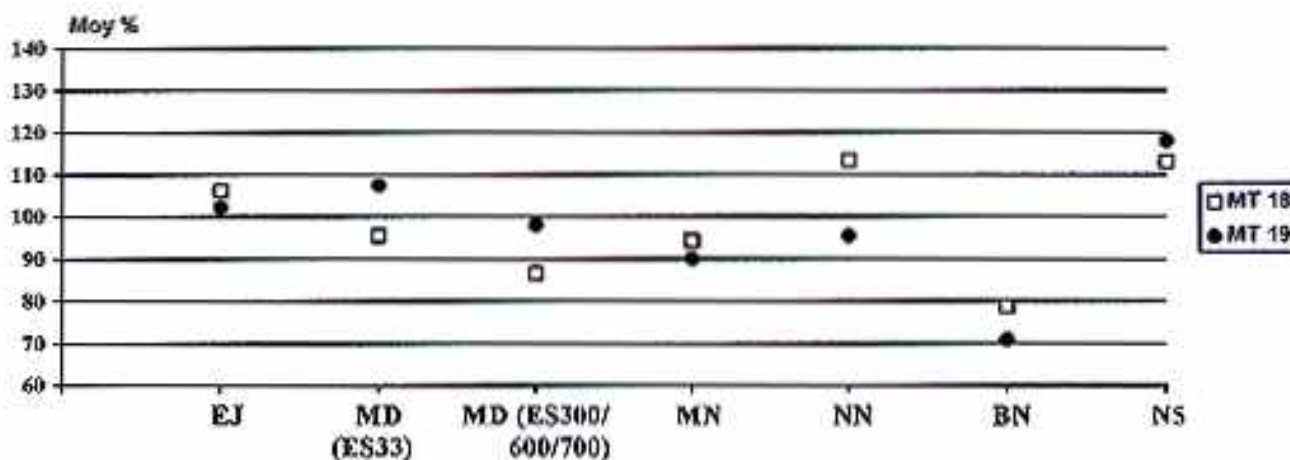


Figure 1 : Moyenne des techniques les plus utilisées, exprimées en % de la moyenne générale, au cours de l'opération de contrôle national (juin 1994).

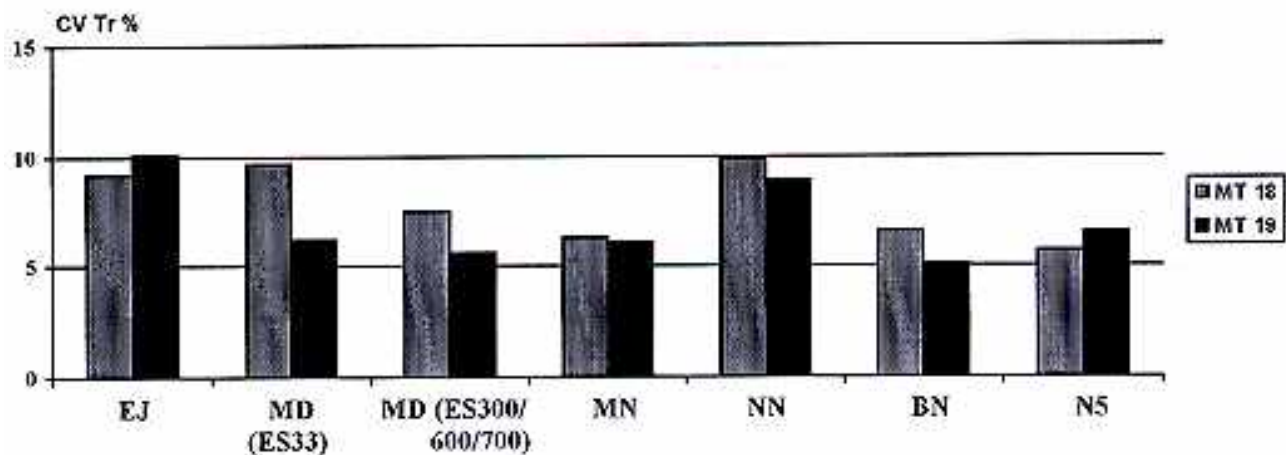


Figure 2 : Reproductibilité interlaboratoire des techniques les plus utilisées, au cours de l'opération de contrôle national (juin 1994).

■ V. RESULTATS OBTENUS SUR LES SÉRUMS DE PATIENTS

Les études de comparaison intertechniques (réalisées avec des réactifs utilisant les deux anticorps OC 125 ou les anticorps OC 125 et M 11) montrent en général une évolution parallèle de la concentration du CA 125 lors du suivi des patients. Cependant, les valeurs absolues peuvent être significativement différentes (27, 28, 29). Les résultats d'études de régression linéaire montrent des pentes qui varient entre 0,40 et 1,35 en prenant comme technique de comparaison la technique IRMA d'origine (27). Par ailleurs, les différences intertechniques peuvent être variables selon l'origine des sérums ; c'est ainsi que les résultats sont environ 20 % plus bas avec la technique IMx Abbott qu'avec la trousse RIA Abbott chez les femmes en bonne santé, alors qu'ils sont environ 50 % plus élevés avec l'IMx chez les femmes atteintes de pathologie ovarienne bénigne ou maligne pour des concentrations inférieures à 100 kU/L (20). Ceci pose le problème du choix des valeurs de référence et le problème du suivi des patients en cas de changement de technique de dosage.

■ VI. ÉTAPE PRÉANALYTIQUE - CONSERVATION DES SPECIMENS

VI.1- Prélèvement

Le dosage doit être réalisé de préférence sur sérum. Les interférences éventuelles dues aux anticoagulants, à l'hémolyse, à l'hyperbilirubinémie et à l'hypertriglycéridémie doivent être testées avec chaque système analytique. Le prélèvement doit subir une nouvelle centrifugation avant analyse, s'il n'est pas limpide.

VI.2- Conservation des spécimens

Les prélèvements peuvent être conservés à + 4°C pendant vingt-quatre heures et congelés si le dosage est réalisé au-delà de cette période.

Les cycles de congélation-décongélation sont à éviter.

■ VII. INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats de CA 125 dépendent des techniques utilisées ; les valeurs ci-dessous ne sont donc données qu'à titre indicatif. Par ailleurs, les données indiquées ci-dessous ont été obtenues à partir d'études réalisées avec les

technologies utilisant les premiers anticorps monoclonaux décrits pour la détermination du CA 125 (OC 125 et M 11).

VII.1- Valeurs de référence

La valeur de 35 kU/L fut introduite par Bast et al. (4) à la suite d'une étude portant sur 888 personnes en bonne santé (dont 351 femmes), 101 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire et 143 patients atteints de maladies non cancéreuses. C'est la valeur la plus fréquemment citée, malgré les différences intertechniques.

VII.2- Variations physiologiques

- Au cours du cycle menstruel

Les concentrations de CA 125 montrent des variations au cours du cycle avec une faible augmentation (concentrations en général inférieure à 65 kU/L) au moment des règles et du pic de LH.

- Au cours de la grossesse

Le CA 125 est augmenté pendant le premier trimestre de la grossesse, puis diminue au deuxième et troisième trimestre et augmente à nouveau lors du post-partum. Cependant, d'autres études ont montré que le CA 125 pouvait être augmenté pendant les trois trimestres de la grossesse (29).

- En fonction de l'âge et du statut hormonal

Les concentrations de CA 125 sont plus faibles chez les femmes ménopausées exemptes de toute pathologie (29).

VII.3- Variations au cours des pathologies cancéreuses

- CA 125 et cancers ovariens

Diagnostic

Le CA 125 ne peut-être utilisé seul pour le diagnostic des cancers ovariens, en raison de son manque de sensibilité et de spécificité. En effet, si le CA 125 est élevé dans environ 80 % des tumeurs épithéliales de l'ovaire aux stades III et IV, il reste normal aux stades précoces (stades I et II) de la maladie dans plus de 90 % des cas (4). En cas de tumeurs épithéliales de l'ovaire, les concentrations peuvent être élevées (supérieures à 2000 kU/L) et atteindre plus de 9000 kU/L en présence d'ascite ou de métastases pleurales (4, 11).

Surveillance post-opératoire

Le dosage du CA 125 présente un très grand intérêt. En effet, son dosage, réalisé au moins trois semaines après l'intervention (pour éliminer les augmentations liées à la lyse cellulaire et à l'intervention sur le péritoine), permet de savoir s'il persiste un résidu tumoral, le taux de CA 125 étant corrélé à la présence de ce résidu tumoral.

Surveillance d'une chimiothérapie

Par ailleurs, le dosage du CA 125, avant l'instauration d'une chimiothérapie, présente un intérêt pronostique. Davidson et al. (30) ont montré une survie à cinq ans chez 75 % des malades ayant un CA 125 normal et seulement chez 10 % des malades avec un CA 125 supérieur à 50 kU/L.

La diminution de la concentration de CA 125 reflète l'efficacité du traitement et constitue un facteur pronostique. Une augmentation ou une diminution du CA 125 sérique est corrélée dans plus de 90 % des cas à une progression ou à une régression de la maladie, alors que les modifications des concentrations de CA 19-9 et de l'antigène carcino-embryonnaire ne sont corrélées avec l'évolution de la maladie que dans respectivement 33 % et 25 % des cas (5). En cas de récurrence, l'augmentation du CA 125 peut se produire un à dix-sept mois avant toute manifestation clinique (31). Une augmentation progressive du CA 125 au cours du traitement devra donc conduire à un bilan et à un changement de thérapeutique.

Berek et al. (32) ont montré qu'une concentration de CA 125 supérieure à la normale ou une concentration qui augmente indique la présence d'une tumeur de taille supérieure ou égale à deux centimètres, alors qu'une concentration inférieure à la normale ne permet pas d'exclure l'absence de résidus tumoraux. Une laparotomie est donc indiquée lorsque la concentration de CA 125 est normale.

Surveillance d'une rémission complète

Etant donné la fréquence des récurrences après rémission complète, le dosage du CA 125 est très utile car il permet un diagnostic précoce de récurrence.

- CA 125 et autres cancers

En pathologie cancéreuse non ovarienne, le CA 125 peut également augmenter, avec une fréquence variable selon les études, au cours des cancers de l'endomètre, du col utérin, des trompes, du pancréas, du foie, du poumon, du sein et des cancers colorectaux (8, 12). Au cours des cancers de l'endomètre, Pastner et al. (33) ont montré une relation entre l'augmentation préopératoire du CA 125, le stade tumoral et le degré d'envahissement extra-utérin.

VII.4- Variations au cours des pathologies bénignes

Les concentrations de CA 125 sérique sont en général modérément augmentées dans les pathologies pelviennes bénignes. Néanmoins, des valeurs élevées (supérieures à 400 kU/L) peuvent être rencontrées au cours des maladies inflammatoires pelviennes aiguës et le CA 125 ne peut être utilisé pour différencier pathologies bénigne et maligne (34).

- CA 125 et endométriose

Le CA 125 a été proposé comme aide au diagnostic et au suivi de l'endométriose pour laquelle on ne dispose pas de méthode d'exploration non invasive. Les concentrations de CA 125 en général sont peu élevées, mais sont très sensibles à l'évolution de la maladie. C'est ainsi que le CA 125 permet de suivre l'efficacité du traitement médical ou chirurgical (7, 35). Toutefois, en raison des variations de la concentration de CA 125 au cours du cycle menstruel, le prélèvement doit être effectué en phase folliculaire.

- CA 125 et fibromes utérins

On peut noter une augmentation lors de cette pathologie.

VII.5- Variations au cours des pathologies entraînant l'apparition d'épanchements

La présence d'épanchements pleuraux, péricardiques et surtout péritonéaux entraîne très fréquemment une augmentation du CA 125, quelle que soit l'origine de l'épanchement (9, 12, 36).

En effet, le CA 125 est plus élevé au cours des cancers ovariens lorsqu'il existe un épanchement et le CA 125 serait plus corrélé à la présence d'ascite qu'à l'extension du cancer ovarien. Cette corrélation entre concentration de CA 125 et présence d'une ascite est nette puisque 89 % des cancers ovariens avec ascite présente un CA 125 élevé, contre 21 % des cancers sans ascite (36).

La même constatation peut être faite au cours des affections hépatiques malignes ou bénignes. En effet, la présence d'ascite entraîne une augmentation du CA 125 dans 100 % des cas, alors qu'en l'absence d'ascite, le CA 125 est normal chez 90 % des patients ayant un hépatocarcinome et chez 70 à 85 % des patients atteints de cirrhoses d'origine alcoolique, virale ou de cirrhose biliaire primitive (9, 36).

On peut noter également que la concentration de CA 125 est toujours plus élevée dans le liquide d'ascite que dans le sérum.

Le CA 125 qui est synthétisé par les cellules péritonéales pourrait être considéré comme un marqueur non spécifique de l'ascite et de l'inflammation du péritoine.

VII.6- CA 125 et pathologies iatrogènes

Il a été observé une augmentation du CA 125 (supérieure à 200 kU/L) lors d'injections sous-cutanées au niveau abdominal (37). Dans ce cas, l'augmentation du CA 125 serait due à l'irritation péritonéale déclenchée par les injections.

■ VIII. LEGISLATION

La législation actuelle impose une double détermination du CA 125 :

- soit avec reprise du sérum précédent,
- soit dans deux séries différentes,
- soit dans la même série sur deux dilutions différentes du même sérum (permettant ainsi de déceler un éventuel effet « crochet »).

■ IX. CONCLUSION

Le CA 125 est le marqueur biologique le plus utile en pathologie gynécologique (cancers ovariens, endométriose). En raison de la fréquence de son augmentation en pathologie bénigne pelvienne, il ne peut être utilisé comme marqueur de différenciation entre pathologie bénigne et maligne.

En raison de sa faible sensibilité dans les stades précoces du cancer de l'ovaire, le CA 125 ne peut être utilisé comme outil de diagnostic. Par ailleurs, l'interprétation d'une augmentation doit être faite en fonction du contexte clinique et en particulier de la présence d'un épanchement, cause fréquente d'augmentation de ce marqueur.

Par contre, le CA 125 présente un intérêt réel dans le cadre d'une surveillance post-opératoire, chimiothérapique et radiothérapique du fait de la corrélation entre la concentration de CA 125 et l'évolution de la maladie.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- BAST RC, FEENEY M, LAZARUS H, NADLER LM, COLVIN RB, KNAPP RC. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest*, 1981, 68, 1331-1337
- 2- KABAWAT SE, BAST RC, WELCH WR, KNAPP RC, COLVIN RB. Immunopathologic characterization of a monoclonal antibody that recognizes common surface antigens of human ovarian tumors of serous, endometrioid, and clear cell types. *Am J Clin Path*, 1983, 79, 98-104
- 3- KABAWAT SE, BAST RC, BHAN AK, WELCH WR, KNAPP RC, COLVIN RB. Tissue distribution of a coelomic epithelium related antigen recognized by the monoclonal antibody OC125. *Int J. Gynecol pathol*, 1983, 2, 275-285
- 4- BAST RC, KLUG TL, ST JOHN E, JENISON E, NILOFF JM, LAZARUS H et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*, 1983, 309, 883- 887
- 5- BAST RC, KLUG TL, SCHAEZL E, LAVIN P, NILOFF JM, GREBER TF et al. Monitoring human ovarian carcinoma with a combination of CA 125, CA 19-9, and carcinoembryonic antigen, *Am J Obstet Gynecol*, 1984, 149, 553-559
- 6- REDMAN CWE, BLACKLEDGE GR, KELLY K, POWELL J, BUXTON EJ, LUESLEY DM. Early serum CA 125 response and outcome in epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer*, 1990, 26, 593-596
- 7- PITTAWAY DE, FAYEZ JA. The use of CA 125 in the diagnosis and management of endometriosis. *Fert Steril*, 1986, 46, 790-795
- 8- TOUITOU Y, BOGDAN A. Etude critique des marqueurs tumoraux récents. *Bull Cancer*, 1988, 75, 247- 262
- 9- BERGMANN JF, BEAUGRAND M, LABADIE H, BIDARD JM, BOHUON C. Ca 125 (ovarian tumour-associated antigen) in ascitic liver diseases. *Clin Chim Acta*, 1986, 155, 163-166
- 10- COLLAZOS J, DIAZ F. Cancer antigen 125 in patients with liver diseases. *Clin Chem*, 1992, 38, 1188-1189
- 11- PICHOT J, BEAUDONNET A, MAILLIAVIN A, GUILLAUD M, CHAMPION F, CAUSSE X et al. Dosage enzymo-immunologique du CA 125. Résultats dans les affections gynécologiques, digestives, hépatiques et pancréatiques. V^{ème} Colloque sur les actualités en immunoanalyse. Paris, 7-10 décembre 1988, 263-269

- 12- LE THI HUONG DU, MOHATTANE H, PIETTE JC, BOGDAN A, AUZEBY A, TOUITOUY et al. Spécificité du marqueur tumoral CA 125. Etude de 328 observations de médecine interne. La presse médicale, 1988, 17, 2287-2291
- 13- DAVIS HM, ZURAWSKI VR, BAST RC, KLUG TL. Characterization of the CA 125 antigen associated with human epithelial ovarian carcinomas. Cancer Res, 1986, 46, 6143-6148
- 14- CANNEY PA, MOORE M, WILKINSON PM, JAMES RD. Ovarian cancer antigen CA 125 : a prospective clinical assessment of its role as a tumour marker. Br J Cancer, 1984, 50, 765-769
- 15- O'BRIEN TJ, RAYMOND LM, BANNON GA, FORD DH, HARDARDOTTIR H, MILLER FC et al. New monoclonal antibodies identify the glycoprotein carrying the CA 125 epitope. Am J Obstet Gynecol, 1991, 165, 1857-1864
- 16- HARDARDOTTIR H, PARMLEY TH, QUIRCK JG, SANDERS MM, MILLER FC, O'BRIEN TJ. Distribution of CA 125 in embryonic tissues and adult derivatives of the fetal periderm. Am J Obstet Gynecol, 1990, 163, 1925-1931
- 17- DARGENT D, LASNE JY, AKIKI S. Diagnostic de la nature des kystes de l'ovaire par le dosage dans le liquide kystique et dans le sang des stéroïdes et des « marqueurs tumoraux ». Dédutions pratiques. Contr Fert Sex, 1990, 18, 1011-1016
- 18- PESCE MA. « High dose hook effect » with the centocor CA 125 assay. Clin Chem, 1993, 39, 1347 (Letter)
- 19- BONFRER JMG, BAAN AW, JANSEN E, LENTFER D, KENEMANS P. Technical evaluation of three second generation CA 125 assays. Eur J Clin Chem Biochem, 1994, 32, 201-207
- 20- THOMAS CMG, MASSUGER L, SEGERS M, SCHIJF C, DOESBURG W, WOBES T. Analytical and clinical performance of improved Abbott IMx CA 125 assay : comparison with Abbott CA 125 RIA. Clin Chem, 1995, 41, 211-216
- 21- TURPEINEN U, LEHTOVIRTA P, ALFTHAN H, STENMAN UH. Interference by human antimouse antibodies in CA 125 assay after immunoscintigraphy : anti-idiotypic antibodies not neutralized by mouse IgG but removed by chromatography. Clin Chem, 1990, 36, 1333-1338
- 22- REINSBERG J, HEDWEILLER A, WAGNER U, PFEIL K, OEHR P, KREBS D. Evidence for interaction of human anti-idiotypic antibodies with CA 125 determination in a patient after radioimmunoassay. Clin Chem, 1990, 36, 164-167
- 23- JAGER W, ZOLLER O. Human anti-mouse antibodies against OC-125 do not interfere in a CA 125 assay that uses OC-125 and M 11 antibodies. Clin Chem, 1993, 39, 1556-1557 (Letter)
- 24- KENEMANS P, VAN KAMP GJ, OEHR P, VERSTRAETEN RA. Heterologous double-determinant immunoradiometric assay CA 125 II : reliable second-generation immunoassay for determining CA 125 in serum. Clin Chem, 1993, 39, 2509-2513
- 25- BARBATI A, ANCESCHI M, DI RENZO GC, COSMI EV. CA 125 in peritoneal fluid : reliable values at high dilutions. Obstet Gynecol, 1992, 79, 1011-1015
- 26- WONG ECC. Difficulties in analysis of CA 125 in diluted samples. Clin Chem, 1995, 41, 1543-1544 (Letter)
- 27- VAN KAMP GJ, VERSTRAETEN AA, KENEMANS P. Discordant serum CA 125 values in commercial immunoassays. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol., 1993, 49, 99-103
- 28- PITTAWAY DE. Correlation of an enzyme immunoassay with the radioimmunoassay for CA 125. Am J Obstet Gynecol, 1988, 158, 62-64
- 29- KENEMANS P, BON GG, KESSLER AC, VERSTRAETEN AA, VAN KAMP GJ. Multicenter technical and clinical evaluation of a fully automated enzyme immunoassay for CA 125. Clin Chem, 1992, 38, 1466-1471
- 30- DAVIDSON NGP, KHANNA S, KIRWAN PH, BIRCUMSHAW D. Prechemotherapy serum CA 125 level as a predictor of survival outcome in epithelial carcinoma of the ovary. Clin Oncol, 1991, 3, 32-36
- 31- DUFFY MJ, DAVIS MA, SHEEHAN J, FENNELLY JJ. Evaluation of CA 125 as a marker in ovarian cancer. Ann Clin Biochem 1988, 25, 51-52 (supplément)
- 32- BEREK JS, KNAPP RC, MALKASIAN GD, LAVIN PT, WHITNEY C, NILOFF JM et al. CA 125 serum levels correlated with second-look operations among ovarian cancer patients. Obstet Gynecol, 1986, 67, 685-689

- 33- PASTNER B, MANN WJ, COHEN H, LOESCH M. Predictive value of preoperative serum CA 125 levels in clinically localized and advanced endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol*, 1988, 158; 399-402
- 34- HALILA H, STENMAN UH, SEPPALA M. Ovarian cancer antigen CA 125 levels in pelvic inflammatory disease and pregnancy, *Cancer*, 1986, 57, 1327-1329
- 35- PITTAWAY DE. The use of serial CA 125 concentrations to monitor endometriosis in infertile women. *Am J Obstet Gynecol*, 1990, 163, 1032-1037
- 36- BERGMANN JF, BIDART JM, GEORGE M, BEAUGRAND M, LEVY VG, BOHUON C. Elevation of CA 125 in patients with benign and malignant ascites. *Cancer*, 1987, 59, 213-217
- 37- MEICLER PH, DARAI E. Une cause originale d'élévation du CA 125 sérique. *La presse Médicale*, 1994, 23, 345

GAZOMETRIE

I - QU'EST CE QUE L'EQUILIBRE ACIDE BASE

II - MECANISMES REGULATEURS DE LA CONCENTRATION EN IONS H⁺

III - TROUBLES DE L'EQUILIBRE ACIDO-BASIQUE

IV - CONCLUSION GENERALE

Quand on aborde la gazométrie sanguine, il est fondamental d'avoir un rappel de notions claires à ce niveau. Le terme « Homéostasie » est couramment utilisé, The Random House Dictionary of the English language en donne la définition suivante : « Tendance manifestée par un système, en particulier le système physiologique des animaux supérieurs à maintenir sa stabilité interne de par la réponse coordonnée de ses différents constituants, à toute situation ou stimulus tendant à perturber ses conditions de fonctionnement normal ». Une notion importante est la constance du pH à une température donnée. Ainsi à 37° C l'optimum d'activité des enzymes clés s'établit aux valeurs de pH extracellulaires et intracellulaires considérées comme normales.

Une caractéristique des liquides de l'organisme est de répondre à une structure anio-cationique comprenant des acides et des bases s'associant en partie dans des systèmes tampons. On peut identifier la régulation du pH et celle de l'équilibre acido-basique, l'évaluation minimum implique la mesure de deux des trois paramètres de Henderson - Hasselbach : c'est à dire le pH, la concentration des bicarbonates plasmatiques ou la concentration plasmatique de l'acide carbonique.

■ I QU'EST CE QUE L'ÉQUILIBRE ACIDE BASE ?

La vie cellulaire génère ou consomme des acides et des bases, ce qui permet de définir un bilan des (H⁺) en mettant en présence des entrées et les sorties des (H⁺).

La notion d'un bilan des (H⁺) nul dans l'organisme adulte à l'état saisonnier doit être considéré comme fondamental en matière de physiologie acido-basique.

Toute perturbation pathologique déséquilibrant le bilan, va engendrer une modification de l'équilibre entre acide et sel et une variation du pH.

L'approche du bilan de la (H⁺) se fait en évoquant leur origine, leur devenir dans l'organisme et la façon dont ils sont sécrétés quantitativement par le rein.

I.1- Les entrées

Les entrées sont définies par les apports alimentaires et le métabolisme interne.

L'apport alimentaire en ions H⁺ est essentiellement représenté par les acides aminés soufrés contenus dans les protéines mais également par certaines protéines pouvant générer des ions phosphates.

Le métabolisme interne est également une source d'ions H⁺, ainsi l'acide carbonique, terme ultime du métabolisme, en est une source importante. Dans les conditions pathologiques, il peut y avoir une formation excessive d'ions H⁺. Dans les conditions normales l'acide lactique est produit par les éléments figurés sanguins rouges et blancs, les muscles squelettiques et le cerveau. Lorsqu'il y a accumulation d'ions lactates et d'ions hydrogène liés apparaît ce que l'on appelle « l'acidose lactique ». Le retour à l'équilibre passe par le rétablissement du métabolisme aérobie qui permet une dégradation hépatique des lactates, aboutissant à de l'eau et du dioxyde carbone comme métabolites terminaux, des acides cétoniques apparaissent aussi lorsque le glucose cellulaire est inutilisable, les voies anaérobies prenant le relais. On observe cette situation chez le diabétique en manque d'insuline ou lors d'un jeûne prolongé.

I.2- Les sorties

Chez le sujet normal, le rein permet l'élimination des ions H^+ liés à des anions non volatils grâce à divers mécanismes de contrôle.

Le poumon n'intervient que sur les ions H^+ liés à l'anion volatil HCO_3^- , l'élimination se fait sous forme de CO_2 et H_2O .

Le bilan d'ions H^+ peut être influencé par des déperditions digestives, comme vomissements (pertes acides) ou diarrhées (pertes alcalines).

Physiologiquement, le bilan d'ions H^+ est nul, ce qui veut dire qu'il y a équilibre entre les entrées et les sorties de telle sorte que le pH des liquides de l'organisme reste pratiquement constant.

Dans des circonstances pathologiques, il peut survenir un déséquilibre entre les entrées et les sorties qui va engendrer soit un bilan positif d'ions H^+ (acidose), soit un bilan négatif d'ions H^+ (alcalose).

Cette constance est maintenue grâce à l'existence de mécanismes régulateurs

■ II. MECANISMES REGULATEURS DE LA CONCENTRATION EN IONS H^+

Lorsque les substances acides ou basiques tendent à perturber le pH des liquides de l'organisme, ce dernier dispose de plusieurs moyens de défense qui vont, selon les circonstances, plus ou moins s'associer afin de maintenir la constance en ions H^+ du milieu intérieur.

II.1- Les systèmes tampons

Des systèmes tampons sont présents dans les diverses phases des liquides de l'organisme.

a) Les tampons du sang

Cet effet tampon est moins important qualitativement et quantitativement que celui des cellules.

Les tampons les plus importants du sang sont représentés par l'hémoglobine des érythrocytes, ainsi que par les bicarbonates les protéines et les phosphates du plasma.

Le rôle des bicarbonates est dû d'une part à la quantité présente dans le sang, d'autre part au fait que sa transformation en H_2CO_3 libère une molécule de CO_2 qui va être évacuée par voie pulmonaire.

La contribution du système tampon phosphate est plus faible parce que la concentration plasmatique est peu élevée.

La capacité tampon du sang est suffisante pour amortir des variations physiologiques de la concentration des ions H^+ de l'organisme au cours du métabolisme normal. Il intervient en favorisant l'élimination au niveau pulmonaire et rénal.

Dans les conditions pathologiques on peut avoir une production accrue d'ions H^+ ou au contraire une altération au niveau du rôle joué par les reins ou les poumons. Ceci nécessite alors la mise en jeu d'autres systèmes tampons.

b) Les tampons cellulaires

Les cellules contiennent généralement plus de protéines et de phosphates, moins de bicarbonates ; les plus importants sont les protéines leur rôle est surtout très important dans les conditions pathologiques

- Régulation des ions H^+ par le poumon :

L'acide carbonique est produit au cours des processus métaboliques en quantité très importante, il est rapidement transformé en CO_2 qui est sécrété par voie pulmonaire, d'autre part l'ion bicarbonate est une base tampon importante pour l'organisme.

Physiologiquement, la régulation de la ventilation est telle que l'excrétion du CO_2 est assurée de telle sorte que la PCO_2 reste autour de 40 mmHg (5,5 kpa). En cas de surproduction de CO_2 la ventilation alvéolaire augmente afin d'assurer l'homéostasie de la concentration en ions H^+ de l'organisme. La PCO_2 dans le sang artériel est le reflet direct de la capacité des poumons à adapter les échanges air-sang aux nécessités métaboliques. La PCO_2 est le reflet direct et immédiat de la capacité de la ventilation alvéolaire à répondre aux besoins métaboliques. Le déséquilibre acide-base est avant tout la conséquence d'un mauvais fonctionnement de la ventilation.

- Régulation des ions H^+ par le rein :

Si le poumon assure l'élimination des ions H^+ liées à un anion volatil, le rein est seul capable d'assurer l'élimination des ions H^+ liés à des anions non volatils. Pour modifier de manière significative le pH sanguin, un délai de plusieurs heures est nécessaire au système rénal, alors que quelques secondes suffisent au système respiratoire.

Le rein assure le contrôle du bilan des ions H^+ grâce à 3 mécanismes tubulaires :

- Excrétion des bicarbonates

- Excrétion d' H^+ sous forme d'ammoniaque

- Excrétion d' H^+ sous forme d'acidité titrable

- Excrétion des bicarbonates :

Au stade de filtrat glomérulaire, l'urine présente une concentration ionique et une PCO_2 identique à celle du plasma. De ce fait la concentration en bicarbonates est identique à celle du plasma puisque les ions hydrogène se lient d'abord aux bicarbonates. Il s'ensuit que les ions bicarbonates passent de l'urine dans le sang, les ions hydrogène étant sécrétés par l'anion.

- Excrétion d' H^+ sous forme d'ammoniaque :

La plus grande partie des ions H^+ de l'urine est éliminée sous forme d'ion NH_4^+ . Selon les conditions pathologiques (acidose ou alcalose), cette excrétion augmente ou diminue. Cette ammoniogenèse tubulaire s'effectue à partir de certains acides aminés, en particulier la glutamine. Dans certaines conditions les ions ammonium peuvent être sécrétés en même temps que les ions chlorés.

- Excrétion d' H^+ sous forme d'acides faibles :

La presque totalité de ces acides faibles est constituée par du phosphate monosodique. Dans le plasma ces phosphates sont à l'état disodique ; c'est au cours de leur traversée tubulaire par processus d'échange ionique, que ces phosphates deviennent monosodique, par abandon d'ions Na^+ contre un H^+ libre. Ceci se produit lorsque les ions bicarbonates de l'urine ne sont plus disponibles, les ions hydrogène se fixent sur les phosphates accroissant encore le taux de bicarbonates plasmatiques.

En résumé pour chaque ion hydrogène sécrété dans l'urine, le sang acquiert un ion bicarbonate. C'est cette capacité à enrichir le sang en ions bicarbonates qui permet aux reins de jouer un rôle important dans la régulation de l'équilibre acido-basique.

II.2- Equilibre acide base chez l'individu normal

Le PH normal du sang oscille entre 7,38 et 7,42. L'écart entre les concentrations extrêmes compatibles avec la vie cellulaire est de l'ordre d'une unité pH, encore qu'un état d'acidose ou d'alcalose extrême soutenue deviendra rapidement léthal. Le pH et les bicarbonates plasmatiques sont très stables ; ceci en dépit de deux sources d'entorses à la neutralité que sont la production d'acide carbonique liée au métabolisme cellulaire et l'introduction d'acides liés à l'alimentation.

L'acide carbonique se trouve presque exclusivement sous forme de CO_2 dissous dans le plasma. Comme précisé plus haut, le CO_2 formé en permanence par ces cellules est éliminé par les poumons. Ceux-ci règlent donc la pression partielle en CO_2 .

L'équation d'Henderson-Hasselbach fait apparaître clairement le facteur respiratoire (la PCO_2) et le facteur métabolique (taux de bicarbonates).

■ III. TROUBLES DE L'EQUILIBRE ACIDO-BASIQUE

Tout phénomène pathologique influençant directement la PCO_2 va engendrer des variations de l'équilibre acido-basique de type respiratoire.

L'augmentation de la PCO_2 du fait par exemple d'une hypoventilation alvéolaire entraîne un état d'acidose respiratoire ; tandis qu'une baisse de la PCO_2 , du fait d'une hyperventilation alvéolaire engendre un état d'alcalose respiratoire.

Tous les phénomènes pathologiques influençant de manière directe les bicarbonates vont créer des variations de l'équilibre acido-basique de type métabolique. Une baisse de bicarbonates du fait d'une rétention d'ions H^+ par mauvais fonctionnement tubulaire rénal engendre un état d'acidose métabolique, alors que le phénomène inverse créera un état d'alcalose métabolique.

Les règles d'homéostasie sont telles qu'une modification d'un des termes constituant l'équilibre en ions H^+ du milieu intérieur entraîne immédiatement des phénomènes de compensation qui vont tendre à normaliser le pH. Les troubles ventilatoires primitifs engendrent des phénomènes de compensation d'ordre métabolique, alors que des troubles métaboliques primitifs vont entraîner des phénomènes de compensation d'ordre ventilatoire. Ainsi l'acidose métabolique crée un état d'hyperventilation avec baisse de la PCO_2 permettant la normalisation de la concentration en H^+ du sang.

D'autre part le degré d'acidose métabolique du sang artériel témoigne de l'acidose métabolique de l'ensemble de l'organisme. Il faut noter que si les échanges cellulaires-extracellulaires intéressent les processus pathologiques respiratoires et métaboliques, il en est de même des mécanismes rénaux qui interviennent en réduisant l'élimination des ions H^+ en cas d'alcalose extra-cellulaire et en augmentant son excrétion en cas d'acidose extracellulaire, les phénomènes de compensation respiratoire sont réservés aux perturbations métaboliques.

Lorsqu'il y a conjonctures pathologiques associant chez le même malade des troubles respiratoires et métaboliques, l'interprétation de ces troubles mixtes se fait en confrontant les données biologiques aux signes cliniques et à l'histoire de la maladie.

■ IV. CONCLUSION GENERALE

L'évaluation de l'équilibre acide-base implique au minimum la mesure de deux des trois paramètres de l'équation d'HENSEN-HASSELBACH : c'est à dire le pH, la concentration des bicarbonates plasmatiques ou la concentration plasmatique de l'acide carbonique. On peut mesurer directement le pH et calculer indirectement la concentration plasmatique de l'acide carbonique en mesurant le CO_2 dissous dans le plasma. La mesure du pH et de la PCO_2 permet donc le calcul de la concentration plasmatique des bicarbonates.

Enfin les processus enzymatiques et biochimiques du métabolisme intracellulaire ne peuvent se dérouler de façon convenable et efficace qu'à l'intérieur d'un intervalle très étroit de concentrations des ions hydrogène. De plus certaines fonctions essentielles comme celles liées au myocarde, au système nerveux central ainsi que les interactions entre les composés chimiques d'origine endogène ou exogène et leurs effecteurs cellulaires exigent un pH bien déterminé. Les phénomènes pathologiques apparaîtront lorsqu'il y aura dérégulation en particulier au niveau fonctionnel de certains organes régulateurs important comme le poumon ou le rein.

CAUSES D'ERREURS DANS LA DETERMINATION DE LA GAZOMETRIE SANGUINE

A. FEUILLU

I - ERREURS PRÉANALYTIQUES

II - ERREURS ANALYTIQUES

III - ERREURS AU NIVEAU DES DIFFERENTS ELEMENTS TECHNOLOGIQUES ANNEXÉS

IV - CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

CAUSES D'ERREURS DANS LA DETERMINATION DE LA GAZOMETRIE SANGUINE

A. FEUILLU

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

La détermination de la gazométrie sanguine prouve, spécifie et quantifie les anomalies de l'homéostasie du système cardio-pulmonaire. Des diagnostics et des décisions thérapeutiques dépendent de ce type d'examen, ceci grâce à des instruments sophistiqués, toujours disponibles et qui fonctionnent correctement. Néanmoins ceci n'exclut pas les erreurs, celles-ci peuvent se situer avant l'analyse, d'autres en cours d'analyse.

I. ERREURS PRÉANALYTIQUES

Il s'agit d'erreurs qui surviennent au cours du prélèvement, du transport ou de la conservation ;

- Le prélèvement :

Il est important de connaître avec précision le site de ponction (artère, veine, capillaire), les conditions ventilatoires (air ambiant, oxygénothérapie, ventilation assistée). Le prélèvement doit se faire à l'abri de l'air avec comme anticoagulant de l'héparine. L'utilisation d'héparine liquide en trop grande quantité peut entraîner une erreur de dilution, une concentration de 1 µ/ml entraîne une acidification - immédiate de 0,003, ceci explique entre autre qu'il faille réaliser la mesure le plus rapidement possible. Quand l'espace mort (150 µµl) d'une seringue (5 ml) est rempli avec une solution d'héparinate de sodium, la dilution est de 3 %, la concentration de bicarbonates et la pCO₂ varient proportionnellement à cette dilution. Une petite bulle d'air dans la seringue ne changera pas le pH et la pCO₂ mais peut modifier notablement une saturation en oxygène basse et une PO₂ élevée. Il faut s'assurer qu'il s'agit bien d'un prélèvement artériel et que le volume soit suffisant de manière à répéter éventuellement la mesure. Un minimum de renseignements sont absolument indispensables. C'est ainsi qu'en plus des indications habituelles on doit noter l'heure du prélèvement, la nature de la ventilation (spontanée, assistée, contrôlée) éventuellement la composition approximative du mélange gazeux inhalé, air enrichi. en O₂ avec indication de la concentration en O₂.

Un prélèvement de sang capillaire nécessite une artériolisation correcte du site de ponction (bonne vasodilatation) sinon des erreurs par défaut peuvent survenir sur les valeurs hautes de pO₂ du fait de la forme sigmoïde de la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine. La qualité du résultat dépend aussi de la spontanéité de l'écoulement et de la rapidité du transfert dans le tube capillaire.

Conservation et manipulation des échantillons : normalement on ne doit pas parler de conservation dans le domaine de la mesure d'échantillons pour la gazométrie sanguine. Le délai écoulé avant l'analyse doit être le plus court possible entre le moment du prélèvement et celui de la mesure. Il ne doit pas excéder 15 minutes quand l'échantillon est conservé à température ambiante ou 60 minutes quand l'échantillon se trouve dans une enceinte réfrigérée, ceci afin d'éviter tout phénomène de glycolyse pouvant amener une diminution du pH et une élévation de la pCO₂. C'est la raison pour laquelle on conserve l'échantillon dans la glace. Le tableau suivant emprunté à B.A. SHAPIRO montre les modifications des gaz du sang in vitro, par intervalle de 10 minutes en fonction de la température.

	37° C	4° C
PH	0,01	0,001
pCO ₂	1 mmHg	0,1 mmHg
pO ₂	0,1 vol %	0,001 vol %

À la température du corps la consommation d'oxygène par les globules blancs est importante, 100 ul de sang consomme 0,1 ml d'oxygène en moins de 10 minutes. De fait en plaçant l'échantillon dans la glace fondante on

abaisse le niveau métabolique des globules blancs, ceci pour plusieurs heures. L'absence de refroidissement correct de l'échantillon avant son analyse représente une source d'erreur.

Pour faciliter les prélèvements, plusieurs sociétés (AVL, CIBA-CORNING, BECTON-DICKINSON, TERUMO, RADIOMETER TACUSSEL...) proposent des seringues ou capillaires préhéparinés. Des études indiquaient que le plastique était perméable au gaz en particulier à l'oxygène. Ces suppositions n'ont jamais été confirmées. En fait les valeurs de pH et de pCO_2 ne sont guère affectées, alors que celles concernant des pO_2 élevées supérieures à 400 mmHg chutent plus rapidement dans des seringues en plastique que dans des seringues en verre. Un des inconvénients d'un tel matériau est l'apparition de petites bulles d'air adhérent fortement aux parois de la seringue, rendant parfois difficile la purge d'air de l'échantillon. Par contre ce matériel est parfaitement étanche. Il existe aussi des seringues tamponnées avec de l'héparinate de calcium permettant la détermination du calcium ionisé sur sang total. L'intérêt de ce matériel est d'éliminer les conséquences défavorables de l'utilisation d'un anticoagulant tout en empêchant la coagulation.

Les conditions anaérobies doivent être strictement respectées. Dans l'air ambiant si la pCO_2 est proche de 0, la pO_2 est d'environ 150 mmHg, aussi la présence de bulles d'air dans un échantillon sanguin peut amener des perturbations au niveau des valeurs. Ainsi on peut avoir une diminution de la valeur de pCO_2 sanguine, une augmentation du pH et une valeur de pO_2 proche de 150 mmHg. Aussi faut-il purger le plus rapidement possible l'échantillon, afin d'éviter toute contamination.

■ II. ERREURS ANALYTIQUES

La mesure de pH, de la pCO_2 et de la pO_2 sur sang est réalisée grâce à des électrodes particulières. Cette caractéristique n'est pas sans poser de problèmes pouvant être plus facilement cause d'erreur.

pH : l'électrode pH a un potentiel qui dérive dans le temps et qui varie d'une électrode à une autre. La calibration est effectuée régulièrement. L'exactitude de la mesure du pH dépend de la qualité des solutions tampons étalons, de la stabilité de la température dans la chambre de mesure, de la concentration de KCl dans le pont salin et de l'effet mémoire de l'électrode de verre ; ce dernier peut être supprimé par un rinçage efficace. La présence de globules rouges modifie le potentiel de jonction liquide – liquide : plus l'hématocrite est élevé, plus bas sera le pH mesuré par rapport à celui du plasma correspondant. Dans les meilleures conditions la précision est de l'ordre de $\pm 0,02$, l'inexactitude sur la mesure le pH peut atteindre 0,05 unité pH. La différence de potentiel étant une fonction linéaire du pH, une calibration à l'aide de deux points est généralement suffisante pour des mesures précises du pH sanguin.

pCO_2 : l'exactitude de la pCO_2 dépend de l'exactitude de la pCO_2 du gaz de calibrage, elle dépend aussi de la température dans la chambre de mesure (4 % pour un écart de $1^\circ C$), de la qualité de la membrane et de la contamination du spécimen par le gaz ou la solution de calibrage.

pO_2 : Il faut tenir compte de l'exactitude de la pO_2 de calibrage, du facteur gaz-sang et du voltage de polarisation de l'électrode qui peut être modifié par la présence de gaz anesthésique. Un écart de $1^\circ C$ par rapport à $37^\circ C$ entraîne une erreur de 7 %.

La calibration : les mélanges gazeux étalons utilisés pour calibrer des canaux de mesure de pO_2 doivent être très soigneusement analysés. Autrefois on vérifiait la composition de chaque bouteille avec l'appareil de John LANDE. Maintenant les fabricants fournissent avec leurs bouteilles des certificats d'étalonnage. Les erreurs à ce niveau sont très rares, mais toujours possibles ; la valeur des concentrations est donnée à $\pm 0,05$ % près. Il ne faut pas prendre des bouteilles d'un volume de gaz trop important pour éviter un phénomène de stratification des gaz. On l'évite en conservant les bouteilles couchées. Les tuyaux reliant les thermodétendeurs à l'analyseur doivent être en la matière aussi étanches que possible aux gaz (néoprène par exemple) et surtout pas en matière plastique transparente et mince pour éviter toute dissolution du gaz dans le plastique. La pression déterminante pour les

échanges de part et d'autre de la paroi de ces tuyaux n'est pas la pression totale mais la pression partielle. Il existe aussi des analyseurs équipés de mélangeurs de gaz. Ces analyseurs permettent à partir de l'air et d'une bouteille de CO₂ de réaliser les mélanges nécessaires à la calibration, ceci nécessite un appareillage en parfait état.

Les solutions tampons étalons de pH sont conservées à l'abri de l'air. Elles doivent, bien entendu, elles aussi être exactes. Les solutions tampons ayant une certaine valeur de pH « dans le flacon » sont équilibrées avec un mélange gazeux contenant du CO₂ pour atteindre la valeur réelle de calibration pour le pH et la pCO₂ (6,11 p). On doit respecter les dates de péremption pour éviter toute modification du pH de ces tampons utilisés comme solution d'étalonnage.

■ III. ERREURS AU NIVEAU DES DIFFERENTS ELEMENTS TECHNOLOGIQUES ANNEXÉS

Les électrodes doivent contenir des électrolytes frais, non contaminés. Les membranes sont imperméables aux liquides, le pont KCl de la chaîne doit contenir du KCl sursaturé. Il faut éviter toute contamination par l'air au niveau de la jonction liquidienne, sinon on a un risque de perturbations au niveau des mesures.

Le système de nettoyage des électrodes doit être parfaitement efficace, il faut éviter tout encrassement ou dépôt protéique, sinon on observe dans ce cas une diminution plus ou moins importante de la valeur réelle de la pO₂.

La pression barométrique

La mesure de la pression barométrique doit être très précise. Toute imprécision à ce niveau amène une erreur au niveau de la calibration. On ne doit pas oublier que les valeurs de calibration sont établies à partir de la pression atmosphérique du local où se situe l'appareillage de détermination de la gazométrie sanguine. Le calcul de la pression est établie à l'aide de la formule :

$$\frac{B - 47}{100} \times y$$

y étant la valeur des gaz étalons de pO₂ et pCO₂ très précisément mesurés comme indiqué plus haut.

■ IV. CONCLUSION

La détermination du pH et des gaz du sang connaît à ce jour un grand intérêt. Non seulement la conception de la mesure est maintenant très fiable grâce à l'automatisation et l'informatisation des systèmes, mais également grâce au développement de techniques dérivées de la spectrophotométrie, tels que les oxymètres de pouls qui permettent des enregistrements en continu de la SaO₂, de façon non invasive. Aussi les principales causes d'erreurs lors de cette détermination sont dues à des problèmes annexes comme des défauts de maintenance, une mauvaise manipulation telle que l'introduction défectueuse de l'échantillon. Ce développement ne doit pas aller sans la pratique d'un contrôle de qualité, dans ce domaine plusieurs possibilités sont offertes depuis la tonométrie jusqu'à l'utilisation de solutions de contrôle de qualité de composition différente.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- CAPEL (L.M.), FLETCHER (E.L.) and MUMM (J.P.). Carbon dioxide production of whole blood in vitro, Nature, 1965, 208, 82
- 2- HAMSEM M.E. Blood gas proficiency testing materials : a multilaboratory comparison of an aqueous solution and a fluorocarbon containing emulsion. Clin. Chem, lettre à l'éditeur 1982, 28, 1819

CO-OXYMETRIE

ET FORMES USUELLES D'HEMOGLOBINE

J.-F. MOLLARD

I - DÉFINITION

II - INTÉRÊT

III - NOTIONS FONDAMENTALES

III.1 - Terminologie/Symbolique

III.2 - Physiologie du transport de l'oxygène

III.2.1 - Oxygène dissous

III.2.2- Oxygène combiné

III.2.3 - Saturation

III.3 - Hémoglobine fœtale

IV - LES DYSHÉMOGLOBINES. INFORMATIONS COMPLÉMENTAIRES

IV.1 – Carboxyhémoglobine

IV.2 - Méthémoglobine

IV.3 - Sulfhémoglobine

V - AUTRES APPLICATIONS DE LA CO-OXYMETRIE

CO-OXYMETRIE

ET FORMES USUELLES D'HEMOGLOBINE

J.-F. MOLLARD

CAHIER
DE
Formation
version numérique

BIOFORMA

I. DÉFINITION

Ce néologisme est inventé (mais non breveté à l'époque) par Instrumentation Laboratory en 1966 lorsque cette Société présente le premier modèle commercial d'un oxymètre in vitro (pour mesurer l'hémoglobine oxygénée), mais capable également de mesurer simultanément la quantité de carboxyhémoglobine (COHb) présente dans le spécimen,

Cet oxymètre particulier est donc logiquement appelé CO-Oxymètre (IL 182). N'étant pas immédiatement déposé, ce nom est utilisé ensuite par plusieurs autres fabricants. Il est maintenant largement employé pour désigner un instrument capable de mesurer de façon simple les quatre ou cinq formes d'hémoglobine usuelles, dont bien entendu COHb.

II INTÉRÊT

Les analyseurs de pH/gaz du sang modernes, avec leur calculateur intégré fournissent maintenant la totalité des informations nécessaires à l'évaluation complète de l'état acido-basique d'un patient. En fait, ils donnent beaucoup plus que le nécessaire, avec par exemple l'excès de bases des liquides extra-cellulaires (EBlec), les bases- tampons (BT), etc.

L'énorme quantité de valeurs disponibles est même parfois source de confusion pour les cliniciens utilisateurs et la configuration « à la carte » des rapports-patients imprimés est pratiquement indispensable.

Par contre, ce même analyseur hautement performant fournit des informations intéressantes mais insuffisantes et parfois même potentiellement dangereuses sur l'oxygénation. Il mesure la PO_2 , pression partielle d'oxygène, qui donne des renseignements suffisants sur la ventilation du patient et l'état de la membrane alvéolo-capillaire lorsqu'on les compare à la F_1O_2 , (fraction d'oxygène dans le mélange gazeux inspiré). Il calcule la saturation à partir de concepts physiologiques, donc parfaitement corrects pour un sujet sain mais sans doute pas pour un malade.

Comme nous le verrons, chaque fois que nous désirons ou avons besoin d'informations sérieuses, fiables et complètes sur l'oxygénation, il nous faut la PO_2 mais aussi la plupart sinon toutes les valeurs fournies par le CO-Oxymètre. Un tel appareil n'est donc pas l'accessoire mais le complément naturel d'un automate de gazométrie sanguine.

Malheureusement, la CO-Oxymétrie a longtemps souffert de :

- une certaine mauvaise réputation de l'IL 182 (sans concurrent pendant plus de dix ans). C'était un excellent appareil mais développé à une époque où la technologie n'était pas suffisamment avancée. Au début des années 60, il n'existait ni microprocesseurs, ni réseaux holographiques, ni barrettes de diodes, ni d'électronique sophistiquée. L'analyseur souffrait de pannes assez fréquentes, son recalibrage était très long et délicat, ses filtres interférentiels devaient être fréquemment remplacés, etc.
- l'impossibilité à l'époque d'expliquer des résultats parfois étranges de taux de COHb élevés (6 à 7 %) dans le sang de nouveau-nés non intoxiqués et de mères non fumeuses.
- un manque d'information de la plupart des utilisateurs. Il existe toujours, mais à un moindre niveau. Ceci est lié peut-être à une insuffisance d'enseignement mais surtout à l'absence de ce sujet dans la plupart des ouvrages fondamentaux.

Quel est l'apport d'un CO-Oxymètre moderne au clinicien en supplément de la PO_2 , fournie par l'automate de gazométrie sanguine ?

Il mesure de façon exacte et précise les cinq formes d'hémoglobine éventuellement présentes en concentrations significatives dans un spécimen sanguin :

Oxyhémoglobine	O ₂ Hb
Déoxyhémoglobine	HHb
Carboxyhémoglobine	COHb
Méthémoglobine	MetHb
Sulfhémoglobine	SulfHb

À partir de ces valeurs, il calcule :

Hémoglobine totale	ctHb
Saturation en oxygène	SO ₂ % (ou SO ₂ % ou SO ₂ %)
Contenu en oxygène	cO ₂
Capacité en oxygène	Cap.O ₂

donnant ainsi une image exacte de la fraction d'hémoglobine transportant réellement l'oxygène, rôle essentiel de cette protéine, tout en fournissant des valeurs calculées moins sujettes à caution.

Vous accédez en outre aux mesures de carboxyhémoglobine, méthémoglobine et sulfhémoglobine parfois significativement augmentées dans certaines pathologies et disposez ainsi d'une aide au diagnostic, voire de la signature même de celui-ci.

Qui donc peut être intéressé par la CO-Oxymétrie ? :

- le clinicien pneumologue
- le laboratoire d'exploration fonctionnelle pulmonaire et cardiaque
- les Services de Soins Intensifs
- la salle d'opérations (chirurgie lourde)
- le laboratoire de toxicologie
- le laboratoire central.

■ III NOTIONS FONDAMENTALES

III.1- Terminologie/Symbolique

Afin d'essayer de parler la même langue, d'éviter les erreurs d'interprétation et d'éliminer de longues phrases, les physiologistes et les physiopathologistes respiratoires ont défini depuis longtemps (1950) une série de symboles maintenant familiers (Convention de Pappenheimer). Entre-temps, plusieurs Comités Scientifiques ont fourni un travail important dans ce domaine. Ainsi le NCCLS américain (National Committee for Clinical Laboratory Standards) a récemment publié un opuscule de recommandations en CO-Oxymétrie et la Fédération Internationale de Chimie Clinique (IFCC) travaille également dans ce domaine. Ce sujet n'est pas simple. Les sources de confusion sont nombreuses et je pense donc qu'il convient de suivre pour l'instant les recommandations du NCCLS (à ce jour les plus complètes)... avec quelques exceptions que nous mentionnerons plus loin.

Terminologie et symbolique ne sont certes pas des thèmes très passionnants. Toutefois la physiopathologie respiratoire est une discipline suffisamment complexe pour qu'elle ne soit pas encore compliquée par l'utilisation, pour désigner une même entité, de symboles différents et parfois fantaisistes.

Les symboles les plus importants sont :

PHASE SANGUINE

Source/Symbole

- sang artériel : a
- sang veineux : v
- sang capillaire: c
- sang veineux mêlé : \bar{v}

PHASE GAZEUSE

*Source/Symbole**

- air alvéolaire : A
- air inspiré: I
- air expiré: E

* Les lettres majuscules utilisées pour les gaz doivent être de même hauteur que les minuscules du texte.

- Pression partielle : P (convention de Pappenheimer) ou *p* (IFCC) ou *P* (NCCLS). Cet exemple particulier montre combien il est difficile d'être simple. En hommage à nos pairs nous utiliserons exclusivement P.

Note

Comme la plupart des écrans, lecteurs et imprimantes des automates de gazométrie sanguine du commerce sont incapables d'afficher ou d'écrire des lettres italiques, on trouve également le symbole, "p" qui crée bien entendu confusion avec le " p " du pH.

- Concentration d'une substance: c
- Fraction d'une substance : F (convention de Pappenheimer) ou *F* (total = 1,00). Nous utiliserons **F**.
- Saturation: S (convention de Pappenheimer) ou *s* (IFCC) ou *S* (NCCLS). Nous utiliserons **S**.
- Total d'une entité (sous toute ses formes) : t.
- Capacité de fixation : **B**.

Bien entendu O₂, CO₂, et CO sont les symboles des gaz qui nous intéressent. Idéalement les chiffres devraient être Légèrement décalés vers le bas par rapport aux lettres, mais cette " liberté » est tolérée.

Les symboles plus spécifiques à la CO-Oxymétrie sont:

Entité/Analyte	Symbole
Hémoglobine	Hb
Oxyhémoglobine	O ₂ Hb
Déoxyhémoglobine	HHb
Méthémoglobine	MetHb
Carboxyhémoglobine	COHb
Sulfhémoglobine	SulfHb
Hémoglobine F	HbF (F = fœtale)
Hémoglobine A*	HbA* (A = adulte)*
Oxyhémoglobine F	O ₂ HbF
Déoxyhémoglobine F	HHbF
Contenu en O ₂	cO ₂ (oxygène combiné)
Contenu total en O ₂	ctO ₂ (O ₂ combiné + dissous)
Saturation en O ₂	SO ₂ % (ou sO ₂ % ou SO ₂ %)
Fraction d'O ₂ Hb	F _{O₂} Hb (ou FO ₂ Hb)
Fraction de HHb	F _{HHb} (ou FHHb)
Fraction de COHb	F _{COHb} (ou FCOHb)
Fraction de MetHb	F _{metHb} (ou FMetHb)
Fraction de SulfHb	F _{sulfHb} (ou FSulfHb)

*Par convention, lorsque le variant n'est pas spécifié, il s'agit d'hémoglobine de type "adulte"

La concentration fractionnelle en O₂ dans l'air inspiré est symbolisée par *F*_IO₂ (ou *F*_IO₂).

Comme on le voit la forme d'hémoglobine est spécifiée par un **préfixe** : COHb, MetHb,... mais un variant est spécifié par un **suffixe** : HbF, HbA,...

Les deux peuvent être combinés : *F*_{O₂}HbF est la concentration fractionnelle en oxyhémoglobine fœtale.

III.2- Physiologie du transport de l'oxygène

Le maintien de la vie nécessite l'apport permanent d'oxygène aux cellules et plus particulièrement aux petites organelles que sont les mitochondries. Cette tâche est dévolue :

- aux poumons qui pompent *séquentiellement* l'air atmosphérique (*F*_IO₂ = 0,209) jusqu'aux alvéoles dont le contenu n'est renouvelé que *partiellement* à chaque cycle ventilatoire et
- au sang pompé *en continu* par le cœur et qui amène l'oxygène des alvéoles vers les tissus. Cette fonction dépend elle-même de deux éléments : le débit cardiaque et la qualité de l'hémoglobine transporteuse. Si tel ou tel de ces systèmes vient à défaillir, tout peut arriver. Notons au passage qu'un ensemble constitué d'un automate de gazo-

métrie sanguine et d'un CO-Oxymètre, si performants soient-ils, ne peut renseigner que sur l'oxygénation *potentielle* des tissus. Tant qu'un problème circulatoire éventuel n'est pas général, il est impossible de déceler avec cette instrumentation si tel ou tel tissu ou organe ne souffre pas d'hypoxémie, car le sang est toujours prélevé dans une artère volumineuse et périphérique. Il s'agit là d'une limitation générale de la méthode.

Avant d'aller plus loin signalons que toutes les quantités mentionnées seront exprimées en unités conventionnelles (mmHg ou torr). Ces deux unités sont pratiquement identiques, mais la définition du torr est plus précise que celle du mmHg. Nous oublierons pour l'instant les unités SI.

L'oxygène est transporté dans le sang sous deux formes : dissoute et combinée (à l'hémoglobine).

III.2.1- Oxygène dissous

Comme tout gaz dans tout liquide, l'oxygène est soluble dans le sang. Pour un gaz donné et un liquide donné ce phénomène varie en fonction de la température et proportionnellement à la pression du gaz. À 37 °C la quantité ainsi transportée dans le sang artériel est :

$$\text{Oxygène dissous} = 0,00314 \times \text{PaO}_2$$

donc, chez un adulte jeune, normal, dont la PO₂ artérielle = 90 mmHg :

$$0,00314 \times 90 = 0,28 \text{ soit } 0,30 \text{ ml O}_2/100 \text{ ml de sang total.}$$

0,00314 est le *coefficient de solubilité* de l'oxygène dans le sang à 37 °C, exprimé en ml d'oxygène (ou « volumes ») pour une pression partielle de 1 mmHg.

Cela ne représente pas beaucoup d'oxygène, MAIS :

- étant proportionnel à la PO₂, l'oxygène dissous double lorsque la PO₂ double, triple lorsque la PO₂ triple, etc. Il n'existe pas de limite à ce phénomène. Nous pouvons en effet ventiler nos patients avec de l'oxygène pur en pression normale ou en hyperbarie.
- l'oxygène dissous est la seule forme utilisable par les mitochondries. L'oxygène fixé sur l'hémoglobine doit repasser par la forme dissoute pour pouvoir être utilisé. L'oxygène dissous est LA forme d'utilisation.

Toutefois, dans les conditions normales, le volume sanguin total (5 litres), d'un adulte jeune normal respirant l'air ambiant à la pression atmosphérique contient et transporte seulement 14 ml d'oxygène pour une PaO₂ = 90 mmHg. Les besoins au repos étant de 250 ml d'O₂/min., l'oxygène dissous ne peut satisfaire que 5,5 % de ceux-ci. Le reste est assuré par l'oxygène combiné.

III.2.2- Oxygène combiné

Au niveau alvéolaire l'oxygène se fixe sur l'hémoglobine pour constituer l'hémoglobine oxygénée ou oxyhémoglobine O₂Hb. Cette réaction est réversible de telle sorte que l'oxyhémoglobine puisse relarguer son oxygène au niveau tissulaire en devenant de l'hémoglobine déoxygénée ou déoxyhémoglobine HHb. L'ancien terme « hémoglobine réduite » doit être banni car « réduction » s'oppose à « oxydation ». Or, il ne s'agit pas ici d'oxydation mais d'oxygénation.

L'étude de l'hémoglobine est passionnante. De nombreux chercheurs y ont voué toute leur existence. Nous la décrirons ici très brièvement afin de mieux comprendre ce qui suit.

- L'hémoglobine est un tétramère de globine, comprenant quatre chaînes protéiques.
- Chacune d'entre elles porte un groupe hème (**Fig. 1**).
- La globine est ainsi composée de quatre chaînes d'acides aminés (dites polypeptidiques) : deux chaînes α (141 acides aminés) et deux chaînes β (146 acides aminés).
- Un groupe hème est fixé sur chacune de ces chaînes.
- Chaque groupe hème est constitué d'un noyau porphyrinique avec au centre un fer ferreux (Fe⁺⁺). L'oxygène se fixe sur l'hémoglobine au niveau de cet atome de fer. Cette combinaison est relativement lâche, donc réversible.
- Une molécule d'oxygène peut se combiner avec un Fe⁺⁺, donc quatre molécules d'oxygène peuvent se combiner à une molécule d'hémoglobine. Nous pouvons dire aussi qu'une molécule d'hémoglobine est normalement capable de fixer et de transporter quatre molécules d'oxygène.

- Après de longues recherches, on admet maintenant que le poids moléculaire de l'hémoglobine est égal à 64 458. Ainsi 64 458 g d'hémoglobine sont capables de fixer et de transporter 4 x 22 414 ml d'O₂ et 1 gramme d'hémoglobine est capable de fixer :

$$(4 \times 22\,414) / 64\,458 = 89\,656 / 64\,458 = 1,39 \text{ ml d'O}_2$$

Cette valeur, (symbole = B) est appelée par les Français « *pouvoir oxyphorique* », par les Anglo-Saxons « *pouvoir de fixation de l'oxygène* » (oxygen binding power) et par les Allemands « *facteur de Hüfner* » (Hüfner's faktor) en hommage à ce savant allemand qui l'avait mesuré expérimentalement dès 1894. Notons à ce propos qu'il avait travaillé non pas sur l'oxygène mais sur le CO (pouvoir de fixation quantitativement identique mais qualitativement beaucoup plus fort). Il avait mesuré une valeur de 1,34 à une époque où le poids moléculaire de l'hémoglobine n'était qu'approximativement connu.

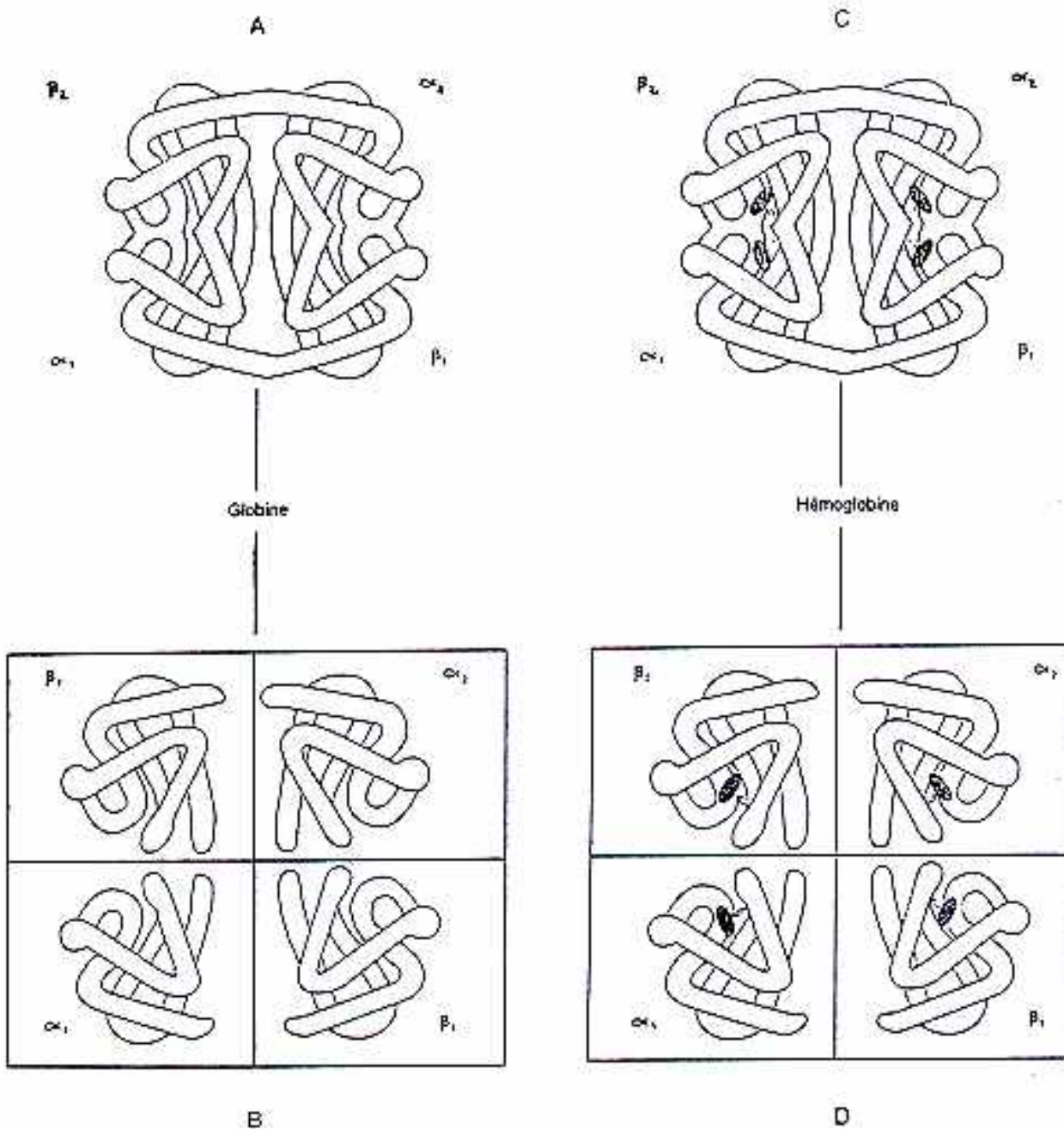


Figure 1 : Représentations schématiques de la globine et de l'hémoglobine.

En **A** et **B** on voit que la globine est faite de quatre chaînes polypeptidiques (deux chaînes α et deux chaînes β).

En **C** et **D** : Chaque chaîne polypeptidique est combinée à un groupe hème. L'oxygène se fixe sur l'hémoglobine au niveau du fer de chaque groupe hème.

D'après HENRY J.B.: *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 17th Ed. Philadelphia. W.B. Saunders Cy. 1984.

- Dans les conditions normales, 100 ml de sang total contiennent $15,5 \pm 1$ g d'Hb (homme) et $14,5 \pm 1$ g d'Hb (femme). Considérons 15 g comme une valeur moyenne de concentration en hémoglobine capable de fixer l'oxygène.
- Selon ce qui précède, 100 ml de sang total contenant 15 g d'hémoglobine seront donc capables de fixer et de transporter :

$$15 \times 1,39 = 20,8 \text{ ml O}_2 \text{ sous forme combinée.}$$

C'est par définition, la plus grande quantité d'oxygène que ce volume de sang est capable de transporter à l'état combiné. On l'appelle donc « *capacité en oxygène du sang* ». Observons que cette notion ne concerne que l'hémoglobine susceptible de fixer l'oxygène.

L'unité de volume de sang ne transporte jamais, dans les conditions normales, la totalité de l'oxygène théoriquement transportable. La quantité transportée est toujours moindre et appelée « *contenu en oxygène du sang* » (cO_2).

La terminologie actuelle définit le contenu en oxygène du sang comme la somme de l'oxygène dissous et de l'oxygène combiné. Dans les conditions physiologiques, le contenu est toujours inférieur à la capacité. Dans certaines conditions il devient égal voire supérieur à celle-ci, ce qui peut paraître curieux. Certains ont donc proposé de réserver le terme de « contenu » à la seule fraction combinée (c'est ce sens que nous lui donnerons dans ce qui suit) et de définir un « contenu total en oxygène (ctO_2) », somme de l'oxygène dissous et combiné.

Si nous considérons la limite inférieure de la normalité de concentration en hémoglobine chez la femme et la limite supérieure chez l'homme, il est évident que la fourchette physiologique de capacité en oxygène est très large. Par contre, le rapport entre contenu et capacité reste remarquablement constant d'un sujet à l'autre dans la mesure, encore une fois, où toute l'hémoglobine disponible est capable de s'oxygéner (ce qui n'est pas forcément le cas) ou bien si nous considérons exclusivement la fraction oxygénable de l'hémoglobine totale. Afin de différencier l'hémoglobine oxygénable de l'hémoglobine totale, nous l'appellerons « hémoglobine fonctionnelle » (hémoglobine capable de fonctionner... vis-à-vis de l'oxygène). Cette terminologie n'est pas acceptée par tous mais nous semble fort pratique... et déjà largement utilisée par les cliniciens.

Le rapport :

hémoglobine oxygénée/hémoglobine oxygénable

est appelé « *saturation en oxygène* » (SO_2 ou sO_2 ou SO_2). Sa valeur normale est 96 à 97 %.

Si nous revenons à l'exemple précédent où la capacité en oxygène était de 20,8 ml, le contenu sera :

$$20,8 \times 96 \% = 19,96 \text{ soit } 20 \text{ ml O}_2 \text{ (combiné)/100 ml de sang total.}$$

Il existe une relation entre PO_2 et contenu en oxygène. Sa forme n'est absolument pas linéaire mais sigmoïde et liée à la cinétique de combinaison de l'hémoglobine avec l'oxygène. Sa représentation graphique est bien connue sous le nom de courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine (CDO) ou courbe de Barcroft (**Fig. 2**). La PO_2 figure en abscisse. En ordonnée on trouve le contenu en oxygène ou, pour un sang donné, le rapport contenu/capacité c'est-à-dire la saturation.

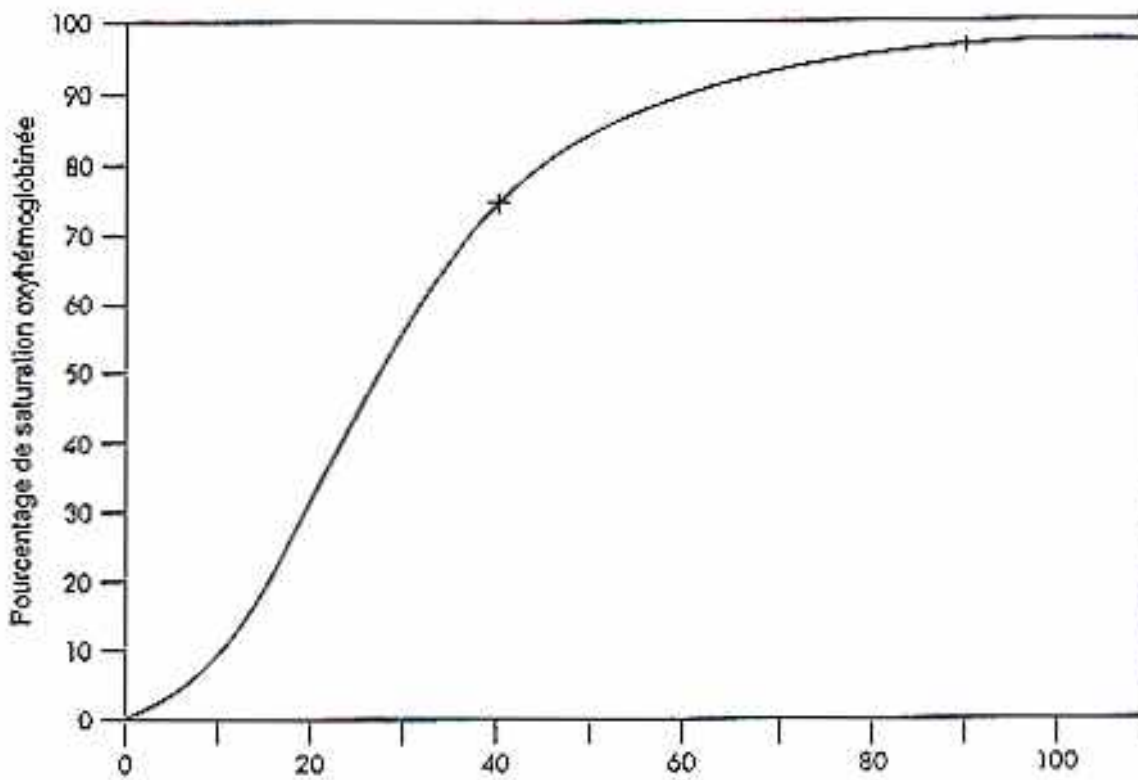


Figure 2 : Courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine (CDO) ou courbe de BARCROFT

L'oxygénation d'une molécule d'hémoglobine déoxygénée HHb commence toujours sur l'atome de fer de la chaîne α -1. Une fois oxygéné cet atome de fer change légèrement de position dans la molécule et toute la chaîne α -1 pivote. Il y a rupture de certains ponts salins entre les chaînes α avec libération d'ions H^+ appelés aussi protons Bohr. Il devient alors plus facile pour la seconde molécule d'oxygène de se fixer sur l'atome de fer de la chaîne α -2. Un mécanisme similaire détruit les derniers ponts inter- α . Les chaînes α se déplacent légèrement. Les ponts entre chaînes α et β sont rompus. Les chaînes β se rapprochent et l'accès à l'hème devient plus facile. Cette transition allostérique est responsable du passage de la forme déoxygénée à la forme oxygénée. La fixation de l'oxygène sur les différentes sous-unités s'est accrue de telle sorte que le quatrième tétramère β -2 fixe sa molécule d'oxygène environ 200 fois plus rapidement que la première chaîne α -1. Ce phénomène porte le nom d'« interaction hème-hème » et explique la forme de la courbe de dissociation.

STRYER l'illustre par l'exemple d'un bloc de quatre timbres-poste oblongs : - pour en prendre un, il faut séparer les dents de deux de ses côtés ; pour le second on sépare les dents d'un côté long, ce qui est plus facile ; pour le troisième on sépare les dents d'un côté court, ce qui est encore plus facile. Le quatrième est évidemment alors spontanément disponible.

Sur cette courbe de dissociation, nous avons reporté deux points particulièrement intéressants et concernant le sang artériel et le sang veineux mêlé. Lorsque la PO_2 passe de 90 à 40 mmHg, soit une perte de 60 % de sa valeur initiale, le contenu en oxygène passe seulement de 20,0 à 15,6 ml (ou la saturation de 96 à 75 %), soit une perte inférieure à 25 % de sa valeur initiale. Le sang veineux mêlé contient donc encore les trois quarts de l'oxygène qu'il pourrait transporter sous forme combinée.

La courbe de dissociation devrait nous permettre de calculer facilement la saturation à partir de la PO_2 et le contenu en oxygène à partir de la saturation et de la capacité, calculée elle-même à partir de $ctHb$ et du pouvoir oxyphorique. Malheureusement, il ne s'agit pas de mathématiques... La courbe tracée ici est celle d'un sujet parfaitement normal, à 37° C. Si sa forme générale reste assez constante, sa position par rapport à l'abscisse (PO_2) peut varier significativement sous l'influence de plusieurs facteurs rappelés sur la **figure 3**.

La courbe peut se déplacer vers la gauche ou la droite sous l'influence de variations de la température, du pH, etc. Si nous nous rappelons que tous les automates de gazométrie sanguine sont thermostabilisés à 37° C et qu'ils calculent la saturation à partir de la PO_2 en utilisant une courbe de dissociation standard mémorisée et en corrigeant

selon ce qu'ils mesurent et calculent (pH et CO₂ Total ou bicarbonate ou Excès de Bases), on peut aisément comprendre qu'une saturation ainsi calculée ne soit qu'approximative dans de nombreuses circonstances pathologiques.

La courbe de dissociation d'oxyhémoglobine exprime clairement ce que l'on entend par *affinité* de l'oxygène pour l'hémoglobine. Lorsqu'elle se déplace vers la gauche, on voit qu'une PO₂ moindre suffit pour atteindre un même niveau de saturation donc de contenu en oxygène. L'affinité est augmentée. Lorsqu'elle se déplace vers la droite, une PO₂ plus importante est nécessaire pour atteindre la même saturation ou le même contenu. L'affinité est diminuée.

Au niveau de la membrane alvéolo-capillaire, une affinité élevée est idéale puisqu'une PaO₂ (donc une PAO₂) plus basse va suffire pour assurer un contenu en oxygène suffisant. Au niveau tissulaire, la situation est totalement inverse car une affinité accrue rend alors moins facile le relargage de l'oxygène. On peut donc considérer que la courbe de dissociation normale, telle qu'elle se présente, constitue un moyen terme, adapté aux conditions physiologiques.

Afin de définir et de quantifier ce concept d'affinité tout en évaluant l'amplitude de déplacements éventuels, les physiologistes devaient choisir un point suffisamment significatif et facile à se rappeler sur la courbe de dissociation et cela si possible sur une portion de la courbe où les variations de PO₂ expriment au mieux le déplacement de cette dernière. Ils ont choisi, tout naturellement, la « P50 », valeur de PO₂ nécessaire pour saturer à demi le sang en oxygène. Sa valeur normale chez l'adulte est de 26,7 mmHg. Elle est plus basse chez le fœtus et le nouveau-né (23 mmHg).

Une P50 abaissée signe une augmentation d'affinité et inversement.

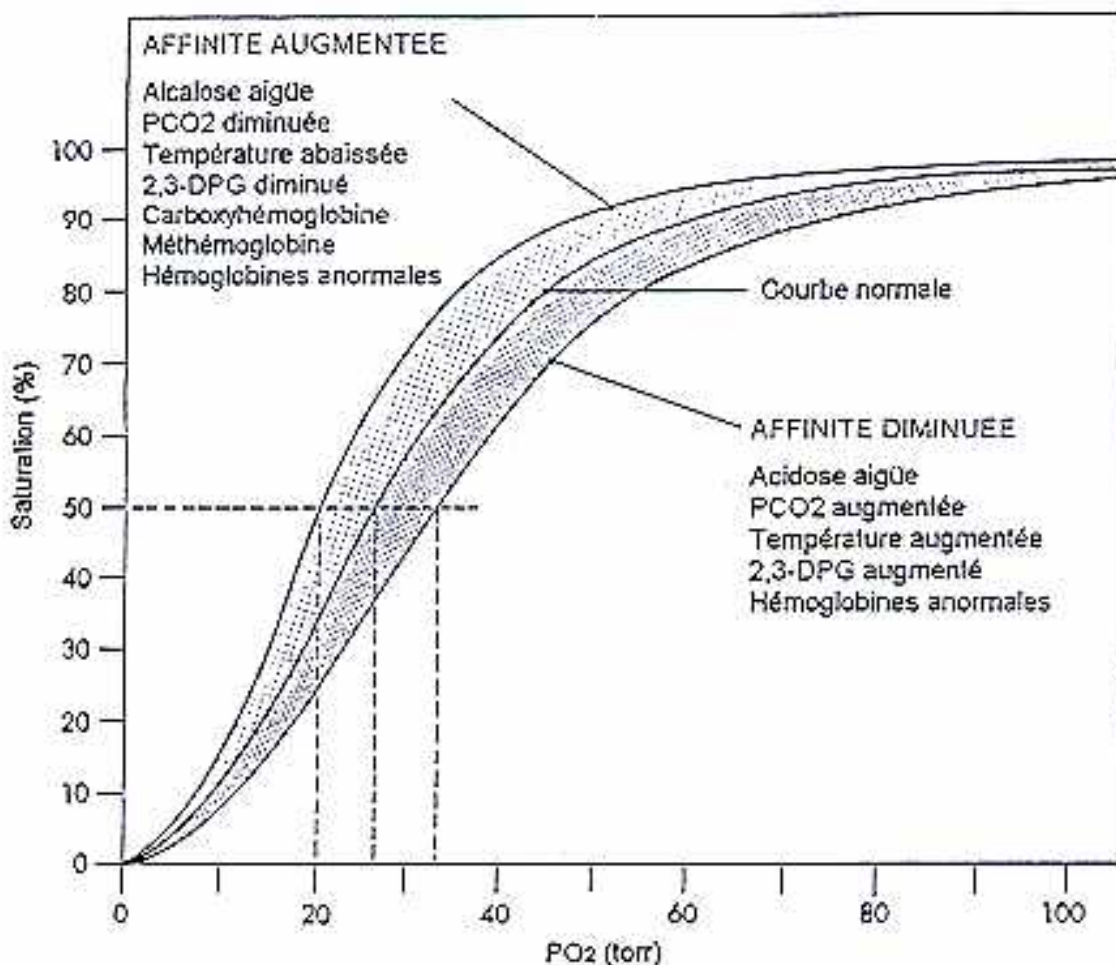


Figure 3 : Observons que si nous raisonnons pour le pH en terme d'activité en ions hydrogène, toute augmentation de valeur des éléments influents entraîne une diminution d'affinité et inversement. La notion « hémoglobines anormales » figure dans les deux cas car certaines présentent une augmentation d'affinité et d'autres une diminution.

D'après LANE E.E. *Clinical Arterial Blood Gas Analysis*. C.V. Mosby Cy. 1987.

Certains automates de gazométrie sanguine conservent en mémoire deux types de courbe de dissociation (adulte et fœtale) pour calculer la saturation. Il y est de même parfois possible de mémoriser une P50 choisie par l'utilisateur. Les saturations calculées sur ces instruments sont alors moins fausses que dans des conditions trop standardisés. Le tableau suivant résume des caractéristiques essentielles des deux formes de transport de l'oxygène dans le sang.

Oxygène dissous	Oxygène combiné
Quantitativement peu important = 0,3 ml/100 ml de sang	Quantitativement très important = 19,8 ml/100 ml de sang
Qualitativement indispensable : seule forme d'utilisation possible pour les mitochondries Forme d'utilisation	Inutilisable tel quel. Doit absolument repasser par la forme dissoute pour pouvoir être utilisé par les mitochondries Forme de stockage
Pas de limite	Limite pratique : capacité en oxygène du sang
Proportionnel à la PO ₂	Lié à la PO ₂ par la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine (pas linéaire)

III.2.3- Saturation

Cette notion, toujours très « populaire », a été utilisée de façon exclusive pendant très longtemps par les cliniciens à une époque où la PO₂ était très difficile voire impossible à mesurer directement. Il faut se souvenir que l'électrode de CLARK n'a été utilisable couramment qu'à la fin des années 50 et que les techniques précédemment employées étaient compliquées et fastidieuses.

Comme déjà indiqué, la saturation est le rapport contenu/capacité en oxygène du sang ou le rapport oxyhémoglobine/oxyhémoglobine + hémoglobine restant oxygénable (HHb). Ces deux formes sont appelées par certains « hémoglobines fonctionnelles » (capables de fonctionner... avec l'oxygène). Il n'y aurait aucun problème si l'hémoglobine était toujours normale et capable en totalité de transporter l'oxygène. Ce n'est pas le cas :

- **A.** Un autre gaz normalement quasi absent mais présent en quantité significative dans certaines pathologies est, lui aussi, capable de se fixer sur l'hémoglobine. C'est le monoxyde de carbone ou CO. L'affinité du CO pour l'hémoglobine est environ 250 fois plus importante que l'affinité de l'oxygène. De très faibles concentrations en CO sont donc suffisantes pour concurrencer victorieusement l'oxygène et prendre sa place sur les sites d'hémoglobine.

Dans les conditions normales, il existe toujours un peu de COHb dans le sang à cause du métabolisme et en particulier, de la mort et de la destruction des hématies. Un sujet normal non fumeur vivant dans un environnement parfaitement non pollué possède environ 1 à 2 % de son hémoglobine sous forme de COHb. Ainsi 99 à 98 % seulement de son « capital hémoglobine » reste disponible pour l'oxygénation. Chez ce même sujet vivant dans une grande cité bien polluée la carboxyhémoglobinémie peut monter à 3 ou 4 %.

Le sang d'un « bon fumeur » contient environ 10 % de COHb et la valeur la plus élevée personnellement mesurée chez un très gros fumeur (60 cigarettes par jour) dépassait légèrement 20 %. Donc dans ce cas, 80 % seulement de son « capital hémoglobine » restait disponible pour une oxygénation éventuelle.

Bien entendu, dans les intoxications sévères au CO, ces valeurs peuvent être beaucoup plus élevées.

- **B.** Une très faible portion d'hémoglobine subit une légère modification chimique et passe réellement à l'état oxydé. Elle devient alors méthémoglobine (MetHb) et n'est plus capable de transporter l'oxygène. La concentration normale en méthémoglobine est inférieure à 1 %. Elle peut augmenter considérablement dans certaines maladies congénitales mais surtout dans les intoxications aux nitrites, nitrates et à d'autres produits chimiques. Ceci, bien entendu, va affecter le transport de l'oxygène.

- **C.** En présence d'hydrogène sulfuré (intoxications - sang de cadavre) on peut observer la formation de Sulfhémoglobine, pratiquement incapable de transporter l'oxygène. Cette pathologie est très rare.

Par opposition aux « *hémoglobines fonctionnelles* » ($O_2Hb + HHb$), $COHb$, $MetHb$ et $SulfHb$ sont appelées « *dys-hémoglobines* ». Elles font toujours partie du « capital hémoglobine » du sang mais ne peuvent plus transporter l'oxygène.

Nous pouvons donc représenter l'hémoglobine sous forme d'un gâteau dont la plus grande part est constituée d' O_2Hb avec de petites portions d' HHb , $COHb$, $MetHb$, $SulfHb$. La taille du gâteau (concentration en hémoglobine) est fixe pour un sujet donné à un moment donné. Voici le cas normal (**Fig. 4**). Les dys-hémoglobines ne représentent que 2 % de toute l'hémoglobine présente. 98 % reste disponible pour l'oxygénation. 97 % de ces 98 % est réellement oxygéné, soit 95 % de l'hémoglobine totale. Le reste est de l'hémoglobine déoxygénée.

Figure 5 : *Assez gros fumeur*

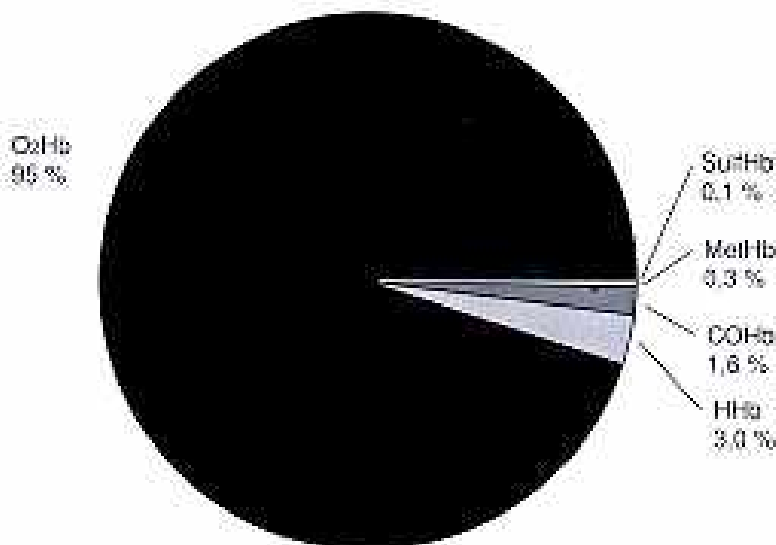
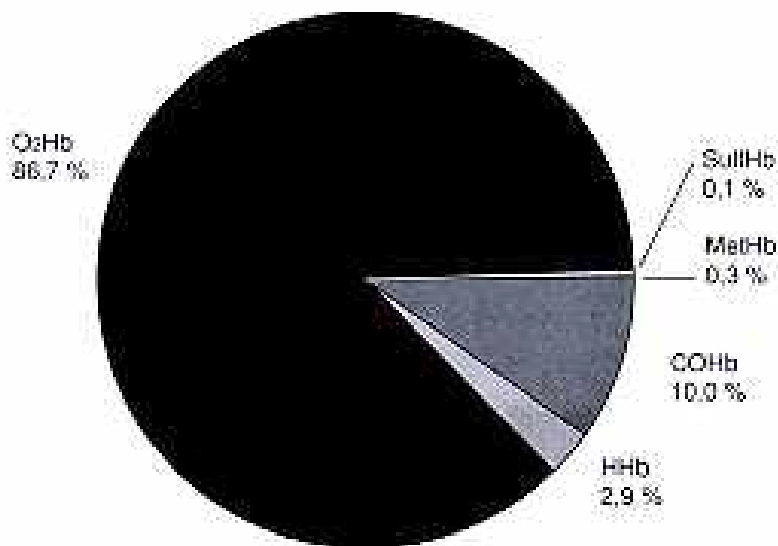


Figure 4 : *Situation normale*

La **figure 5** représente le cas d'un « bon fumeur », avec 10 % de $COHb$ au lieu des 1,6 % précédents. Cette augmentation absolue de 8,4 % intervient au détriment des autres formes fonctionnelles d'hémoglobine (O_2Hb et HHb), $MetHb$ et $SulfHb$ restant à leur niveau de base. O_2Hb tombe à 86,7 %, mais, si la ventilation est correcte, la PO_2 n'a pas varié.

L'exemple suivant (**Fig. 6**) est caractéristique. Il s'agit d'une intoxication sévère au CO. Comme précédemment l'augmentation de $COHb$ est intervenue exclusivement au détriment d' O_2Hb et HHb . O_2Hb est tombée à 28,7 % !! Un tel malade est généralement amené à l'hôpital par les pompiers ou toute autre organisation de secours et a déjà été sans doute ventilé entre-temps avec de l'oxygène pur. Sa PaO_2 a toutes chances d'être normale voire très élevée. La saturation calculée par un automate de gazométrie sanguine sera donc normale alors que le patient est proche de la mort !! Seule la CO-Oxymétrie peut vous informer de cela au laboratoire.



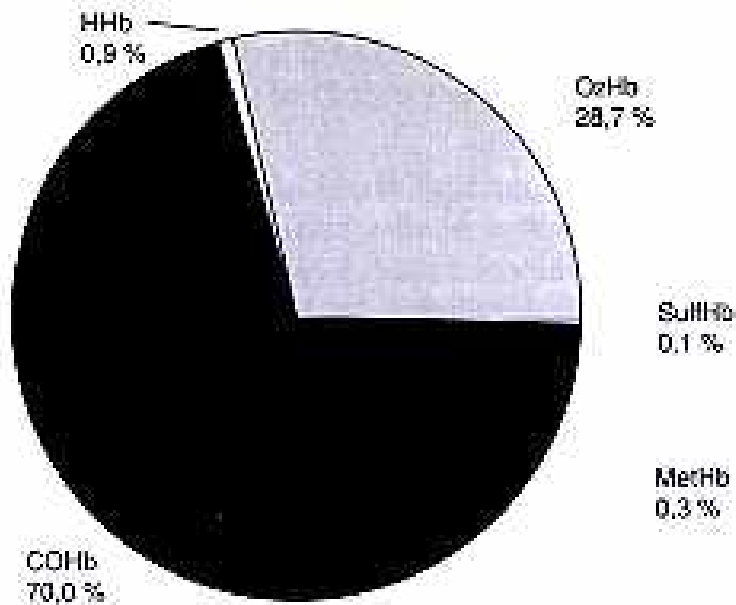


Figure 6 : Sévère intoxication oxycarbonée

Les problèmes sont similaires dans les cas de méthémoglobinémie ou de sulhémoglobinémie mais les concentrations atteintes ne sont jamais aussi élevées que dans le cas du CO.

L'impossibilité pour les oxymètres traditionnels simples, y compris les oxymètres de pouls modernes et/ou pour les automates de gazométrie sanguine de refléter de tels phénomènes est liée au fait qu'ils considèrent exclusivement la fraction oxygénable de l'hémoglobine (hémoglobine fonctionnelle) et mesurent ou calculent la saturation comme :

$$SO_2\% = O_2Hb/[O_2Hb + HHb] \quad (1)$$

Le CO-Oxymètre considère toutes les formes présentes dans le sang et calcule ce que l'on appelle maintenant « oxyhémoglobine fractionnelle » comme :

$$FO_2Hb = O_2Hb/[O_2Hb + HHb + COHb + MetHb + SulHb] \quad (2)$$

ou encore

$$FO_2Hb = O_2Hb/[O_2Hb + HHb + dysHb] \quad (3)$$

Le dénominateur est plus important en (2) ou en (3) qu'en (1). La valeur de la fraction est donc plus basse. Chez un sujet normal la différence est faible mais va augmenter dès qu'une ou plusieurs dyshémoglobines seront présentes en concentrations significatives.

Là encore, seul le CO-Oxymètre est capable de vous fournir ce type d'information.

On comprend également que les valeurs calculées sont beaucoup plus fiables lorsqu'elles sont fournies par un CO-Oxymètre. Prenons l'exemple du contenu en oxygène tel qu'il est calculé par un automate de gazométrie sanguine (AGS) d'une part et un CO-Oxymètre (CO-Ox.) d'autre part :

AGS : *ctHb* doit être mesuré par cet appareil (s'il est équipé d'un tel canal) ou par tout autre appareil fiable. Si vous calculez *ctHb* à partir de l'hématocrite, vous faites là déjà une première hypothèse. Vous pouvez aussi supposer une valeur de *ctHb* et la mémoriser dans le calculateur de l'appareil. Dans le pire des cas vous utilisez pour chaque patient la même valeur, mémorisée par défaut dans l'analyseur.

Celui-ci considère ensuite un pouvoir oxyphorique donné (habituellement préprogrammé à 1,39) et multiplie *ctHb* par celui-ci pour calculer la capacité en oxygène.

Il utilise enfin la saturation fonctionnelle calculée pour en déduire le contenu.

CO-OX : *ctHb* est calculé de façon très exacte par addition des cinq formes mesurées. Si vous n'admettez pas le pouvoir oxyphorique préprogrammé à 1,39 et préférez 1,34 ou 1,36 parce que c'est la valeur que l'on vous a enseignée, vous pouvez modifier à votre gré.

L'appareil considère ensuite la vraie quantité d'hémoglobine oxygénée (oxyhémoglobine fractionnelle ou FO₂Hb) pour calculer le contenu.

Exactitude et précision sont meilleures dans le second cas que dans le premier.

Dans l'exemple qui suit nous considérons que *ctHb* est déterminé de façon parfaitement précise et exacte dans les deux cas (ce qui est rare), que le pouvoir oxyphorique est égal à 1,39, que la courbe de dissociation est normale (ce qui est rarement le cas en pathologie) et que le patient est un fumeur « moyen » avec 10 % de COHb.

	GDS	CO-Ox
Hb	16,0 g/dl	16,0 g/dl
B	1,39	1,39
Cap O ₂ (calculée)	22,2 ml/100	22,2 ml/100
SO ₂ (calculée)	96,5%	96,5%
FO ₂ Hb (mesurée)		0,867 (86,7 %)
cO ₂ (calculé)	21,4 ml/100 ml	19,3 ml/100 ml

La différence est significative (10 %), même dans ces conditions idéales. Il est heureux que dans les études de shunt on soit plus intéressé par des différences que par des valeurs absolues. Mais pourquoi n'être pas précis et exact lorsque la technologie le permet ?

III.3- Hémoglobine fœtale

C'est le dernier point que nous discuterons dans la première partie de ce document car sa prise en compte automatique est essentielle si l'on est amené à analyser des sangs de prématurés et de nouveau-nés.

Les CO-Oxymètres utilisent des caractéristiques particulières des spectres d'absorption des cinq formes d'hémoglobine déjà mentionnées. Elles sont spécifiques d'un certain type d'hémoglobine, soit ici l'hémoglobine adulte ou HbA. Le sang du fœtus contient en concentration importante une hémoglobine différente appelée HbF (« F » pour fœtale), mieux adaptée semble-t-il aux conditions d'oxygénation particulière à un tel environnement. À la naissance HbF représente encore entre 90 et 70 % de l'hémoglobine totale d'un sang de nouveau-né (**Fig. 7**). Ce pourcentage décroît progressivement pour devenir quasi négligeable au bout de 6 à 9 mois. À partir de un an, on peut considérer que toute l'hémoglobine présente est de l'HbA.

Il se trouve malheureusement que les spectres d'absorption des différentes formes d'HbA et d'HbF sont légèrement différents (**Fig. 8**). Ainsi la présence d'HbF dans le spécimen entraîne des interférences et des résultats faux sur COHb (surestimé) et O₂Hb (sous-estimé dans les mêmes proportions). Rappelons que c'est une des raisons qui ont fait douter de la fiabilité de la CO-Oxymétrie à ses débuts, où l'on obtenait ainsi 6 à 7 % de COHb chez des nouveau-nés non intoxiqués et de mères non-fumeuses.

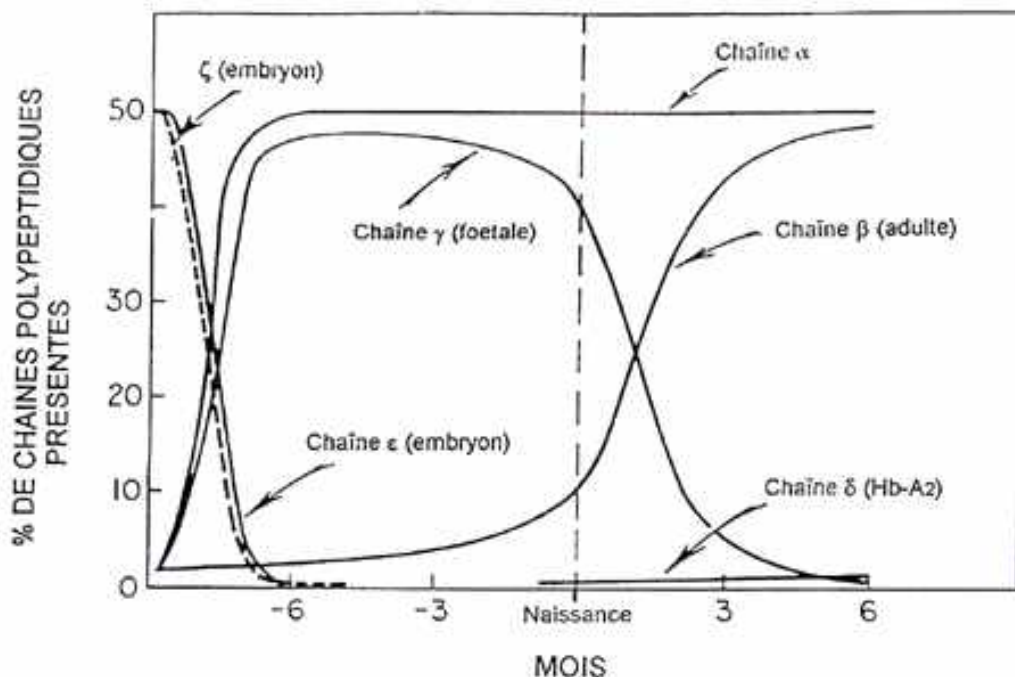


Figure 7 : Cinétique de synthèse des différentes chaînes polypeptidiques.

Les chaînes ζ et ϵ , exclusivement embryonnaires, ne sont normalement pas retrouvées à la naissance. La chaîne α est synthétisée très précocement et atteint un plateau dès le troisième mois de la vie embryonnaire. La chaîne γ suit au départ une cinétique semblable, mais qui se ralentit vers le 7^e mois de la vie intra-utérine puis tombe très rapidement dès la naissance tandis que la chaîne β suit une cinétique inverse. À un mois environ il n'y a pratiquement plus de chaînes γ . Elles sont remplacées par des chaînes β . D'après BECK W.S. *Haematology*, 1976, 2nd. Ed. Boston. MIT Press. USA.

D'un point de vue analytique HbF doit être considérée comme un interférent et traitée en conséquence. À ce jour, grâce au concept d'analyse multicomposants qu'ils utilisent, les CO-Oxymètres performants considèrent la quantité réelle d'HbF présente et corrigent les valeurs fournies en conséquence. Le système de correction secondaire proposé par certains n'est plus satisfaisant et doit être rejeté. Ceci est clairement démontré dans plusieurs publications scientifiques.

Les CO-Oxymètres les plus récents considèrent ainsi que le spécimen contient exclusivement HbA et HbF. Es considèrent également que HbA peut être présente sous les cinq formes classiques déjà décrites et que HbF peut être présente sous forme oxygénée ou déoxygénée (**Fig. 8**). En d'autres termes, ils prennent en compte 7 formes d'Hb : 5 pour HbA et 2 pour HbF.

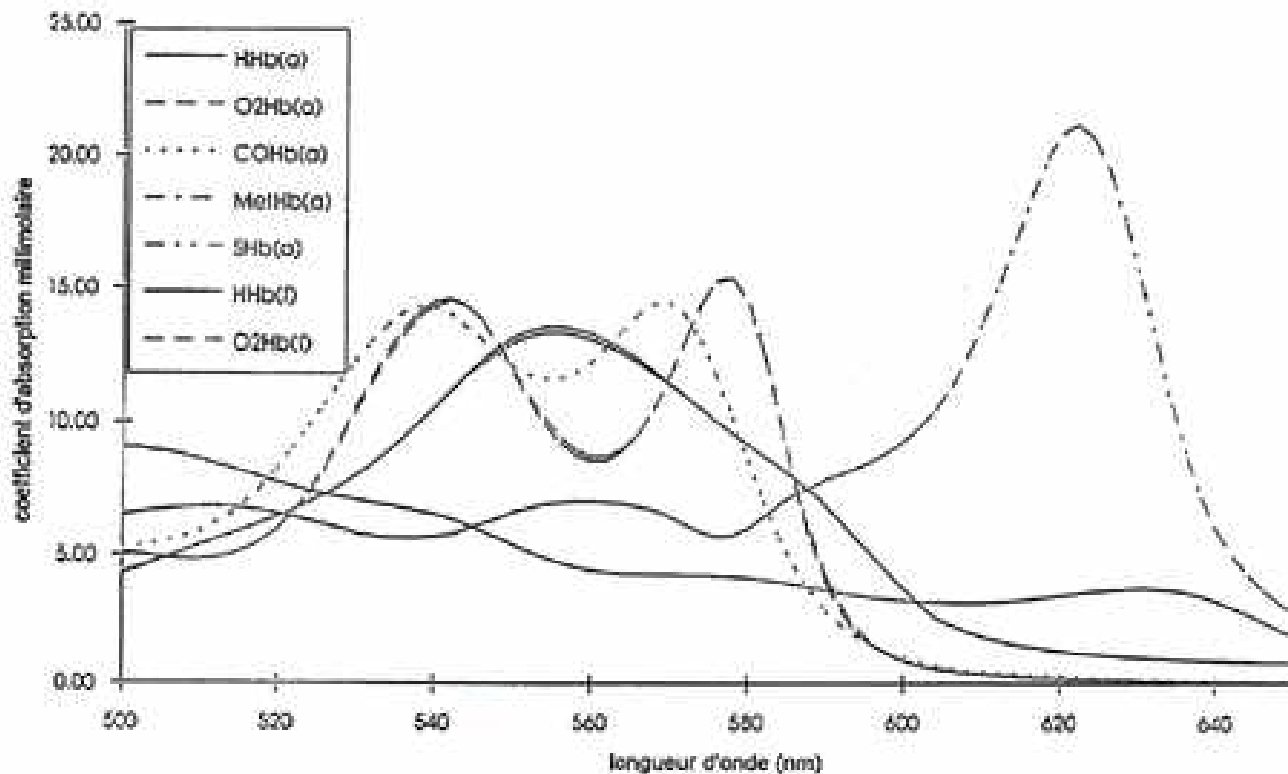


Figure 8 : Spectres d'absorption des différentes formes d'Hb devant être considérées.

Rappelons-nous ici qu'il faut raisonner en pourcentage et que négliger, par exemple, 5 % de COHbF liés à une pollution indirecte transplacentaire (mère « fumeuse ») entraîne une erreur de très peu d'amplitude.

■ IV. LES DYSHÉMOGLOBINES. INFORMATIONS COMPLÉMENTAIRES

Dans la première partie de ce document, nous avons seulement évoqué les trois dyshémoglobines et leur impact sur la saturation fonctionnelle. Nous allons maintenant les étudier plus avant.

IV.1- Carboxyhémoglobine COHb

Introduction

Le monoxyde ou oxyde de carbone CO est un gaz incolore et inodore de poids moléculaire = 28. C'est le produit de la combustion incomplète du carbone. Il est formé au cours des combustions lentes, est présent en concentration significative dans les gaz d'échappement des véhicules automobiles, etc.

Malgré des règlements sévères, une législation rigoureuse et toutes les mesures préventives, le nombre d'accidents par intoxication oxycarbonée atteint encore plusieurs milliers par an en France. Le début de l'hiver 95-96 a d'ailleurs été comme d'habitude assez meurtrier.

L'intoxication à l'oxyde de carbone est liée à deux grandes catégories de causes :

- « domestiques » (accidents à domicile) : mauvaise ventilation d'un système de chauffage, fentes dans un conduit de cheminée, ventilation insuffisante d'un chauffe-eau instantané, etc.
- « industrielles » : mauvaise ventilation des garages, parkings souterrains, gaz d'échappement de camions remontant dans les habitacles, etc.

N'oublions pas non plus le cas particulier des très gros fumeurs.

Unités

Selon le domaine d'application (industrie, médecine) on utilise différentes unités pour mesurer la concentration en CO.

- ppm (partie par million). Sa définition va de soi.

- % (dans les gaz). Définition claire mais source d'erreurs d'interprétation lorsqu'elle est comparée au % dans le sang.

Exemple : $100 \text{ ppm} = 100/1\,000\,000 = 1/10\,000 = 0,01 \%$

A 25 °C et PB = 760 mmHg, $1 \text{ ppm CO} = 1,15 \text{ mg/m}^3$ et $1,00 \text{ mg/m}^3 = 0,87 \text{ ppm}$.

- En toxicologie, la concentration est exprimée en volumes ou ml de CO pour 100 ml de sang total. Elle correspond à la somme du CO combiné (à l'hémoglobine et sans doute à d'autres substances) et du CO dissous.
- En CO-Oxymétrie on mesure la quantité de carboxyhémoglobine présente dans le spécimen et on rend le résultat correspondant en mmol/l de sang ou en % de l'hémoglobine totale.

Dire que Monsieur X « a 10 % de COHb » signifie que 10 % de son « stock d'hémoglobine » se trouve sous forme de COHb et donc indisponible pour l'oxygène et que 90 % seulement de ce stock reste disponibles pour le transport de l'oxygène. Ces 90 % constituent ce que l'on appelle « l'hémoglobine fonctionnelle ».

Si l'on se rappelle la notion de pouvoir oxyphorique précédemment définie, il est facile de passer d'une unité à l'autre en utilisant la formule :

$$\text{CO (en ml/100)} = ct\text{Hb} \times 1,39 \times \text{COHb}\%$$

Ainsi chez un patient dont $ct\text{Hb} = 15 \text{ g/100}$, une valeur de $\text{COHb} = 10 \%$ signifie que 1,5 gHb/100 sont bloqués par du CO (COHb). En volume, ceci représente $1,5 \times 1,39 = 2,08$ soit 2,1 ml (ou volumes) de CO/100 ml de sang. Mais attention ! Il ne s'agit là que du CO combiné à l'hémoglobine. De même que le CO-Oxymètre n'est pas capable de mesurer (ni de calculer) la quantité d'oxygène dissous, il n'est pas non plus capable de mesurer ou de calculer la quantité de CO dissous ou de CO combiné à d'autres substances que l'hémoglobine, ni a fortiori celle du CO total.

Il ne paraît donc pas facile de corréler les résultats des dosages de CO par extraction complète de ce gaz et mesure directe ou indirecte (chromatographie en phase gazeuse, extraction et détection en IR, microdiffusion, méthode au palladium) d'une part et par mesure directe (spectrophotométrie de COHb) d'autre part.

Ceci peut expliquer certaines disparités entre le taux de COHb et l'état clinique des patients sévèrement intoxiqués. Des travaux sont actuellement en cours à ce sujet.

Le CO-Oxymètre n'est pas un analyseur de CO total mais sa praticabilité et sa rapidité en font un outil extrêmement précieux d'aide au diagnostic et de dépistage dans ce domaine.

Valeurs

Les valeurs normales pour des sujets non fumeurs vivant dans des zones non polluées sont inférieures à 1,5 % (CASTAGNOU). À ce niveau, le mythe d'une COHb normale = 0 % doit être définitivement détruit. Le seuil basal de CO est dû au catabolisme de l'hème. Ceci est confirmé indirectement par la présence de taux plus élevés de COHb au cours des maladies hémolytiques, en l'absence de toute autre cause.

Chez ces mêmes non-fumeurs sains mais vivant dans une grande ville polluée, la valeur « normale » peut atteindre 4 %.

On considère généralement que l'intoxication au CO peut être affirmée à partir de 5 % et au-dessus.

L'incidence du tabagisme sur ces valeurs a été parfaitement bien étudiée. DESOILLE, TRUFFERT, LEBBE, PARENT, ont montré que le fait de fumer 20 cigarettes par jour entraînait des taux de COHb compris entre 5 et 9 %. D'autres auteurs mentionnent jusqu'à 10 %.

La concentration la plus élevée en COHb personnellement mesurée chez un homme adulte apparemment en bonne santé et fumant environ 60 cigarettes Gitane par jour était de 21 %. Il ne présentait pratiquement aucun signe clinique en dehors de maux de tête occasionnels et d'une certaine irritabilité.

Il est intéressant d'observer qu'il fumait moins pendant les week-ends où il avait par ailleurs une activité physique de plein air. Le lundi matin, quand il revenait au travail son oxycarbonémie était redescendue autour de 12 % pour remonter peu à peu pendant la semaine jusqu'au taux cité plus haut.

Cette observation est en accord avec les données de FABRE et coll. :

% COHb	Symptômes cliniques
10	Effet inappréciable. Respiration plus rapide en cas d'effort musculaire violent.
20	Effet inappréciable en général, sauf respiration rapide en cas d'effort, même modéré.
30	Léger mal de tête dans quelques cas.
40-50	Mal de tête, irritabilité, fatigue facile.
60-70	Mal de tête, confusion, collapsus et syncope en cas d'effort.
80	Perte de connaissance, arrêt de la respiration et mort en cas d'exposition prolongée.
plus de 80	Rapidement mortelle.
	Immédiatement mortelle.

Transport du CO dans le sang

Il est semblable à celui de l'oxygène : dissous et combiné. On trouve peu d'informations concernant le CO dissous dans la littérature et ce n'est que récemment que l'on a évoqué une toxicité directe du CO par effet métabolique de ce gaz dissous dans le plasma. Ceci pourrait expliquer le manque de relation évidente entre les symptômes cliniques de toxicité et les taux de COHb mesurés.

Quant au CO combiné, nous avons déjà vu qu'il se fixe sur l'hémoglobine pour former COHb. Il y a compétition entre CO et O₂. Normalement et heureusement l'oxygène en sort vainqueur car la PCO est incomparablement plus basse que la PO₂. La fixation réversible intervient sur les mêmes sites moléculaires de l'hémoglobine. Les pouvoirs de fixation pour le CO et l'oxygène sont donc identiques soit 1,39 ml/g Hb. Mais les affinités sont extrêmement différentes. Selon les auteurs, celle du CO pour l'hémoglobine est 210 à 245 fois plus élevée que celle de l'oxygène. Ainsi lorsque 100 molécules d'hémoglobine sont mises en présence d'un mélange gazeux contenant 21 % d'oxygène et 0,1 % de CO on obtiendra 50 moles d'O₂Hb et 50 moles de COHb.

En d'autres termes, une pression partielle en CO 200 fois plus faible que la pression artérielle en O₂ suffit ici pour obtenir 50 % de COHb.

L'observation des courbes de dissociation de CO et d'O₂ sur un même graphe (**Fig. 9**) donne une idée claire de ce phénomène. L'affinité du CO pour Hb est tellement élevée que la courbe de dissociation du CO n'est guère visible qu'à partir de 40 % de saturation et au-dessus.

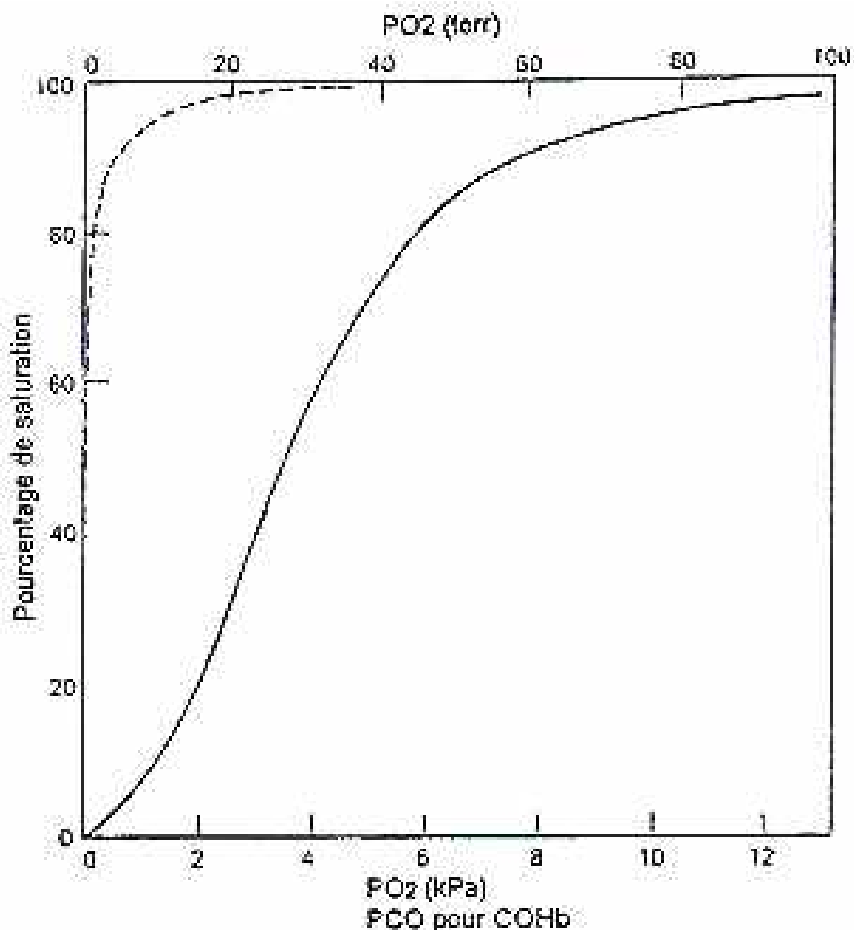


Figure 9 : Courbes de dissociation de O₂Hb et de COHb, toutes choses égales par ailleurs
D'après NUNN J.F. Applied Respiratory Physiology 1969. Butterworths. London.

L'hémoglobine combinée au CO n'est plus capable de se combiner à l'oxygène et ne peut donc assurer son transport.

En première approximation, nous pourrions penser que 10 % du COHb (par exemple) auront les mêmes conséquences sur le transport de l'oxygène qu'une anémie relative de 10 % soit, chez l'homme normal, 15,5 - 10 % = 4,5 g Hb/100 ce qui n'est pas réellement grave. Malheureusement, les conséquences physiopathologiques d'un taux élevé de COHb sont aggravées du fait que la présence de CO modifie l'affinité de l'hémoglobine restant disponible pour le transport de l'oxygène. En présence de CO et toutes choses égales par ailleurs, la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine se déplace vers la gauche, traduisant une augmentation de l'affinité de l'oxygène pour l'hémoglobine et rendant plus difficile le relargage d'O₂ au niveau des tissus.

Non seulement l'oxygène combiné a diminué mais l'affinité de l'oxygène pour l'hémoglobine restant disponible a augmenté. C'est ce que montre la **figure 10**. On y a représenté une courbe de dissociation normale pour ctHb = 14,4 g/100 ml, une différence artérioveineuse de 5 ml/100 et une PO₂ de 100 mmHg, et une courbe identique pour un sang anémique avec ctHb = 7,2 g/100 ml (donc anémie de 50 %). La P_VO₂ tombe à 27 mmHg, ce qui est bas mais reste acceptable. Enfin on y trouve une courbe de dissociation d'un sang contenant 50 % de COHb et une ctHb = 14,4 g/100 ml. Le contenu en oxygène à PO₂ = 100 mmHg est évidemment diminué de moitié mais le déplacement de la courbe vers la gauche, dû à la présence du CO, entraîne pour la même différence artérioveineuse une P_VO₂ de 14 mmHg, avec risque d'une PO₂ tissulaire dangereusement basse.

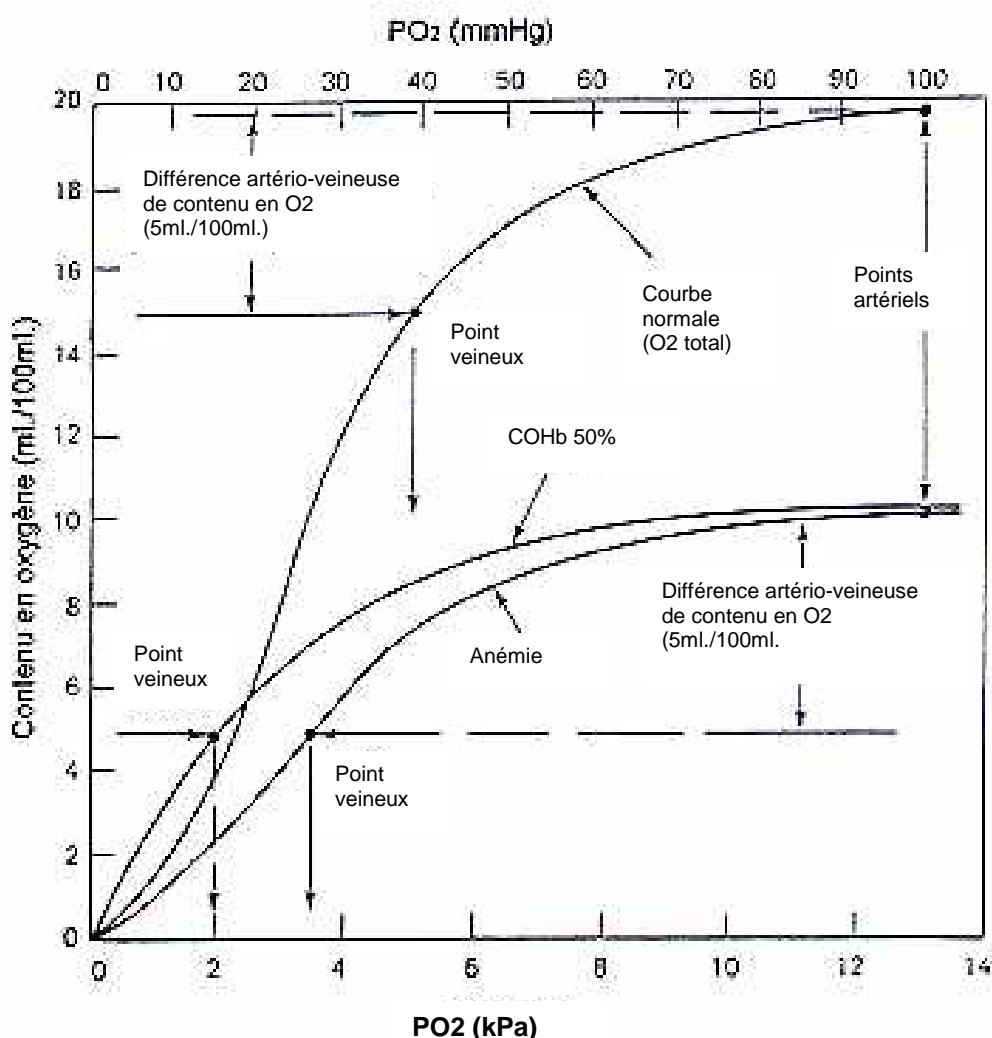


Figure 10 : Influences comparées de l'anémie et de l'intoxication oxycarbonée sur la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine (D'après NUNN J.F. op. cit.).

Comme déjà indiqué, le CO agit indiscutablement par toxicité directe sur les cytochrome-oxydases des cellules. Il se fixe sur les atomes de fer de ces oxydases qui ne peuvent alors plus jouer leur rôle d'activateur de l'oxygène moléculaire. Les oxydations cellulaires sont bloquées et une anoxie cellulaire par action directe intervient

(WARBURG). On observe des lésions histologiques dans le tissu cellulaire, ce qui démontre encore le sérieux de l'intoxication.

Nous ne parlerons pas ici des aspects cliniques de l'intoxication au CO. De très nombreuses publications existent à ce sujet.

Rappelons simplement que la voie quasi unique d'élimination du CO chez l'homme est pulmonaire. La détoxification de l'organisme dépend de la vitesse de dissociation des complexes CO-Hb. En l'absence de modification de la FIO_2 , la dissociation de la carboxyhémoglobine suit une courbe exponentielle (dès que l'exposition au CO cesse), avec une demi-vie comprise entre 4 et 6 heures selon les auteurs.

Comme le problème est exclusivement celui d'une compétition entre O_2 et CO, il est évident que si l'on augmente énormément FIO_2 , donc PAO_2 et PaO_2 , le CO est éliminé plus rapidement.

Pour une $FIO_2 = 1,00$ (à la pression atmosphérique normale), la demi-vie du CO s'abaisse à 1,2 heures. Sous 2 ATA d'oxygène pur, il passe à 35 minutes et à 22 minutes sous 3 ATA.

L'OXYGÉNOTHÉRAPIE HYPERBARE EST DONC LA THERAPEUTIQUE FONDAMENTALE DE L'INTOXICATION OXYCARBONÉE.

En résumé :

L'oxyde de carbone est transporté dans le sang comme l'oxygène, sous formes dissoute et combinée.

La combinaison du CO avec l'hémoglobine est qualitativement identique à celle de l'oxygène mais quantitativement très différente, l'affinité du CO pour Hb étant 210 à 240 fois celle de l' O_2 . Ceci explique les conséquences désastreuses d'une concentration en CO faible dans l'air inspiré sur le transport de l'oxygène des sujets intoxiqués.

Cet effet pervers est aggravé par l'action directe du CO sur l' O_2 Hb résiduelle (augmentation de l'affinité d' O_2 pour Hb, donc difficulté accrue de relargage aux tissus) et par action toxique directe du CO sur certains systèmes enzymatiques.

En l'absence d'un minimum d'informations cliniques, le laboratoire ne possédant qu'un automate de gazométrie sanguine sans ou avec canal de mesure d'hémoglobine court le risque de ne pouvoir détecter cette pathologie et ses conséquences.

En l'absence d'un CO-Oxymètre, les autres techniques de détermination du CO sont suffisamment complexes et/ou fastidieuses pour que le laboratoire non spécialisé hésite (ou ne puisse) les mettre en œuvre.

Toutefois le CO-Oxymètre ne détecte que le CO combiné à l'hémoglobine. Le CO dissous et combiné à d'autres éléments est pour lui transparent.

IV.2- Méthémoglobine MetHb

Introduction

Dans les conditions normales, une très petite quantité d'hémoglobine (moins de 1 %) présente une légère modification chimique et devient de la méthémoglobine. Ceci a été clairement démontré à la fin du siècle dernier par HÜFNER et OTTO. On en trouve un peu plus chez le nouveau-né (moins de 1,5 %) et chez le prématuré (moins de 2 %).

Le mécanisme de sa formation est mal connu. L'ion ferreux de l'hémoglobine perd un électron et devient ferrique. L'hémoglobine est alors oxydée.

MetHb n'est plus capable de se combiner avec O_2 (ni CO). Il n'y a plus phénomène de compétition comme cela était le cas pour le CO et la méthémoglobine ne peut être transporteuse de gaz.

In vivo la quantité de MetHb quotidiennement formée est inférieure à 3 % de l'hémoglobine totale.

L'introduction dans l'organisme d'importantes quantités d'agents oxydants entraîne la transformation d'une plus grande quantité d'Hb en MetHb. Si les possibilités physiologiques de réduction sont dépassées, la concentration en Méthémoglobine excède 1 % et risque ensuite de perturber le transport de l'oxygène.

Réduction de la méthémoglobine

Le maintien d'un niveau de méthémoglobine au-dessous de 1 % est sous la responsabilité des systèmes réducteurs des hématies - en particulier le système NADH-réductase. Le cytochrome b5 permet la transformation de méthémoglobine (Fe⁺⁺⁺) en Fe⁺⁺. La présence de cette oxydase est déterminée elle-même par celle d'un gène sur le chromosome 22. L'absence de ce gène est responsable de la méthémoglobinémie congénitale.

Une seconde voie de réduction de la méthémoglobine est appelée « NADP-dépendante ». Elle est liée à la glycolyse aérobie, seule voie métabolique permettant la régénération du NADP. Pendant la glycolyse le NADP se transforme en NADPH qui transforme lui-même la méthémoglobine-réductase en diaphorase réduite.

La méthémoglobine-réductase cède un ion H⁺ à la méthémoglobine qui passe ainsi au stade déoxygéné (HHb).

La performance générale de cette voie est habituellement faible mais augmente significativement en présence de bleu de méthylène.

CECI EXPLIQUE L'IMPORTANCE DE CE MEDICAMENT DANS LE TRAITEMENT DE LA METHEMOGLOBINEMIE.

Aspects cliniques

En dehors de la méthémoglobinémie congénitale dont nous venons de parler, la plupart des méthémoglobinémies sont d'origine acquise et dues à la présence de quantités excessives de substances oxydantes.

• Dès 1920 STADIE et NICLOUX avaient listé la plupart des agents susceptibles de transformer oxy- et déoxy-Hb en MetHb. Il s'agit essentiellement de :

Substances minérales :	ferricyanures permanganates chlorates nitrites nitrates
Substances organiques :	composés aminés (aniline et dérivés) anesthésiques locaux (benzocaïne, prolicaïne)
Composés nitrés :	nitrobenzène dinitrobenzène nitrophénol, etc.
Autres substances organiques :	naphtalène polyphénols sulfones sulfamides primaquine bleu de méthylène (surdosage)

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

• Plusieurs types de bactéries comme le pneumocoque sont capables d'activer la formation de MetHb in vivo et in vitro.

• Il semble que les jeunes enfants (au-dessous de six mois) soient particulièrement sensibles à la méthémoglobinémie surtout lorsqu'ils absorbent de l'eau contenant des nitrates.

Comme on le voit, il existe malheureusement, une assez grande quantité de médicaments qui sont des agents oxydants et susceptibles donc d'entraîner une méthémoglobinémie. Citons le nitroprussiate, la nitroglycérine et plusieurs agents anesthésiques comme la benzocaïne, la lidocaïne, la procaïne et surtout la prilocaïne largement utilisée aux États-Unis en art dentaire.

• Dans une publication présentée en octobre 1993 au Congrès Annuel de la Société Américaine d'Anesthésiologie (ASA), BATES et coll. évoquent la méthémoglobinémie comme une complication de la thérapeutique d'inhalation d'oxyde nitrique (NO). On sait que l'oxyde nitrique est un puissant vasodilatateur dont l'inhalation pour le traitement sélectif de l'hypertension pulmonaire semble très prometteur. Mais sa réaction sur l'oxyhémoglobine entraîne la formation de nitrates et de méthémoglobine. Sur la première série de quatorze patients ainsi traités ces auteurs relèvent l'apparition de trois cas de méthémoglobinémie au-dessus de 5 % (soit 21 % des

malades). Il convient d'observer que selon eux, seul ce traitement a permis de sauver ces patients, mais ils suggèrent évidemment la surveillance du taux de MetHb dans de tels cas.

La méthémoglobinémie acquise est due à un effet compétitif. La capacité de réduction des hématies est importante, mais en présence d'un excès d'agents ou de médicaments oxydants, la cinétique d'oxydation dépasse la cinétique de réduction.

FAIVRE et coll. citent également certains facteurs facilitant la formation de méthémoglobine sans action chimique directe :

- l'alcool qui stimulerait l'oxydation d'Hb ou inhiberait la réduction de MetHb
- certaines circonstances digestives particulières (gastrites, ulcérations du tractus digestif, sujet gastrectomisé...)
- l'insuffisance hépatique
- la présence d'hémoglobine fœtale (prématuré/nouveau-né/ β -thalassémie). HbF est 1,5 à deux fois plus oxydable qu'HbA.

Pour être complet, il convient d'ajouter que la méthémoglobinémie peut être la conséquence d'une anomalie de la structure primaire de l'une des sous-unités d'hémoglobine. Le fer de son hème devient capable de s'oxyder rapidement. Deux sous-groupes sont à considérer à ce niveau : l'hémoglobine M et les hémoglobines instables. Tous les détails à ce propos figurent dans la publication très complète de MANSOURI et coll.

Physiopathologie

Le fer ferreux de l'hémoglobine passe à l'état ferrique et n'est plus capable de fixer l'oxygène. Comme pour le CO, deux phénomènes doivent être considérés :

- l'inactivation d'une certaine quantité d'hémoglobine qui n'est alors plus fonctionnelle (vis-à-vis de l'O₂).
- le déplacement vers la gauche de la courbe de dissociation de l'O₂Hb restante (diminution de la P50). Le relargage de l'oxygène au niveau tissulaire est diminué. Là encore une méthémoglobinémie de 10 % a des conséquences plus fâcheuses pour le transport de l'oxygène qu'une simple anémie de 10 %.

Selon l'importance de la méthémoglobinémie la somme des deux phénomènes entraîne une anoxémie. La cyanose apparaît dès que MetHb dépasse 1,5 %. Les autres signes cliniques tels que mal de tête, vertige, fatigabilité, tachycardie n'apparaissent pas avant un taux supérieur à 20 %.

Contrairement au CO, il semble que la méthémoglobine n'ait pas d'impact toxique direct.

En résumé :

- Le sang normal contient en permanence une petite quantité (moins de 1 %) d'hémoglobine oxydée appelée méthémoglobine.
- En clinique on parle de méthémoglobinémie à partir du moment où ce taux dépasse 1 % chez l'adulte et 2 % chez le prématuré.
- La méthémoglobine est incapable de se combiner avec l'oxygène, qu'elle ne peut donc fixer ni transporter.
- Dans la plupart des cas la méthémoglobinémie est transitoire et n'a pas de conséquences majeures. Par contre, une concentration en méthémoglobine élevée peut parfaitement entraîner la mort. Le diagnostic doit être rapidement confirmé et la thérapeutique mise en œuvre dès que possible.
- La présence d'un CO-Oxymètre dans le laboratoire est une garantie dans de telles circonstances.

« Mélanges »

Dans son intéressant éditorial de « Clinical Chemistry » (Août 93), ZWART donne un exemple tout à fait vraisemblable d'un problème de « mélange ». Selon lui : « Il n'est pas invraisemblable de penser qu'à ce jour une victime d'incendie dans un environnement contenant de nombreux matériaux synthétiques puisse présenter un empoisonnement aux cyanures combiné à un empoisonnement au CO. Le traitement approprié d'une telle victime est de réduire le risque de décès par les cyanures en lui administrant un médicament générateur de méthémoglobine. Toutefois, cet antidote peut s'avérer dangereux car la méthémoglobine ainsi formée perturbe le transport de l'oxygène. Comme ce patient souffre peut-être également d'une intoxication au CO, il convient d'être très prudent dans ce type de traitement. »

IV.3- Sulfhémoglobine SulfHb

C'est la dernière dyshémoglobine dont nous parlerons. Sa nature exacte n'est toujours pas parfaitement connue. On a longuement discuté pour savoir s'il s'agissait réellement d'une substance spécifique résultant de la combinaison de l'hémoglobine avec l'hydrogène sulfuré (H₂S) ou d'un mélange de « pigments verts ».

Il est possible de fabriquer de la sulfhémoglobine in vitro en incubant l'hémoglobine en présence d'un agent oxydant et d'une source d'ions sulfhydriques comme H₂S. On estime généralement que le pigment ainsi formé contient des sulfures liés aux pyrroles de l'anneau prophyrique de l'hémoglobine.

Contrairement à COHb et MetHb, la sulfhémoglobine est capable de combinaison réversible avec O₂, mais son affinité pour ce gaz est environ 1/100^e de celle de l'hémoglobine normale. Nous pouvons donc considérer que sa présence altère la capacité de transport de l'oxygène dans le sang.

La sulfhémoglobine est normalement absente du sang d'un sujet vivant. Elle peut représenter 1 à 10 % de l'hémoglobine totale après ingestion excessive de médicaments tels que la phénacétine ou la dapsone.

Une concentration en sulfhémoglobine supérieure à 1 % de l'hémoglobine totale doit être considérée comme pathologique.

■ V. AUTRES APPLICATIONS DE LA CO-OXYMÉTRIE

Dans une publication récente, MAHONEY et coll. envisagent l'intérêt potentiel de la CO-Oxymétrie dans la recherche de l'hémolyse chez l'adulte et le nouveau-né ainsi que dans certains diagnostics médico-légaux (intoxication professionnelle).

Ils estiment que les valeurs normales (< à 1,5 %) doivent pouvoir être clairement différenciées de concentrations plus élevées afin d'aider au diagnostic différentiel de l'anémie hémolytique chez l'adulte et le nouveau-né.

Afin d'évaluer les conséquences de l'exposition au CO sur les maladies cardiaques et la neurotoxicité, l'exactitude de la mesure de COHb dans la zone normale est d'après eux cruciale.

Ils donnent comme exemple la limite d'exposition au CO fixée par les Agences Américaines de Protection de l'Environnement. Elle correspond à une très faible augmentation de COHb (2 %) par rapport à la « ligne de base » (moins de 1,5 %). On estime que cette faible augmentation est capable d'entraîner des conséquences fâcheuses sur la santé de sujets souffrant de pathologies coronariennes.

Les fabricants doivent accepter le fait qu'à ce jour aucun des appareils actuellement disponibles sur le marché n'est suffisamment précis ou exact dans les valeurs basses (0 à 5 %) pour atteindre ce but. Ceci a été clairement démontré dans plusieurs publications, dont celle de MAHONEY qui a comparé les valeurs de COHb fournies par ces quatre appareils d'une part et par chromatographie en phase gazeuse d'autre part. Des résultats identiques ont été trouvés dans une étude non publiée de FABRE et coll. au Laboratoire de la Ville de Paris et qui a comparé les résultats des CO-Oxymètres avec ceux fournis par extraction chimique du CO et lecture terminale par analyse dans l'infrarouge.

Tous les fabricants donnent une inexactitude spectrophométrique de ± 1 % absolu sur toute la gamme de mesure, ce qui suffit amplement pour toutes les applications discutées jusqu'à présent. Mais il est évident ± 1 % autour de 2 % correspond à un CV de... 50 %.

Si nous désirons atteindre le niveau de performances suggéré par cet auteur, il convient d'améliorer de façon très importante exactitude et précision entre 0 et 5 %. Il est clair que la mesure à longueurs d'ondes multiples et le concept d'analyse multicomposants doivent aider à atteindre ce but. Il paraît sans espoir que des dispositifs spectrophotométriques ou photométriques de conception trop simple puissent y parvenir.

Note : Une bibliographie complète est disponible sur demande.

Imprimé en France
Impression EGOPRIM R.C.S. Paris B 334 570 470

Cahiers de formation déjà parus

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| N° 1 : <i>HÉMATOLOGIE</i> | N° 15 : <i>DÉPISTAGE</i> |
| N° 2 : <i>IMMUNOANALYSE</i> | <i>DE LA TRISOMIE 21</i> |
| N° 3 : <i>PARASITOLOGIE</i> | N° 16 : <i>IMMUNO-ALLERGIE (2)</i> |
| N° 4 : <i>BACTÉRIOLOGIE</i> | N° 17 : <i>VIRUS DES HÉPATITES</i> |
| N° 5 : <i>HORMONOLOGIE</i> | <i>A (VHA) et E (VHE)</i> |
| <i>GAZOMÉTRIE</i> | N° 18 : <i>DOSAGE DES MÉDICAMENTS</i> |
| N° 6 : <i>G.B.E.A.</i> | <i>TOME II</i> |
| N° 7 : <i>IMMUNO-ALLERGIE (1)</i> | N° 19 : <i>VAGINITES ET VAGINOSES</i> |
| N° 8 : <i>HÉMOGLOBINES GLYQUÉES</i> | N° 20 : <i>HÉMOSTASE ET THROMBOSE</i> |
| <i>LIPIDES</i> | N° 21 : <i>VIRUS DES HÉPATITES</i> |
| N° 9 : <i>DOSAGE DES MÉDICAMENTS</i> | <i>B (VHB), DELTA (VDH),</i> |
| <i>TOME I</i> | <i>C (VHC), AUTRES</i> |
| N° 10 : <i>HÉMATOLOGIE</i> | N° 22 : <i>SYNDROME</i> |
| <i>CAS ILLUSTRÉS</i> | <i>DES ANTI-PHOSPHOLIPIDES</i> |
| N° 11 : <i>AMIBES ET FLAGELLÉS</i> | N° 23 : <i>PARASITES SANGUINS</i> |
| <i>INTESTINAUX</i> | N° 24 : <i>BIOCHIMIE PEDIATRIQUE</i> |
| N° 12 : <i>LES MALADIES A PRIONS</i> | N° 25 : <i>LES MOISSISSURES</i> |
| N° 13 : <i>AUTOIMMUNITÉ</i> | <i>D'INTÉRÊT MÉDICAL</i> |
| <i>ET AUTOANTICORPS</i> | |
| N° 14 : <i>L'EXPLORATION</i> | |
| <i>DE LA THYROÏDE</i> | |

BIOFORMA est la structure nationale qui gère et organise la formation continue conventionnelle des directeurs et directeurs adjoints de L.a.b.m. privés.

Cette formation continue est financée par les trois Caisses Nationales de l'Assurance Maladie (C.N.A.M.T.S., C.C.M.S.A., et C.A.N.A.M.) dans le cadre de la convention passée entre elles et les trois syndicats de biologistes. (S.d.B., S.N.M.B., et S.L.B.C.).

A ce titre, BIOFORMA édite des cahiers de formation comme celui-ci.

Ces ouvrages sont distribués à chaque laboratoire d'analyse de biologie médicale, privés et hospitaliers, aux inspecteurs des DRASS, aux pharmaciens et médecins conseils des CRAM, aux responsables de la DGS et du Ministère de la Santé. Les précédents numéros, ou épuisés en version papier, seront disponibles à la consultation sur le site Internet www.bioforma.net à partir de 2002.

Ces livres ne sont pas en vente dans le commerce et le tirage est de 6 500 exemplaires.