

REVUE TUNISIENNE DE BIOLOGIE CLINIQUE

المجلة التونسية للبيولوجيا السريرية

ORGANE DE LA SOCIÉTÉ TUNISIENNE
DE BIOLOGIE CLINIQUE

Comité de Direction :

A. Hedhili
F. Ben Hassine
C. Mazigh
S. Hmida
A. Trabelsi

Comité de Rédaction :

Rédacteur en chef :
MC. Ben Rayana
Attachés à la rédaction :
S. Besbes
L. Slim Saidi
N. Ben Romdhane
A. Elkadhi
N. Nabli

Comité de lecture :

A. Amor, A. Ayadi, H. Babba,
R. Barbouch, F. Barguelli,
E. Belhassen, S. Ben Ammar,
M.A. Ben Amor, K. Ben Romdhane,
Y. Brahem, E. Chaker, W. Douki,
M. Elloumi, M. Feki, S. Feki,
C. Fendri, N. Fnina, I. Ghedira,
Y. Gorgi, N. Gritli, M. Hassine,
S. Hmida, M. Jeddi, N. Kaabachi,
M. Kortas, C. Mazigh, T. Messaoud,
R. Mrad, M.F. Najjar, B. Nsiri,
A. Slim, L. Slim, Z. Tabka,
A. Trabelsi

Consultants étrangers :

V. Blatton (Belgique),
L. Chabraoui (Maroc), J-L. Dhondt
(France), M. Ferrari (Italie),
J.C. Forrest (Canada), M. Germanos
(Liban), P. Gillery (France),
J. Hickes (USA), A. Legrand
(France), JF. Lesesve (France),
M. Muller (Autriche),
P. Mura (France)

Adresse : RTBC/STBC

B.P. N° 320 El Menzah 8
2037 Tunis - Tunisie

Tél. : 70 832 242 - Fax : 71 577 526

E-mail : contact@stbc.org.tn
chiheb.rayana@rns.tn

SOMMAIRE

	Pages
• Editorial	3
<i>N. Ghariani</i>	
• Revue générale	5
Les Thrombocytoses <i>A. Bouatay, S. Berriri, M. Kortas.</i>	
• Articles originaux	16
Evaluation des concentrations des nitrates dans les légumes frais <i>A. Nasraoui, M. Hamdaoui, A. Hedhili</i>	
Comparaison de deux procédures d'élimination du fibrinogène interférant sur l'électrophorèse des protéines sériques <i>N. Ben Rejeb, L. Bouassida, H. Falfoul, M.A. Negra, A. Omezzine, N. Nabli, A. Boussetta, A. Bouslama</i>	
Mutations précoces et cores du Virus de l'Hépatite B : Optimisation des techniques de détection moléculaire et analyse de l'impact sur l'évolution de l'infection chronique vers la cirrhose dans la région du Centre tunisien. <i>I. Fodha, M. Riani, S. Kacem, M. Ben Haj Fredj, S. Ketata, A. Letaief, S. Ajmi, N. Boujaafar, A. Trabelsi</i>	
Intérêt du double test dans le Dépistage prénatal de la trisomie 21 : expérience du centre tunisien <i>H. Chahed, S. Ferchichi, Y. Chaabouni, N. Saafi, H. Ben Limem, M. Sakouhi, M. Bernard, H. Khairi, S. Laradi, A. Miled.</i>	
• Pratique quotidienne	38
Les erreurs en biochimie clinique <i>F. Neffati, I. Hellara, W. Douki, A. Ben Amor, M.F. Najjar</i>	
• Activités de la Société et nouvelles professionnelles	47
• Synthèse de la journée legionella : De l'environnement à la clinique	48

WOCK®
Professional Footwear



HAUTE
TECHNICITE
CONFORT TOTAL
QUALITE
IRREPROCHABLE

Perspirant (ventilation latérale ainsi que le bas des semelles)
Micro-massage * Antidérapant * Antistatique
Absorption des chocs * Stimule la circulation sanguine * Lavable à 40° C * Lavable à 90° C * Autoclavable à 134° C * Unisexe * Semelles interchangeables * Pointures de 35-36 à 47-48 * 10 couleurs

Disponibles en 10 COULEURS chez «LE PRATICIEN»
et chez nos partenaires à Nabeul, Sousse, Monastir et Sfax
Centre Ikram - Menzah 7 - Tél 71 755 569 / 22 139 299


LE PRATICIEN
www.lepraticien.info

SYSTEME UNIQUE EN TUNISIE

A.F. GENITAL SYSTEM

pour la recherche, le comptage et l'antibiogramme
des Mycoplasmes et des germes pathogènes
urogénétaux (Strepto D, Gardnerella, Neisseria, Proteus...)

**Le tout sur la même plaque.
Résultat en 24 à 36h.**

Distribué exclusivement par



Tel : 71 755 598 / Fax : 71 755 938



Autres systèmes similaires :
COPRO SYSTEM et ENTEROSYSTEM 18R

N. GHARIANI

L'amélioration continue de la qualité est un des axes stratégiques d'intervention du programme de mise à niveau du secteur public de la santé, conformément aux dispositions du décret N° 2008 - 3325 du 21 octobre 2008.

L'engagement du Ministère de la Santé Publique est indéniable dans le soutien des laboratoires d'analyses de biologie médicale concernant l'amélioration de la qualité de leurs prestations, ainsi que le renforcement de l'accessibilité et de l'offre de ces prestations dans tout le pays et notamment dans les régions sanitaires prioritaires.

Plusieurs supports éducatifs, élaborés par des groupes d'experts biologistes hospitalo-universitaires ont été diffusés par l'Unité des Laboratoires de Biologie Médicale à l'ensemble des laboratoires d'analyses de biologie médicale des secteurs public et privé ; citons à titre d'exemple le manuel sur «le contrôle de qualité interne en biochimie clinique» distribué récemment.

Par ailleurs, l'évaluation externe de la qualité des analyses médicales est réalisée par le contrôle de qualité national, organisé par l'Unité des Laboratoires de Biologie Médicale une fois par an dans les disciplines suivantes : biochimie, hématologie, parasitologie et bactériologie et ce, conformément aux dispositions de l'arrêté du ministre de la santé publique du 22 janvier 2010.

Selon les exigences de la loi N°2002-54 du 11 juin 2002, relative aux laboratoires d'analyses médicales, notamment son article 17, le responsable du laboratoire doit se conformer aux règles de bonne pratique de laboratoire, qui sont fixées par arrêté du ministre de la santé publique du 12 mai 2011.

Dès la parution de l'arrêté sus-mentionné, le guide de bonne pratique de laboratoire (GBPL) a été diffusé à tous les laboratoires d'analyses de biologie médicale, ainsi qu'aux établissements d'enseignement supérieur (facultés de médecine et de pharmacie, écoles supérieures de santé de formation des techniciens supérieurs en biologie).

Directrice de l'Unité
des Laboratoires
de Biologie Médicale

L'objectif essentiel de ce guide, en se conformant à ses règles, est de garantir la fiabilité des résultats d'analyses dont le laboratoire a la charge.

En outre, la sécurité du personnel doit être assurée et les conditions environnementales doivent être respectées.

L'implication de tout le personnel du laboratoire, toutes qualifications confondues, est nécessaire à la mise en place d'un système qualité, qui doit être dynamique en vue de garantir l'amélioration continue de la qualité des prestations du laboratoire d'analyses médicales.

Les Thrombocytoses

A. BOUATAY,
S. BERRIRI,
M. KORTAS.

Résumé : La thrombocytose ou hyperplaquettose est définie par un nombre de plaquettes supérieur à $450 \times 10^9/l$. L'exploration de l'hyperplaquettose implique une démarche diagnostique en deux temps : la première consiste à éliminer les hyperplaquettoses secondaires, les hyperplaquettoses familiales et les hyperplaquettoses observées lors des syndromes myélodysplasiques. La seconde étape consiste à reconnaître dans un syndrome myéloprolifératif primitif, ce qui est spécifique à la thrombocytémie essentielle.

La fréquence des complications hémostatiques observées au cours des hyperplaquettoses dépend du caractère secondaire ou primitif de celles-ci. Les thrombocytoses primitives sont très associées à des complications vasculaires d'où l'intérêt de stratifier le risque vasculaire afin de guider l'attitude thérapeutique.

Mots clés : thrombocytose, syndromes myéloprolifératifs, thrombocytémie essentielle.

The Thrombocytosis

Summary : The thrombocytosis is defined as a number of platelets higher than $450 \times 10^9/l$. The exploration of thrombocytosis implies diagnosis reasoning in two phases : the first consists in eliminating the reactive causes, the familial thrombocytosis and the myelodysplastic syndromes. The second step consists in recognizing in a primitive myeloproliferative syndrome, what is specific to the essential thrombocythemia.

The primitive thrombocytosis are associated with haemostatic complications, hence the significance of stratifying the vascular risk in order to guide the therapeutic attitude.

Key Words : thrombocytosis, myeloproliferative syndrome, essential thrombocythemia.

Laboratoire d'hématologie
CHU Farhat Hached Sousse.

Introduction

La thrombocytose ou hyperplaquettose est définie par une augmentation du nombre des plaquettes au delà de $450 \times 10^9/l$, retrouvée lors de plusieurs examens successifs, le plus souvent de découverte fortuite à l'occasion d'un bilan sanguin réalisé de manière systématique ou devant un tableau clinique a priori sans relation avec une anomalie du chiffre de plaquettes. Les causes sont multiples : il s'agit le plus souvent de thrombocytoses

secondaires ou réactionnelles, transitoires et modérées, exceptionnellement de thrombocytoses primitives, chroniques dont les plus importantes sont celles reliées à un syndrome myéloprolifératif, particulièrement la thrombocytémie essentielle.

Numération et paramètres plaquettaires

La numération plaquettaire est effectuée sur sang prélevé

par ponction veineuse et recueilli dans un tube contenant un anticoagulant, l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA). Elle est réalisée par des analyseurs d'hématologie. La plupart des automates utilisent le principe Coulter avec une détection des cellules par variation d'impédance et dont le critère de comptage et de reconnaissance des plaquettes est la taille qui permet de les séparer des particules interférentes. Certains automates utilisent la détection optique des cellules ; la taille, la structure et la complexité cellulaire sont les critères de reconnaissance des plaquettes. Dans certaines situations pathologiques, des particules interférentes (schizocytes, microsphérocytes, microcytes, complexes immuns circulants, débris cellulaires) réalisent un mimétisme parfait, quant à leur volume, leur nombre et leur histogramme de distribution provoquant une surestimation du nombre des plaquettes (la pseudothrombocytose). Dans ce cas le recours à la méthode manuelle sur microscope optique est obligatoire tout en sachant que le coefficient de variation est de 25-30% [1]. Les automates d'hématologie, en plus du nombre de plaquettes, fournissent d'autres paramètres plaquettaires (le volume moyen plaquettaire : VMP, l'indice de distribution plaquettaire : IDP, le thrombocrite : THT) mais leur rôle dans le diagnostic des thrombocytoses demeure peu clair. L'IDP est le paramètre le plus utile dans le diagnostic différentiel des thrombocytoses puisqu'il permet d'apprécier l'hétérogénéité de la population plaquettaire. L'IDP est souvent élevé dans les thrombocytoses primitives ce qui reflète une anisocytose plaquettaire. Par contre dans les thrombocytoses réactionnelles, la population est plus homogène et par conséquent l'IDP est normal [2]. En effet, il a été rapporté que le VMP est normal dans les syndromes myéloprolifératifs (SMP) malgré la présence de macroplaquettes, cela est dû à une augmentation concomitante du nombre de petites plaquettes. Par contre, les thrombocytoses réactionnelles ont un VMP réduit [3].

Démarche diagnostique d'une hyperplaquettose

Après avoir éliminé une éventuelle pseudothrombocytose, l'exploration d'une hyperplaquettose implique une démarche diagnostique en deux temps (Figure 1) : la première consiste à éliminer les hyperplaquettooses secondaires, les hyperplaquettooses familiales et les hyperplaquettooses observées lors de certains syndromes myélodysplasiques (SMD). La seconde étape consiste à reconnaître dans un syndrome myéloprolifératif primitif (SMP), ce qui est spécifique à la thrombocytémie essentielle (TE). Selon les critères diagnostiques les plus récents, proposés par l'OMS (2008) et illustrés dans le Tableau I, tous les arguments positifs pouvant plaider en faveur de la prolifération clonale autonome doivent être exploités. Ces nouveaux critères ont vocation à remplacer ceux du Polycythemia Vera Study Group (PVSG), auquel on reproche d'être exclusivement des critères d'élimination basés, en dehors de l'hyperplaquettose elle-même et des données de biopsie médullaire qu'on ne savait pas parfaitement exploiter à l'époque, sur des critères essentiellement négatifs [4,5,6,7,8,9].

1. Reconnaître un SMP primitif

La première étape consiste à éliminer une hyperplaquettose secondaire. Les infections ou les maladies inflammatoires chroniques, les néoplasies sont facilement reconnues grâce au contexte clinique et à la recherche d'un syndrome inflammatoire biologique (vitesse de sédimentation, protéine C réactive). L'abaissement du taux de la ferritinémie permet d'identifier les hyperplaquettooses liées à une carence martiale. Les hyperplaquettooses liées à une asplénie où le frottis sanguin montre la présence de corps de Jolly, sont beaucoup moins fréquemment discutées. La deuxième étape consiste à éliminer un SMD ; l'étude minutieuse du frottis sanguin, qui montre souvent des anomalies quantitatives et qualitatives des 3 lignées, le myélogramme avec coloration de Perls pour la recherche de sidéroblastes en couronne, l'étude cytogénétique et moléculaire qui peut révéler des anomalies cytogénétiques (délétion du bras

court du chromosome 5), sont nécessaires pour identifier les SMD avec hyperplaquetoses [8,10].

2. Reconnaître une thrombocytémie essentielle

Cette étape consiste à reconnaître une TE au sein des hyperplaquetoses appartenant à un SMP.

- Ecarter une leucémie myéloïde chronique (LMC) : Les formes à début thrombocytémiques de LMC sont faciles à identifier par la recherche du chromosome Philadelphie [t(9 ; 22) (q34 ; q11)] par analyse cytogénétique ou la mise en évidence du transcrite de fusion BCR/ABL par biologie moléculaire.
- Ecarter une Polyglobulie de Vaquez (PV) : le diagnostic repose désormais sur l'association de deux critères majeurs (1. Hémoglobine > 18.5 g/dl chez l'homme et 16.5 g/dl chez la femme ou toute autre preuve de l'augmentation de la masse globulaire érythrocytaire, 2. Présence de JAK2 V617F ou d'autres mutations similaires de JAK2) et d'un critère mineur (1. Biopsie médullaire montrant une hyperplasie cellulaire portant sur les lignées érythrocytaire, granulocytaire, mégacaryocytaire, 2. Taux d'érythropoïétine sérique au dessous des valeurs normales de références, 3. Pousse spontanée des progéniteurs érythrocytaires in vitro) [7,9].
- Ecarter la myélofibrose primitive : les nouveaux critères de l'OMS 2008 exigent 3 critères majeurs (1. Présence d'une prolifération mégacaryocytaire accompagnée par la présence de fibrose réticulinique ou collagène ou en l'absence de fibrose réticulinique significative, les anomalies morphologiques mégacaryocytaires doivent être accompagnées par une augmentation de la cellularité médullaire caractérisée par une prolifération granuleuse et souvent une érythropoïèse diminuée, 2. Absence des critères retenus par l'OMS en faveur du diagnostic de : PV, LMC, SMD ou d'une autre maladie maligne de la lignée myéloïde, 3. Présence de la mutation JAK2V617F ou d'un autre marqueur de clonalité) et 2 critères mineurs (1. Leuco-érythroblastose sanguine, 2. Augmentation des taux sériques de lactate déshydrogénase (LDH), 3. Anémie, 4. Splénomégalie palpable) [7,9].
- Le diagnostic exige la présence des quatre critères suivants, selon la définition de l'OMS, pour reconnaître

une TE :

1. Augmentation persistante du nombre de plaquettes $\geq 450 \times 10^9/L$
2. Prolifération, en biopsie médullaire, prédominant sur la lignée mégacaryocytaire et faite d'une majorité d'éléments mûrs et de grande taille. Pas d'augmentation significative de la granulopoïèse neutrophile ni de l'érythropoïèse et pas d'excès d'éléments immatures dans ces deux lignées
3. Absence des critères retenus par l'OMS en faveur du diagnostic de PV, MP, LMC, SMD ou d'une autre maladie maligne de la lignée myéloïde
4. Présence de la mutation JAK2 V617F ou d'un autre marqueur de clonalité. [7,9]

Etiologies des thrombocytoses

Les étiologies des hyperplaquetoses sont diverses ; il s'agit le plus souvent de thrombocytoses secondaires et exceptionnellement de thrombocytoses primitives. De rares cas de thrombocytoses familiales ont été décrits.

1. Thrombocytoses secondaires

Les thrombocytoses secondaires réactionnelles sont de loin les plus fréquentes. Les causes sont multiples ; l'interrogatoire et l'examen clinique conduisent à la réalisation d'un bilan sanguin permettant d'orienter le diagnostic dans la plupart des cas.

1.1 Hyperplaquetose d'entraînement

Ces hyperplaquetoses sont modérées et transitoires. Il s'agit de thrombocytoses de rebond survenant à la suite du traitement d'une thrombopénie périphérique ou d'une régénération médullaire d'aplasie chimio-induite. Les anémies hémolytiques et les hémorragies aiguës importantes peuvent provoquer une augmentation transitoire du nombre de plaquettes [11,12].

1.2 Carence martiale

Les carences martiales s'accompagnent d'une thrombocytose modérée ($600-800 \times 10^9/l$). L'hémogramme montre une anémie microcytaire hypochrome associée à une hyperplaquetose. Toutefois, l'épuisement des réserves de fer, reconnu grâce à la diminution du taux de

ferritinémie, permet d'identifier les hyperplaquetoses secondaires à une carence martiale [11,13,14].

1.3 Syndromes inflammatoires

Les syndromes inflammatoires infectieux (bactérien, viral ou parasitaire) ou non infectieux (maladies inflammatoires comme la polyarthrite chronique, les connectives, la rectocolite hémorragique, le purpura rhumatoïde...) représentent respectivement environ 31% et 9% des cas de thrombocytoses [15]. Ces états sont en général facilement reconnus grâce au contexte clinique évocateur et à la recherche d'un syndrome inflammatoire biologique.

1.4 Splénectomie et asplénie

L'hyperplaquetose est constante dans les suites d'une splénectomie, quelle que soit l'étiologie, le nombre de plaquette tend à augmenter pouvant atteindre 1 million/mm³. Le syndrome d'asplénie, constitutionnel ou acquis (thromboses répétées intra spléniques des drépanocytoses homozygotes) peut s'accompagner d'une thrombocytose permanente souvent élevée [12,13].

1.5 Autres étiologies

La plupart des tumeurs ainsi que certains médicaments tels que les dérivés de pervenche, les corticoïdes, les sympathomimétiques, l'acide rétinoïde et certains facteurs de croissance sont susceptibles de provoquer une hyperplaquetose [13].

2. Thrombocytoses familiales

De rares cas de thrombocytoses familiales ont été décrits. Il s'agit d'une entité à part de thrombocytose primitive liée soit à une anomalie du gène de c-Mpl soit à une anomalie du gène de TPO, soit de cause inconnue. Il s'agit d'un désordre génétique très hétérogène. La transmission peut être autosomale dominante, autosomale récessive ou liée au chromosome X [16,17,18].

3. Thrombocytoses primitives

3.1 Thrombocytoses des syndromes myélodysplasiques

Sous le terme SMD est regroupé un ensemble de désordres clonaux touchant les cellules souches hématopoïétiques myéloïdes. Les SMD qui associent générale-

ment une moelle hyperplasique, cytopénies périphériques, dysplasies des trois lignées hématopoïétiques, sont répartis en plusieurs entités reconnues par la classification OMS. Les syndromes myélodysplasiques pouvant se révéler par une hyperplaquetose sont essentiellement le syndrome 5q- et l'anémie réfractaire sidérolastique avec thrombocytose majeure [19,20,21].

3.2 Thrombocytoses des syndromes myéloprolifératifs

Le syndrome myéloprolifératif se définit par une prolifération maligne des trois lignées sanguines avec prédominance plus ou moins marquée de l'une d'entre elles. Cette prolifération peut aller jusqu'à étouffer les autres lignées. La thrombocytose n'apparaît pas exclusivement dans la TE, elle est également présente dans les autres SMP.

3.2.1 Leucémie myéloïde chronique

La LMC est un syndrome myéloprolifératif caractérisée par un échange de matériel génétique : la translocation t(9 ;22), qui entraîne la formation d'un chromosome 22 anormal, dénommé chromosome Philadelphie (Ph). Cette translocation conduit à la formation du gène de fusion BCR-ABL. La protéine Bcr-Abl, par son activité Tyrosine Kinase dérégulée, est responsable de la maladie. La recherche du chromosome Philadelphie par analyse cytogénétique ou la mise en évidence du transcrite de fusion BCR-ABL par biologie moléculaire, permettent d'identifier les formes à début thrombocytémique de la LMC [8,11]. Une fois cette première distinction effectuée, il reste à tenter de reconnaître ce qui est spécifique à chacun des SMP Philadelphie négatifs.

3.2.2 SMP Philadelphie négatifs

La thrombocytémie essentielle, la polyglobulie de Vaquez et la myélofibrose primitive sont regroupés sous la dénomination de SMP Philadelphie négatifs.

En 2005, une mutation ponctuelle acquise intéressant le gène codant pour la protéine Janus Kinase sur le chromosome 9 a été découverte; la mutation se traduit par la substitution d'une valine en phénylalanine en position 617. La description de cette mutation JAK2 V617F a constitué un nouveau critère de diagnostic à prendre en compte, d'autant plus que cette mutation s'est avérée présente non seulement chez plus de 90% des PV mais

aussi chez près de 50% des TE et des MP [8,22]

3.2.2.1 Polyglobulie de Vaquez

Il s'agit d'une maladie clonale de la cellule souche hématopoïétique multipotente. L'expression hématologique de la maladie prédomine sur la lignée érythrocytaire ; les progéniteurs érythrocytaires sont capables de prolifération spontanée du fait de leur sensibilité anormale à des traces d'érythropoïétine. La description de la mutation JAK2 chez plus de 90% des PV et chez près de 50% de TE constitue un argument de poids en faveur d'une prolifération clonale autonome et fournit un nouvel argument positif au diagnostic de SMP primitif mais ne saurait être considéré comme spécifique de la TE. [8,11,22,23].

3.2.2.2 Myélofibrose primitive

La MP est le plus dangereux des syndromes myéloprolifératifs chroniques, caractérisée par l'association d'une myéloprolifération et d'une myélofibrose. La myéloprolifération résulte de l'expansion clonale de progéniteurs hématopoïétiques pathologiques alors que les fibroblastes sont polyclonaux, suggérant que la myélofibrose résulte d'un processus réactionnel. La thrombocytose, fréquente surtout au début de la maladie, est généralement modérée mais peut atteindre 1000 à $2000 \times 10^9 / l$ [24].

Thrombocytémie essentielle

La TE est la plus fréquente des SMP Philadelphie négatifs. La découverte en 2005 de la mutation de JAK2 est une avancée majeure qui ouvre des perspectives nouvelles pour le diagnostic positif et pour la thérapeutique.

1. Epidémiologie

La thrombocytémie essentielle est un SMP rare (l'incidence varie entre 0.1 et 2.4 cas pour 105 personnes par an) de prédominance féminine. L'âge médian est de 72 ans chez les femmes, contre 67 ans chez les hommes. La fréquence de la maladie est très faible chez l'enfant [10, 25].

2. Physiopathologie

La thrombocytémie essentielle est un SMP caractérisé

par une augmentation du nombre des plaquettes (généralement $> 600 \times 10^9 / l$) liée à une surproduction des mégacaryocytes. Une anomalie de la régulation de la prolifération mégacaryocytaire par la thrombopoïétine (TPO), qui est la principale hormone dans la régulation de la différenciation et la maturation plaquettaire, et son récepteur c-Mpl, est responsable de la maladie.

L'augmentation de la TPO libre plasmatique avec une hypersensibilité des mégacaryocytes à celle-ci induisent la surproduction plaquettaire [26,27]. La découverte de la mutation V617F dans le gène codant pour la tyrosine kinase Janus Kinase 2 (JAK2 V617F), tyrosine kinase cytoplasmique qui intervient dans le signal issu des récepteurs de cytokines a bouleversé la démarche diagnostique des SMP. Cette mutation, située dans le domaine d'auto-inhibition JH2 de JAK2 qui régule négativement l'activité kinase de la protéine, entraîne une hyperactivation de la kinase responsable d'une prolifération cellulaire incontrôlée [8].

3. Clinique

Elle est généralement asymptomatique et elle est découverte d'une manière fortuite à l'occasion d'un hémogramme. Les symptômes les plus fréquemment retrouvés sont les céphalées. Par ailleurs les signes cliniques sont dominés par les hémorragies et les thromboses qui sont cliniquement sévères dans environ 1/3 des cas. Une splénomégalie modérée est présente dans 50 à 80% des cas, une hépatomégalie est rarement observée [5,10].

4. Diagnostic biologique

L'hémogramme montre une hyperplaquettose généralement supérieure à $600 \times 10^9 / l$, persistante pendant plusieurs semaines. Une thrombocytose majeure dépassant $1500 \times 10^9 / l$ est habituelle, elle survient dans environ la moitié des cas et peut même atteindre $5000 \times 10^9 / l$. La morphologie des plaquettes est anormale, des plaquettes géantes avec raréfaction des granulations, des fragments de mégacaryocytes sont parfois retrouvés sur le frottis. Une anisocytose plaquettaire est souvent observée. La biopsie ostéomédullaire montre une prolifération prédominant sur la lignée mégacaryo-

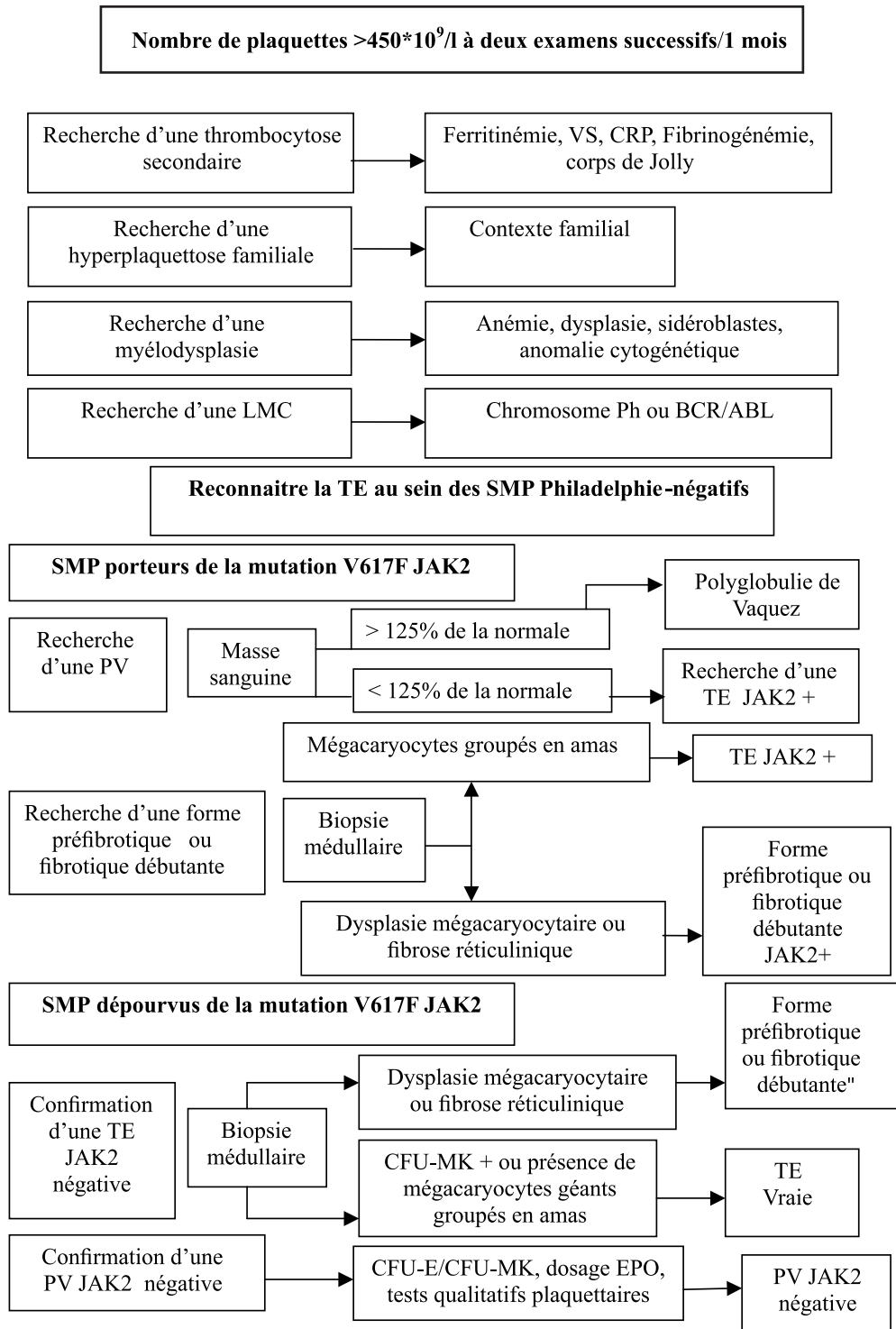


Figure 1 : Exploration d'une hyperplaquettose [4]

cytaire avec augmentation du nombre d'éléments matures et de grande taille groupés en amas [4,6,10].

5. Complications hémostatiques

Il est important de rechercher chez les patients atteints de TE les complications qui sont la conséquence du risque vasculaire : thromboses artérielles ou veineuses, accidents ischémiques mineurs par occlusion réversible de la microcirculation et les complications hémorragiques.

5.1. Accidents thrombotiques

Les thromboses artérielles (accidents vasculaires cérébraux, infarctus du myocarde, angine de poitrine, occlusions de l'artère rétinienne ou thromboses artérielles périphériques) ou veineuses (thromboses veineuses profondes, embolies pulmonaires et thromboses portales) révèlent la maladie dans 8 à 84% des cas [10]. L'étude de Cortelazzo et al. [28] a permis une stratification du risque de thrombose globalement confirmée par les travaux ultérieurs. L'âge augmente le risque de thrombose qui progresse de 1.7% avant 40 ans à 15.1% patient / année après 60 ans [10]. Le rôle de la mutation de JAK2

sur le risque thrombotique est controversé. Des études récentes viennent de mettre en évidence un effet positif de la mutation JAK2 sur l'état d'activation des plaquettes ou des leucocytes [29]. La survenue de thrombose chez des patients atteints de TE vient d'être associée à la clonalité de la maladie. En effet l'incidence d'accidents thrombotiques est quatre fois plus importante dans le groupe de TE monoclonale (60%) que celui de TE polyclonale (15%) [10,31]. Le rôle du nombre de plaquettes sur le risque thrombotique reste aussi controversé. Certaines observations ont conduit à évoquer un nombre élevé de plaquettes dans la pathogénie de la thrombose. D'autres ont montré que les patients thrombocytémiques ayant un nombre de plaquette inférieur à $600 \times 10^9/l$ peuvent développer des manifestations thrombotiques [32].

5.2. Complications hémorragiques

Les manifestations hémorragiques de la TE sont le plus souvent des incidents mineurs : hémorragies cutanéo-muqueuses récidivantes. Les hémorragies sévères (gastro-intestinales, hématomes, hémarthroses, hémorragies après extraction dentaire) sont moins fréquentes.

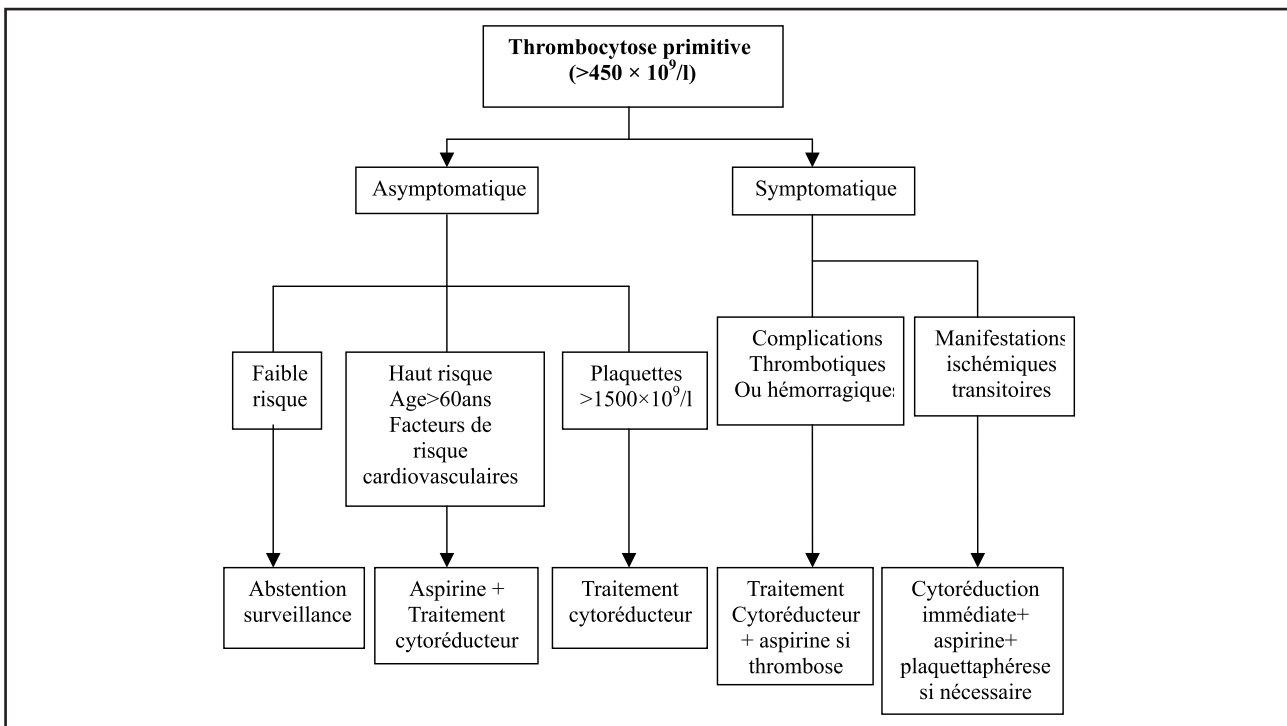


Figure 2 : Arbre décisionnel : Prise en charge d'une thrombocytose [38].

Quelques cas d'hémorragies cérébro-méningées ont été signalés. Le risque hémorragique est donc corrélé à l'augmentation du nombre de plaquettes au-dessus de 1000 voire 1500×10⁹/L. Cette anomalie se corrige après réduction du nombre des plaquettes [32].

5.3. Manifestations ischémiques

Les accidents thrombotiques mineurs par occlusion réversible de la microcirculation sont à l'origine de manifestations atypiques transitoires à expression neurologique, oculaire ou coronarienne ou touchant les extrémités des membres de façon souvent moins évocatrice que les érythromélagies [32]. Celles-ci sont dues à une activation des plaquettes, apparaissant parfois dès que leur nombre dépasse 400 x 10⁹/L, et finissent par aboutir à la formation de thrombi plaquettaires dans la microcirculation déterminant la zone douloureuse [10].

6. Traitement de la TE

La prise en charge d'une TE dépend de la stratification du risque vasculaire de cette thrombocytémie (Figure 2).

6.1. Traitements antiagrégants plaquettaires

L'objectif thérapeutique est la prévention des complications vasculaires : manifestations vasomotrices ou ischémiques transitoires; complications thromboemboliques ou plus rarement hémorragiques qui font toute la gravité de la maladie. La justification du recours à un traitement antiagrégant a été établie à la fois sur des bases théoriques (existence d'une hyperactivité plaquettaire jouant un rôle direct dans les manifestations vasomotrices et ischémiques transitoires) et pratiques (effet clinique spectaculaire de l'aspirine à faible dose sur ces manifestations). L'action de l'aspirine consiste à inhiber de manière irréversible la cyclo-oxygénase plaquettaire, la synthèse du thromboxane A₂ et l'activation plaquettaire. Son effet s'exerce à partir de doses faibles, de 40 à 100 mg par jour. À ces doses, le risque hémorragique, bien qu'il soit habituellement considéré comme plus fréquent chez un patient thrombocytémique qu'en l'absence de SMP, est jugé insignifiant. Il peut devenir significatif en cas de cumul des risques liés au traitement antiagrégant et à un nombre très élevé de plaquettes, en pratique au-dessus de 1000 à 1500 x 10⁹/l. Les indica-

tions indiscutables de l'aspirine sont les manifestations microvasculaires et ischémiques transitoires [10]. La ticlopidine est un antiagrégant plaquettaire par inhibition de la liaison ADP dépendante du fibrinogène à la membrane plaquettaire. Son efficacité semble analogue à celle de l'aspirine, au moins comme traitement de fond. On manque en revanche de données sur l'intérêt des antiagrégants plus récents tels que le clopidogrel, pourtant communément utilisé, ou sur l'abciximab [10].

6.2. Traitements cytoréducteurs

L'indication d'une réduction du nombre des plaquettes est actuellement admise dans toutes les TE à risque élevé, du fait de l'âge supérieur à 60 ans ou d'un antécédent thrombotique. L'objectif recommandé actuellement est le retour à un nombre de plaquettes normal. Avant l'âge de 60 ans, il est suggéré d'avoir recours aux seuls médicaments cytoréducteurs réputés dépourvus d'effet leucémogène (interféron alpha et anagrélide). Si l'efficacité de ces deux agents pour faire baisser le nombre des plaquettes est démontré, il n'en va pas de même pour la réduction du risque thrombotique, leur innocuité ni leur tolérance à long terme [8,33].

6.2.1. Hydroxyurée

L'hydroxyurée est le traitement de référence. Son efficacité pour la réduction prolongée du nombre de plaquettes, l'excellente tolérance, ainsi que la faible toxicité hématologique du produit à court terme, sont maintenant solidement établies. C'est le seul médicament pour lequel la diminution de l'incidence des thromboses a été démontrée, chez les TE à risque, par comparaison à des patients non traités [34,35].

6.2.2. Pipobroman

L'efficacité du pipobroman pour la réduction prolongée du taux de plaquettes, la bonne tolérance et la toxicité hématologique limitée du produit, à court terme, sont également bien établies. L'efficacité de la réduction plaquettaire sur la fréquence des manifestations thrombotiques chez les thrombocytémies à haut risque n'est connue qu'au travers d'études de cohortes. Elles ne permettent pas d'affirmer qu'il y a un effet favorable sur le risque de thrombose [10,34].

6.2.3. Busulfan

Malgré le risque aplasiant de cet agent alkylant, certains

Tableau I : Thrombocytémie essentielle : Critères diagnostiques de l'Organisation Mondiale De La Santé [7,9,10].

Critères proposés par l'OMS en 2001 pour le diagnostic de thrombocytémie essentielle	Critères révisés proposés par l'OMS pour le diagnostic de thrombocytémie essentielle en 2008
<p>Critères positifs</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nombre de plaquettes supérieur à $600 \times 10^9/l$ - Histologie médullaire montrant une prolifération prédominant sur la lignée mégacaryocytaire, avec augmentation du nombre d'éléments matures et de grande taille. <p>Critères d'exclusion</p> <p>1. Absence de polyglobulie primitive</p> <ul style="list-style-type: none"> - Masse globulaire normale ou taux d'hémoglobine < 18,5 g/dl chez l'homme, < 16,5 g/dl chez la femme. - Présence de fer médullaire à la coloration de Perls, ferritine normale, volume globulaire moyen normal. - Si la condition précédente n'est pas remplie, s'assurer qu'un traitement martial n'augmente pas la masse globulaire ou le taux d'hémoglobine à des valeurs de polyglobulie. <p>2. Absence de LMC</p> <ul style="list-style-type: none"> - Absence de chromosome Philadelphie et du transcrite de fusion BCR/ABL. <p>3. Absence de MP</p> <ul style="list-style-type: none"> - Absence de fibrose collagène. - Fibrose réticulinique absente ou minime. <p>4. Absence de SMD</p> <ul style="list-style-type: none"> - Absence de délétion du bras long du chromosome 5 del (5q), de translocation t(3;3) (q21;q26), d'inversion du chromosome 3 inv (3) (q21q26). - Absence de dysplasie granuleuse significative, micromégacaryocytes absents ou très rares. <p>5. Absence d'argument pour une thrombocytose réactionnelle</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pas d'inflammation ou d'infection sous-jacente. - Absence de néoplasie sous-jacente. - Pas de splénectomie préalable. 	<p>Le diagnostic exige la présence des quatre critères suivants :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Augmentation persistante du nombre de plaquettes $\geq 450 \times 10^9/L^a$ 2. Prolifération, en biopsie médullaire, prédominant sur la lignée mégacaryocytaire et faite d'une majorité d'éléments mûrs et de grande taille. Pas d'augmentation significative de la granulopoïèse neutrophile ni de l'érythropoïèse et pas d'excès d'éléments immatures dans ces deux lignées. 3. Absence des critères retenus par l'OMS en faveur du diagnostic de PV, MP, LMC, SMD ou d'une autre maladie maligne de la lignée myéloïde. 4. Démonstration de la mutation JAK2 V617F ou d'un autre marqueur de clonalité ou en l'absence de marqueur de clonalité : absence d'argument en faveur d'une thrombocytose réactionnelle.

lui restent fidèles pour le traitement des individus très âgés en raison de la possibilité de contrôler les plaquettes grâce à des cures courtes et très. [10,34].

6.2.4. Interféron alpha

L'interféron alpha est une cytokine obtenue par génie génétique a une triple action : action antivirale, action immunomodulatrice et action immunoproliférative. L'efficacité de l'interféron alpha administré par voie sous cutanée pour la réduction du taux de plaquettes de patients thrombocytemiques est démontrée par de nombreuses études de cohortes [36]. La disparition des manifestations cliniques avec la normalisation du nombre des plaquettes est habituelle, mais sans données précises sur l'effet antithrombotique chez les patients à haut risque. La seule indication consacrée par l'usage est la TE chez la femme enceinte [10,36]

6.2.5. Anagrélide.

L'anagrélide est la forme orale d'un composé imidazoquinazoline, initialement proposé comme antiagrégant plaquettaire à dose élevée. Il exerce son effet cytoréducteur exclusivement ou presque sur les plaquettes par un blocage de la différenciation plus que de la prolifération mégacaryocytaire. L'efficacité de l'anagrélide pour la réduction du taux de plaquettes est largement démontrée. Le taux de réponse, complète ou partielle, est de 94% et peut être très précoce [37].

Conclusion

Les thrombocytoses primitives ou clonales sont beaucoup plus rares que les thrombocytoses réactionnelles, elles regroupent des maladies très hétérogènes et dont la thérapeutique dépend en grande partie des mécanismes moléculaires qui en sont responsables.

La thrombocytémie essentielle est un SMP dont le diagnostic repose sur l'élimination de toutes les autres étiologies des hyperplaquetoses. La conduite thérapeutique est à adapter au cas par cas, selon une stratification du risque vasculaire, permettant ainsi une meilleure prise en charge des patients thrombocytemiques.

Références

1. Trzeciak MC, Bordet J. Exploration de l'hémostase primaire. *Encycl Méd Chir ; Hématologie* 2002 ; 13-019-A-10 ; 5p.
2. Osselear JC, Jamart J, Scheiff JM. Platelet distribution width for differential diagnosis of thrombocytosis. *Clinical Chemistry* 1997 ; 43 (6) ; 1072-6.
3. Jackson SR, Carter JM. Platelet Volume: laboratory measurement and clinical application. *Haemostasis and thrombosis. Blood Rev* 1993 ; 7: 104-113.
4. Brière J, Bellucci S, Abgrall J et al. Thrombocytémie essentielle: nouvelles perspectives diagnostiques et thérapeutiques. *Hématologie* 2006 ; 12 (5) : 315-329.
5. Brière J. Thrombocytémie essentielle. *Hématologie* 2001 ; 7 (3) : 221-230.
6. Michiels J, Bernema Z, Van Bockstaele D et al. Critères diagnostiques actuels des syndromes myéloprolifératifs (SMP), thrombocytémie essentielle (TE), polyglobulie de Vaquez (PV) et myélofibrose idiopathique (MFI). *Patho Bio* 2007 ; 55 : 92-104.
7. Brière J. Révision des critères diagnostiques de l'OMS pour les PV, TE et MPF. *Hématologie* 2008 ; 14 ; 3 ; 208-15. [8] Viallard JF. Conduite à tenir devant une thrombocytose. *La Revue de Médecine Interne* 2010. In Press.
9. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia : rationale and important changes. *Blood* 2010 ; 114 ; 5 ; 937-951.
10. Brière J. Thrombocytémie essentielle. Critères du diagnostic ; Stratification pronostique ; Ebauche de stratégie thérapeutique. *Encycl Méd Chir, Hématologie* 2006 ; 13-020-B05.
11. Chomel JC, Sorel N, M-Rousse C, Turhan AG. Les syndromes myéloprolifératifs. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 2009 ; 24 : 69-85.
12. Delisle V, Sultan-Alfonsi AM, Souchet JL et al. Les thrombocytoses réactionnelles et le risque thrombotique. *Ann Biol Clin* 2000 ; 58 (4) : 508-511.
13. Mialou V, Kagialis- Girard S, Galambrun C et al. Thrombocytoses et thrombocytémies essentielles de l'enfant. *Archives de pédiatries* 2005 ; 12 ; 8 : 1249-1250.

14. Dan K .Thrombocytosis in iron deficiency anemia. *Inter Med* 2005 ; 44 : 1025-1026.
15. Griesshammer M, Bangerter M, Sauer T et al. Etiology and clinical significance of thrombocytosis: analysis of 732 patients with an elevated platelet count. *J Med Int* 1999 ; 245 : 295-300.
16. Dommergues JP, Meunier BB, Drouglazet V et al. Hyperplaquetoses de l'enfant : abords pratiques. *J Ped Pericult* 1993 ; 6 ; 8 : 451-454.
17. Fernandez-Robles E, Vermeylen C, Martiat Pet al. Familial essential thrombocythemia. *Pediatr Hematol Oncol* 1999 ; 7 : 373-376.
18. Stuhmann M, Bashawri L, Ahmed M et al. Familial thrombocytoses as a recessive, possibly X-linked trait in an Arab family. *Br J Haematol* 2001; 112 (3) : 616-620.
19. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organisation (WHO) classification of the myeloid neoplasm. *Blood* 2002 ; 100 (7) : 2292-2302.
20. Santana-Davila R, Holtan SG, GW Dewald et al. Chromosome 5q deletion : specific diagnostic and cytogenetic details among 358 consecutive cases from a single institution. *Leukemia Research* 2008 ; 32 : 407-411.
21. Gérard J, Dubois Galopin F, Gardembas-Pain M et al. Thrombocytémie majeure et anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne. Une entité provisoire dans la classification OMS des hémopathies. *Ann Biol Clin* 2005 ; 63 (6) : 653-659.
22. Marie I, Hervé F. Mutation de la protéine Kinase JAK2 au cours de la polyglobulie de Vaguez : nouvelles perspectives thérapeutiques et diagnostiques. *Rev Méd Inter* 2006 ; 27 (10) : 473-477.
23. Brière J, Peynaud-Demory E, Guilmin F et al. Polyglobulies primitives. *Encycl Méd Chir Hématologie* 1998 ; 13-006-L-10 ; 17p.
24. Caroline M, Kerdilès L, Praloran V et al. La splénomégalie myéloïde : de données récentes à un modèle physiopathologique. *Hématologie* 2002 ; 8 (3) : 187-196.
25. Kutti J, Bridell N. Epidemiology of the myeloproliferative disorders: Essential thrombocythemia, polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Patho Bio* 2001 ; 49 : 164-166.
26. Wang JC, Chen C et al. Blood thrombopoietine levels in clonal and reactive thrombocytoses. *Am J Med* 1998 ; 104 (5) : 451-455.
27. Teofili L, Pierconti F, Di Febo A. The expression pattern of c-Mpl in megacaryocytes correlated with thrombotic risk in essential thrombocythemia. *Blood* 2002 ; 100 : 714-717.
28. Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G et al. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocytémie. *J Clin Oncol* 1990 ; 8 : 556-562.
29. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A et al. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Experimental Hematology* 2007 ; 35 (9) : 1476.e1-1476.e11.
30. Bellucci S. Complications thrombotiques des thrombocytoses/thrombocytémies. *Sang Thrombose Vaisseaux* 2002 ; 14 (8) : 477-483.
31. André-Kerneis E, Gaussem P. Pathologies de l'hémostase liées aux plaquettes au cours de la thrombocytémie essentielle. *Ann Biol Clin* 2004 ; 62 (3) : 279-290.
32. Michiels JJ. Platelet mediated microvascular inflammation and thrombosis in thrombocythemia vera: a distinct aspirin-reponsive arterial thrombophilia. *Patho Bio* 2003 ; 51 (3) :167-175.
33. Barbui T, Finazzo G. When and how treat essential thrombocythemia. *New Reviews* 2005 ;19 (5) : 243-252.
34. Costello R, O'Callaghan T, Sébahoun G. Traitement de la thrombocytémie essentielle. *Rev Méd Intr* 2005 ; 26 (12) : 947-955.
35. Barbui T, Fitnazzi G. Efficacy and sefty of hydroxyurea in patients with essential thrombocythemia. *Patho Bio* 2001 ; 49 (2) : 481-488.
36. Lacotte-Thierry L, Guilhot F. Interféron et hématologie. *Rev Méd Intr* 2002 ; 23 (4) : 481-488.
37. Fruchtmann SM, Pettitt RM, Gilbert HS et al. Anagrelide: analysis of long-term efficacy, safety and leukemogenic potential in myeloproliferative disorders. *Leukemia Research* 2002 ; 29 (5) : 481-491.
38. Andrew I, Schafer MD. Thrombocytosis. *New Engl J Med* 2004 ; 350 (12) : 1211-1219.

Evaluation des concentrations des nitrates dans les légumes frais

A. NASRAOUI¹
M. HAMDAOUI¹
A. HEDHILI²

Résumé : Nous avons déterminé le taux des nitrates dans plusieurs variétés de Légumes cultivées dans les zones agricoles de la région de Tunis. Nos résultats ont mis en évidence des taux élevés dans les légumes à fleur tels que le chou-fleur, l'artichaut (870-954 mg/kg), dans les racines et tubercules comme le radis, la carotte et le navet (800-1500 mg /kg). Les quantités les plus importantes ont été déterminées dans les feuilles : épinard, blette, persil (1870- 2032 mg/kg). Ces valeurs sont élevées surtout en tenant compte de la consommation importante de certains de ces légumes par le tunisien. Une action de sensibilisation doit être menée afin de diminuer l'utilisation en agriculture des fertilisants chimiques et naturels, source importante de nitrates dans les légumes.

Mots clés : nitrates, légumes frais, fertilisants

Evaluation of nitrate concentration in fresh vegetables

Abstract : We have determinate the nitrate levels in different varieties of vegetables cultivated in Tunis agricultural area. Our results showed high levels in vegetables with flower as canliflower, globe artichoke (870-954 mg/kg), in roots and tubers like carrot, radish and turnip (800-1500 mg /kg). The highest quantities were determinate in leaves : spinach, parsley (1870- 2032 mg/kg). These values are high especially if we take into consideration the important consumption of some of these vegetables by the tunisian. A sensitization action must be led in order to decrease the use in agriculture of chemical and natural fertilizers which are the main source of nitrates in vegetables.

Key words : nitrates, fresh vegetables, fertilizers

¹ Ecole Supérieure des Sciences et Techniques de la Santé de Tunis.

² Centre d'Aide Médicale Urgente et de Réanimation - Tunis.

Introduction

Le danger des nitrates réside dans leur transformation en nitrites, composés très réactifs impliqués dans plusieurs atteintes et troubles métaboliques surtout dans la genèse de la méthémoglobinémie chez le nourrisson (1, 2). Ces mêmes nitrites peuvent se combiner à des amines secondaires et tertiaires et former des nitrosamines, substances dont l'effet cancérigène a été démontré (3,4,5). Les nitrates que l'homme peut consommer peuvent provenir de l'eau de boisson, des aliments d'origine végétale particulièrement des légumes ou sont utilisés en tant

qu'additif alimentaire dans les produits carnés tels que les viandes et les produits de charcuterie (6, 7,8).

Dans les végétaux, le taux des nitrates est fortement influencé par la pollution de l'environnement par les déchets industriels et les rejets urbains mais aussi par l'utilisation excessive en agriculture de fertilisants naturels (fumiers, purins) et chimiques (engrais azotés) (9,10). Les nitrates issus de ces pratiques passent dans le sol puis dans l'eau d'irrigation et se concentrent enfin dans les différents organes de la plante (9).

Nous avons déterminé dans cette étude la teneur en nitrates de plusieurs variétés de légumes cultivées dans

les zones agricoles de la région du grand Tunis, région connue par ses fortes activités agricoles et industrielles, activités pouvant augmenter considérablement la teneur en nitrates des végétaux entre autres des légumes.

Matériels et méthodes

Les échantillons de légumes sont pris du marché au gros de Tunis parmi les légumes destinés à la vente au consommateur. La prise des échantillons a été faite aux mois de janvier et de février par le service d'hygiène du marché. Une fois l'échantillon en notre possession, il est mis dans une glacière pour qu'il ne soit pas abîmé ou contaminé. Les échantillons de légumes provenaient des gouvernorats de Tunis, Ariana et Ben Arous. Les lieux de culture sont : Sejoumi, Mornaguia, Borj elamri, Teborba, Djedaida, Sidi thabeb, Sokra, Khelidia, Mornag et Fouchana. Les informations sur les échantillons (origine exacte, terrain de culture, eau d'irrigation) sont inexistantes et difficiles à obtenir de la part des agriculteurs.

Les nitrates sont dosés dans les broyats des légumes. En présence de diméthyl-2,4 phénol, les nitrates se transforment en nitroxylnol. Le nitroxylnol formé est distillé du mélange. Il est dissous dans une solution d'hydroxyde de sodium donnant une coloration jaune rouge dont on mesure l'extinction par spectrophotométrie à 485 nm.

Résultats et discussion

L'évaluation de la teneur en nitrates des principaux légumes cultivés dans la région du grand Tunis révèle des taux variables suivant les variétés étudiées (Tableau I). Les légumes fruits tels que la tomate ou le piment ont des concentrations en nitrates faibles de l'ordre de 30 à 50 mg/kg. Les fleurs (chou, chou-fleur, artichaut) contiennent des quantités importantes entre 640 et 954 mg/kg. Des taux importants atteignant 900 mg/kg ont été également déterminés dans certaines racines et bulbes tels que carotte, radis, fenouil et surtout dans le navet avec 1500 mg/kg. La pomme de terre contient par contre des quantités moindres, environ 200 mg/kg. Parmi les légumes étudiés, les feuilles (laitue, épinard, blette, persil) sont

Tableau 1 : Teneurs en nitrates de variétés de légumes cultivés dans la région du Grand Tunis. Les résultats sont exprimés en mg/kg de légume et sont des moyennes ± ESM.

Variétés de légumes	Nitrates (mg/kg)
Persil	2032 ± 210 n: (6)
Blette	1900 ± 172 n: (6)
Epinard	1870 ± 93 n: (6)
Navet	1510 ± 136 n: (6)
Laitue	1435 ± 150 n: (6)
Salade Romaine	1273 ± 144 n: (6)
Artichaut	954 ± 122 n: (4)
Céleri	900 ± 113 n: (6)
Carotte	896 ± 72 n: (6)
Fenouil	890 ± 102 n: (4)
Chou- fleur	870 ± 77 n: (6)
Radis	815 ± 86 n: (6)
Chou	640 ± 78 n: (6)
Betterave	620 ± 46 n: (4)
Oignon	336 ± 54 n: (6)
Fève	226 ± 43 n: (4)
Pomme de terre	213 ± 37 n: (6)
Petit pois	176 ± 18 n: (4)
Tomate	47 ± 13 n: (6)
Piment	28 ± 8 n: (6)

les plus riches en nitrates avec respectivement 1435 mg, 1870 mg, 1900 mg et 2032 mg/kg. Les légumes à feuille sont en effet connus très concentrateurs de nitrates. Ils peuvent contenir jusqu'à 5000 mg/kg (11, 12). Nos résultats confirment ces données et mettent en évidence des teneurs élevées en nitrates dans plusieurs variétés de légumes étudiés ce qui représente un réel risque pour le consommateur. Ce risque devient plus grand si on tient compte de la consommation importante de certaines de ces variétés tels que épinard, blette, carotte, pomme de terre. Ces variétés sont également introduites dans l'alimentation de l'enfant dès le très jeune âge, période durant laquelle le risque de méthémoglobinémie est grand (13). La dose journalière admissible de nitrates

(DJA) est fixée par les experts des additifs alimentaires de la commission FAO - OMS à 3,65 mg par kg de poids corporel, ce qui représente environ 250 mg de nitrates pour un homme adulte (9,14). Cette dose peut être franchie lorsque les légumes consommés sont très riches en nitrates (11,15, 16). La part importante qu'occupent les légumes dans notre alimentation et leur pouvoir à concentrer les nitrates nous incite à rechercher des solutions à ce problème. Une action de sensibilisation doit être menée auprès des intervenants possibles : agriculteurs, industriels, municipalités afin de diminuer les causes de pollution nitrique du sol. La sensibilisation des agriculteurs quant aux risques posés par les nitrates est également nécessaire afin de limiter l'utilisation des déchets azotés provenant des élevages et de diminuer les doses des engrais azotés et de les adapter aux besoins réels des plantes. Un contrôle périodique par les services spécialisés des nitrates dans le sol et dans les légumes est également indispensable.

Références bibliographiques

1. Avery AA. Infantile methemoglobinemia reexamining the role of drinking water nitrate. *Environ Health Perspect* 1999; 107 : 583-586.
2. Fana A, Wilhite CC, Book SA. Evaluation of the nitrate drinking water standard with reference to infant methemoglobinemia and potential reproductive toxicity. *Regul Toxicol Pharm.*1987; 7 : 135-148
3. Jakszyn P, Gonzalez CA. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk. *World J Gastroenterology* 2006; 12; 27 : 4296-4303.
4. Grosse Y, Baan R, Straif K, Secretan B, El Ghissassi F, Cogliano V. Carcinogenicity of nitrate nitrite and cyanobacterial peptide toxins. *The Lancet Oncology* 2006; 7;8 : 628-629.
5. Hemandes-Ramires RU, Galvan-Portillo MH, Ward MH, Agudo A, Gonzales CA, Onate-Ocana LF et al. Dietary intake of polyphenols, nitrate and nitrite and gastric cancer risk in Mexico city. *Int J cancer* 2009;15;125: 1424-1430.
6. Cornee J, Lairon D, Velema J, Guyader M, Berthezene P. An estimate of nitrate, nitrite, and N-nitrosodiméthylamine concentrations in french food products or food groups. *Sc. Alim* 1992;12: 155-197.
7. Saint Blanquat G. Répartition des nitrates et des nitrites dans l'alimentation. Conséquences toxicologiques. *Inf. Diét* 1988; 4: 31-36.
8. Pardo-Marin O, Yusa-Pelechia V, Villalba-Martin P, Perez-Dasi JA. Monitoring programme on nitrates in vegetable based baby foods marketed in the region of valencia, Spain: levels and estimated daily intake. *Food Addit and contam* 2010 ; 27: 478-486.
9. L'hirondel J. Les nitrates et l'homme, le mythe de leur toxicité. Les éditions de l'Institut scientifique et technique de l'environnement, France. 1996; 142p.
10. L'hirondel J. Les nitrates et l'homme, toxiques, inoffensifs ou bénéfiques ? Les éditions de l'Institut scientifique et technique de l'environnement, France. 2004; 256p.
11. Chung SY, Kim JS, Hong MK, Lee JO, Kim CM. Survey of nitrate and nitrite contents of vegetables grown in Korea. *Food Addit Contam* 2003; 20;6 : 621-628.
12. Jakszyn P, Agudo A, Berenguer A, Ibanez R, Amiano P, Pera G. Intake and food sources of nitrite and N-nitrosodiméthylamine in Spain. *Public Health Nutrition* 2006; 9; 6 : 785-791.
13. L'hirondel J. Les méthémoglobinémies du nourrisson. Données nouvelles. *Cah Nutr Diet* 1993 ; XXVIII ; 1: 35-40.
14. Mensinga TT, Speijers GJA, Meulenbelt J. Health Implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. *Toxicol Rev* 2003; 22 : 41-51.
15. Dietrich M, Block G, Pogoda JM, Buffler P, Hecht S, Preston-Martin S. A review: dietary and endogenously formed N-nitroso compounds and risk of childhood brain tumors. *Cancer Causes Control* 2005; 16; 6: 619-635.
16. Coss A, Cantor KP, Reif JS, Lynch CF, Ward MH. Pancreatic cancer and drinking water and dietary sources of nitrate and nitrite. *Am J Epidemiol* 2004;159 ; 7: 693-701.

Comparaison de deux procédures d'élimination du fibrinogène interférant sur l'électrophorèse des protéines sériques

N. BEN REJEB,
L. BOUASSIDA,
H. FALFOUL,
M. A. NEGRA,
A. OMEZZINE,
N. NABLI,
A. BOUSSETTA,
A. BOUSLAMA

Résumé : l'électrophorèse semi automatisée des protéines sur gel d'agarose est hautement résolutive, mais sensible à de nombreux interférents dont le fibrinogène qui donne une bande mince sur le profil électrophorétique des protéines faisant penser à un pic monoclonal et sollicitant des tests d'exploration inutiles. Le but de notre travail est de comparer deux procédures d'élimination du fibrinogène : à l'éthanol et à la thrombine. Notre étude a été réalisée à partir de 33 patients chez qui deux types de prélèvements sanguins ont été recueillis : sur tube sans anticoagulant et sur citrate tri-sodique. Le fibrinogène a été apporté dans l'échantillon par mélange volume à volume du sérum et du plasma correspondant (S+P). Les électrophorèses de protéines sur sérum (profil de référence), sérum traité à l'éthanol, sérum traité à la thrombine, mélange (S+P), mélange (S+P) traité à l'éthanol et mélange (S+P) traité à la thrombine ont été réalisés sur l'appareil HYDRASYS (Sebia) et les protides totaux dosés par la méthode au biuret sur l'automate CX9 (Beckman COULTER). Le pic de fibrinogène migre entre les fractions bêta et gamma globulines. Le traitement à l'éthanol diminue l'ampleur du pic de fibrinogène sans le faire disparaître tout le temps et altère la répartition des fractions électrophorétiques.

Le traitement à la thrombine fait disparaître complètement le pic de fibrinogène sans altérer les autres fractions.

Mots clé : électrophorèse des protéines sériques, fibrinogène, éthanol, thrombine.

Comparison of two procedures for removing fibrinogen that interferes on serum protein electrophoresis

Abstract : Protein electrophoresis in agarose gel is a semiautomated method with enhanced resolution but which was subject to many interferences such as fibrinogen which appears at the beta/gamma junction similar to a monoclonal immunoglobulin band in monoclonal gammopathy. Our study is to compare between two procedures for removing fibrinogen with absolute ethanol and with thrombin from serum.

Our study included 33 patients. Two samples have been collected from every patient : the first one on tube without anticoagulant and the second one with trisodium citrate anticoagulant. Samples were supplied on fibrinogen by mixing serum with correspondent plasma (S + P). Protein electrophoresis were performed on HYDRASYS (Sebia) with : sera (reference pattern), sera treated with absolute ethanol, sera treated with thrombin, mixed (S + P),

Laboratoire de Biochimie
Clinique, CHU Sahloul de
Sousse, Tunisie.

mixed (S + P) treated with absolute ethanol and mixed (S + P) treated with thrombin. Total protein concentrations were determined by biuret method on the CX9 (Beckman COULTER) analyser.

Ethanol treatment decreased the fibrinogen band without removing it completely and modify electrophoretic fractions repartition.

thrombin treatment of serum was effective to remove completely fibrinogen band from electrophoretic pattern without modifying fractions repartition.

Key words : serum protein electrophoresis, fibrinogen, ethanol, thrombin

Introduction

L'électrophorèse des protéines sériques (EPP), semi-automatisée sur gel d'agarose, est hautement résolutive et permet le dépistage de différentes sortes de dysprotéïnémies. Cependant cette technique est sensible à plusieurs interférences au niveau de la phase pré-analytique telles que l'hémolyse, la lactescence et la présence de fibrinogène. Sur le profil électrophorétique, où l'on distingue classiquement cinq fractions : albumine, alpha1, alpha2, bêta et gamma globulines ; l'hémoglobine libre migre dans la zone des bêta, celle liée à l'haptoglobine migre dans la zone des alpha2, les lipides migrent dans la zone des alpha2 et le fibrinogène (Fg) migre entre les zones des bêta et gamma globulines (1). Un moyen d'éviter l'interférence du fibrinogène, est de travailler sur du sérum et non sur du plasma. Cependant, dans le cas d'une coagulation incomplète : (sujets ayant un problème de coagulation, traitement par des anticoagulants, mauvaise activation de la coagulation par certains matériaux qui composent les tubes de prélèvement...), une fraction de fibrinogène persiste toujours après décantation. Les traces de fibrinogène donnent un pic d'allure monoclonale migrant entre les deux zones des bêta et gammaglobulines pouvant mener à des erreurs d'interprétation et solliciter des tests d'exploration complémentaires inutiles et coûteuses (2,3). C'est pourquoi, plusieurs procédures d'élimination des traces de fibrinogène ont été décrites pendant leurs efficacités reste discutable (2,3,4). C'est dans ce but que nous nous proposons par cette étude de comparer l'efficacité de deux procédures d'élimination du fibrinogène : par traitements à l'éthanol et à la thrombine.

Matériels et Méthodes

Echantillons

Parmi les échantillons acheminés à notre laboratoire de biochimie clinique en vue d'analyses de routine, nous avons sélectionné ceux de 33 patients ayant chacun deux échantillons : l'un recueilli sur tube sans anticoagulant et l'autre sur citrate de sodium. Tous les échantillons étaient non hémolysés et appartenaient à des patients ayant des temps de céphaline activée normaux, ainsi on a exclu de notre étude les sujets traités par l'héparine qui interfère avec la thrombine.

Après centrifugation, nous avons récupéré les sérums (S) et les plasmas citratés (P) qui nous ont servi à l'étude des effets des deux procédures d'élimination du fibrinogène : précipitation à l'éthanol et coagulation à la thrombine. Le fibrinogène a été artificiellement apporté par le mélange volume à volume du sérum et du plasma (S+P) correspondant au même patient.

Trois des échantillons de sérums ne présentaient pas suffisamment de volume pour qu'ils soient traités par l'éthanol ou encore par la thrombine, c'est pourquoi nous les avons exclu de l'étude de comparaison des profils protéiques des sérums purs avec ceux traités à la thrombine et à l'éthanol.

Méthodes

Electrophorèse des protéines sur gel d'agarose : les EPP ont été réalisées avec le Kit HYDRAGEL 30 PROTEIN(E) (Réf : 4140, N° de lot : 038/01) sur l'analyseur HYDRASYS (Sebia, France). L'intégration a été effectuée

avec le scanner EPSON Expression 1680 Pro avec le logiciel Phoresis (Sebia, France). Les protéines totales ont été dosées par la méthode de biuret sur l'auto-analyseur CX9 (Synchron Clinical System CX9 PRO, BECKMAN COULTER Fullerton, USA).

Procédure d'élimination du fibrinogène par l'éthanol (3) :

Pour chaque patient, le sérum (S) et le plasma correspondant (P) ont été mélangés à volumes égaux. A 0,9 ml du mélange (S+P), nous avons ajouté 0,1 ml d'éthanol absolu (MERCK, à 99,9%). Nous avons de la même façon, traité les sérums purs correspondants. Après homogénéisation, nous avons laissé incuber une nuit à +4°C. Après centrifugation à + 4° C à 1100 g pendant 5 min, nous avons récupéré les surnageants ainsi prêts pour l'EPP.

Procédure d'élimination du fibrinogène par la thrombine (2) :

Pour chaque patient, le sérum (S) et le plasma correspondant (P) ont été mélangés à volumes égaux. Nous avons ajouté à 150 µl du mélange (S+P), 30 µl d'une solution de thrombine à 0,33U/µl (réactif N°1 du kit fibrinogène (FIBRINOGENE, Réf : 331, N° de lot : S88, Biomaghreb, Tunisie) puis incubé pendant 30 min à 37°C. Nous avons de la même façon traité les sérums purs correspondants.

Pour chaque patient, nous avons réalisé six EPP [sérum, sérum traité à l'éthanol, sérum traité à la thrombine, mélange (S+P), (S+P) traité à l'éthanol, (S+P) traité à la thrombine], excepté pour trois d'entre eux pour qui les EPP à partir des sérums traités à l'éthanol et de ceux traités à la thrombine n'ont pas été réalisées à cause des volumes sériques insuffisants.

Analyse statistique :

L'analyse statistique a été réalisée sur le logiciel Excel. La comparaison des moyennes a été effectuée par le test de Student et le seuil de significativité a été fixé à 0,05.

Résultats

Comparaison des profils protéiques en présence et en absence du fibrinogène

Le fibrinogène a été apporté aux échantillons par mélange volume à volume des sérums et de leurs plasmas correspondants.

Le pic de fibrinogène migre entre les fractions bêta et gamma globulines (figure 1) et augmente significativement la fraction des bêta globulines (16,51 vs 13,01% ; $P < 0,0001$). Aussi, nous avons noté une diminution significative dans la fraction des gamma globulines (tableau I).

Effets de l'éthanol et de la thrombine sur la distribution des fractions protéiques

Nous avons constaté que par rapport aux profils protéiques des sérums purs, non traités, ceux des sérums traités à l'éthanol présentent des fractions alpha2 augmentées (15,15 vs 13,26% ; $P = 0,002$) et bêta diminuées (10,58 vs 13,24% ; $P < 0,0001$).

Aucune différence significative n'a été constatée pour les fractions protéiques entre les sérums non traités et ceux traités à la thrombine (tableau II).

Effets des traitements à l'éthanol et à la thrombine sur l'élimination du pic de fibrinogène

Les traitements des mélanges (S+P) à l'éthanol et à la thrombine diminuent significativement la fraction des

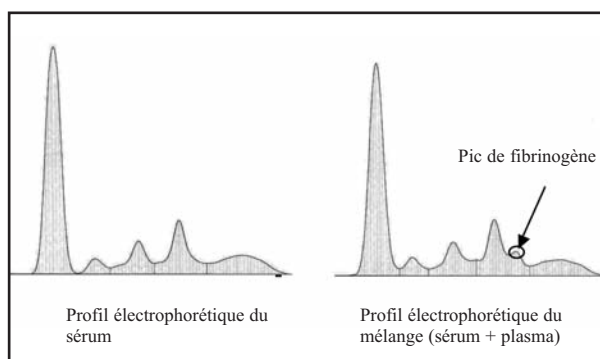


Figure 1 : Exemples de profils électrophorétiques du sérum et du mélange (sérum + plasma)

Tableau I : Comparaison des profils protéiques des sérums purs et des sérums supplémentés en fibrinogène (mélanges S+P correspondants)

	Albumine		Alpha1 Globulines		Alpha2 Globulines		Béta Globulines		Gamma Globulines	
	S (n = 33)	(S+P) (n = 33)	S (n = 33)	(S+P) (n = 33)	S (n = 33)	(S+P) (n = 33)	S (n = 33)	(S+P) (n = 33)	S (n = 33)	(S+P) (n = 33)
Moyenne ± Ecart-type (%)	51,06 ± 5,72	50,83 ± 6,08	3,88 ± 1,23	3,75 ± 1,22	14,12 ± 3,37	13,12 ± 2,74	13,01 ± 2,36	16,51* ± 2,51	17,93 ± 5,03	15,76** ± 4,76

S : sérum ; (S+P) : Sérum + plasma correspondant.

* : p < 0,0001

** : p = 0,038

Tableau II : Comparaison des profils protéiques des sérums purs avec ceux traités à la thrombine et à l'éthanol

	Albumine			Alpha1 Globulines			Alpha2 Globulines			Béta Globulines			Gamma Globulines		
	S (n = 30)	STE (n = 30)	STT (n = 30)	S (n = 30)	STE (n = 30)	STT (n = 30)	S (n = 30)	STE (n = 30)	STT (n = 30)	S (n = 30)	STE (n = 30)	STT (n = 30)	S (n = 30)	STE (n = 30)	STT (n = 30)
Moyenne ± Ecart-type (%)	52,5 ± 4,56	53,18 ± 5,3	54,29 ± 4,8	3,46 ± 0,88	3,48 ± 0,97	3,29 ± 0,93	13,26 ± 2,34	15,15* ± 2,75	13,36 ± 2,39	13,34 ± 2,23	10,58** ± 1,9	12,52 ± 2,26	17,44 ± 5,23	17,49 ± 5,43	16,56 ± 4,89

S : sérum

STE : sérum traité à l'éthanol

STT : sérum traité à la thrombine

* : p = 0,002

** : p < 0,0001

Tableau III : Pourcentages des fractions béta avant et après traitement à la thrombine et à l'éthanol

	S non traité (n = 33)	(S+P) non traité (n = 33)	(S+P) Traité à la thrombine (n = 33)	(S+P) Traité à l'éthanol (n = 33)
Moyenne ± Ecart-type (%)	13,01 ± 2,36	16,51 ± 2,51	12,75 ± 2,5	12,28 ± 2,33
p			< 0,0001* 0,1***	< 0,0001** 0,33****

S : sérum ; (S+P) : mélange sérum + plasma

* : (S+P) traité à l'éthanol comparé à (S+P) non traité

** : (S+P) traité à la thrombine comparé à (S+P) non traité

*** : (S+P) traité à l'éthanol comparé à (S) non traité

**** : (S+P) traité à la thrombine comparé à (S) non traité

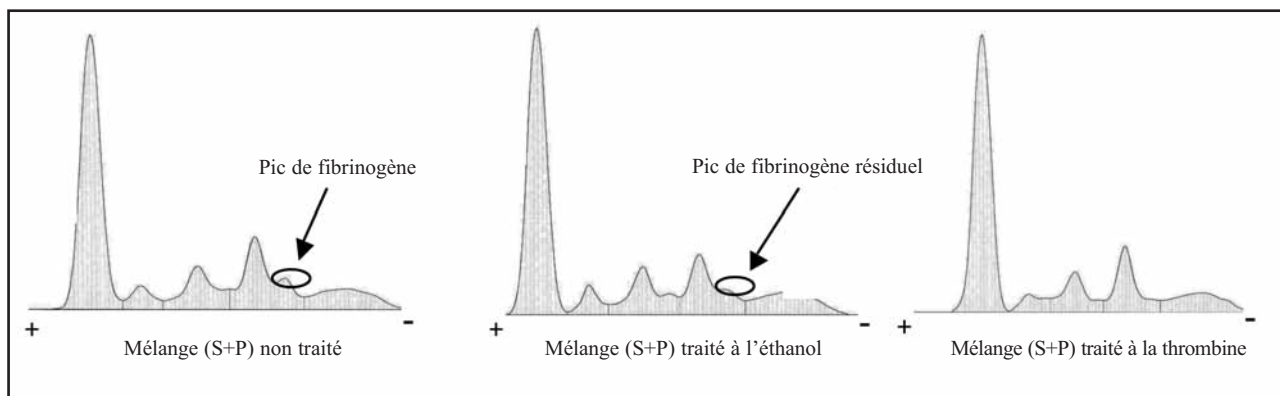


Figure 2 : Exemple de l'effet des traitements à l'éthanol et à la thrombine sur l'élimination du pic de fibrinogène

béta globulines ramenant les profils à ceux obtenus avec du sérum pur. En effet aucune différence significative n'a été constatée entre les fractions bêta des sérums purs et celles de leurs correspondants (S+P) traités à l'éthanol et à la thrombine ($P = 0,10$; $P = 0,33$ respectivement). Cette diminution de la fraction des bêta globulines est de 4,27% après traitement à l'éthanol et de 3,79% après traitement à la thrombine (tableau III).

Toutefois, nous avons noté que malgré une diminution significative de la fraction bêta, le traitement à l'éthanol ne fait pas tout le temps disparaître totalement le pic de fibrinogène. En effet, un pic résiduel a été constaté dans 18 échantillons sur les 30 étudiés (figure 2).

Discussion

La présence dans les prélèvements sériques de fibrinogène résiduel, donne une bande mince à l'électrophorèse des protéines qui migre entre les fractions bêta et gammaglobulines et qui est du même aspect que donne une authentique dysglobulinémie monoclonale.

Le prélèvement du sang sur tube sans anticoagulant, permet en théorie de s'affranchir de la présence de fibrinogène ; cependant, la pratique courante montre que certaines conditions tenant soit au traitement du patient, soit aux conditions de prélèvement (certains matériaux des tubes de prélèvements...), peuvent conduire à des interférences liées à la présence de fibrinogène résiduel : traitement anticoagulant provoquant une coagulation

incomplète dans le tube, désordre acquis de coagulation, dysfibrinogénémie congénitale, déficit en vitamine K... Nous avons comparé deux procédures d'élimination du fibrinogène, par l'éthanol qui le précipite (5) et par la thrombine qui le transforme en un caillot de fibrine.

Comme d'autres études, nous avons révélé la présence du pic de fibrinogène entre les fractions bêta et gamma globulines, ce qui augmente significativement la fraction des bêta globulines (16,51 vs 13,01% ; $P < 0,0001$) (2,3,6).

Nous avons noté que le traitement à l'éthanol des échantillons sériques, modifie la distribution des fractions protéiques des profils électrophorétiques en augmentant la fraction des alpha2 globulines (13,26 vs 15,15% ; $P = 0,002$) et en diminuant celle des bêta globulines (13,34 vs 10,58% ; $P < 0,0001$). L'éthanol ne semble pas précipiter sélectivement le fibrinogène malgré ce qui a été avancé par Qiu et al (3) qui ont mis au point ce protocole. Les mêmes auteurs proposent un autre protocole qui donne les mêmes résultats et qui au lieu d'une incubation pendant une nuit à +4°C, préconise de mettre l'échantillon en contact avec l'éthanol pendant 15min dans un bain de glace. Les auteurs de cette étude ont tout de même reconnu que de petites proportions d'albumine, d'alpha et de bêta globulines pourraient précipiter sous l'effet de l'éthanol tandis que les immunoglobulines IgG, IgA, IgM, et les fractions C3 et C4 du complément restent inchangées (3). Nos résultats concordent avec ceux de Zhu et al (6) qui ont postulé que la diminution de la fraction bêta serait due à la

dégradation par l'éthanol de la protéine C3 (une bêta globuline) et les produits de dégradation migrent ensuite au niveau de la jonction bêta-alpha2, ce qui expliquerait l'élévation de la fraction alpha2 protéique. Ibrahim et al (4) ont fait migrer les précipités correspondants aux échantillons traités à l'éthanol et ont noté en plus du fibrinogène, la présence d'autres fractions protéiques ce qui explique la modification dans la distribution des fractions protéiques sur les profils électrophorétiques traités à l'éthanol. Nous n'avons noté aucune modification dans les profils électrophorétiques après traitement à la thrombine malgré que ce soit une protéine.

Nous avons trouvé que les traitements à l'éthanol ou à la thrombine des sérums supplémentés en fibrinogène (mélanges S+P) diminuent significativement la fraction des bêta globulines qui retrouve des pourcentages comparables à ceux des sérums purs correspondants. Cette fraction bêta est plus diminuée après traitement à l'éthanol qu'après traitement à la thrombine (4,27 vs 3,79% ; P = 0,12) puisqu'en plus de l'élimination du fibrinogène, l'éthanol affecte d'autres protéines migrant au niveau de cette zone, ce qui concorde avec ce que nous avons rapporté sur l'effet de l'éthanol sur la distribution des fractions protéiques et sur le fait qu'il diminue la fraction bêta des échantillons sériques. Toutefois, nous avons noté que malgré une diminution significative de la fraction bêta, le traitement à l'éthanol diminue l'ampleur du pic de fibrinogène sans le faire régulièrement disparaître.

Nos résultats sont comparables à ceux rapportés par Zetterberg et al (7) qui jugent que le traitement à l'éthanol est non reproductible dans l'action de faire disparaître le pic de fibrinogène des échantillons sériques. Tandis que, comme l'ont rapporté Lefèvre et al (2), le traitement à la thrombine fait disparaître le pic de fibrinogène sans modifier la répartition des fractions protéiques et semble ainsi être le plus recommandé.

Conclusion

Au vu des résultats de notre étude, nous recommandons le traitement à la thrombine pour l'élimination des pics de fibrinogène puisqu'elle les fait disparaître sans toute-

fois affecter la distribution des fractions protéiques d'un profil électrophorétique sérique. La thrombine pourrait être apportée au sérum après centrifugation, sinon, actuellement, des tubes avec thrombine qui éliminent le fibrinogène à l'intérieur même des tubes de prélèvement, sont commercialisés.

Références bibliographiques

1. Martinez-Subiella S, Tecles F, Montes A, Gutierrez C, Ceron J.J. Effects of haemolysis, lipaemia, bilirubinemia and fibrinogen on protein electrophoregram of canine samples analysed by capillary zone electrophoresis. *Vet J* 2002 ; 164 : 261-68.
2. Lefèvre F, Gillery P. Présence résiduelle de fibrinogène: un piège fréquent dans l'interprétation de l'électrophorèse des protéines sériques. *Ann Biol Clin* 1997 ; 55 : 238-40.
3. Qiu L, Levinson SS, Keeling KL, Elin RJ. Convenient and effective method for removing fibrinogen from serum specimens before protein electrophoresis. *Clin Chem* 2003 ; 49: 868-72.
4. Ibrahim Y, Volkmann M, Hassoun R, Fiehn W, Rossmann H. Serum protein electrophoresis : reptilase treatment is superior to ethanol precipitation for specific removal of fibrinogen from heparinized plasma samples. *Clin chem* 2004; 50: 1100- 101.
5. Cohn EJ, Srong LE, Hughes WL Jr, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M et al. Preparation and properties of serum and plasma proteins : IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc* 1946 ; 68 : 459-75.
6. Zhu Y, Elin RJ. Identification of a spurious band on serum protein electrophoresis induced by ethanol treatment. *Clin Chim Acta* 2006; 366: 341-43.
7. Zetterberg H, Nilsson-Ehle H. Ethanol precipitation is not reliable for selectively removing nonmonoclonal peaks seen in the fibrinogen region on capillary zone electrophoresis of serum proteins. *Clin Chem* 2004 ; 50 : 1880-81.

Mutations précocore et core du Virus de l'Hépatite B : Optimisation des techniques de détection moléculaire et analyse de l'impact sur l'évolution de l'infection chronique vers la cirrhose dans la région du Centre tunisien.

I. FODHA¹,
M. RIANI¹,
S. KACEM¹,
M. BEN HAJ FREDJ¹,
S. KETATA¹,
A. LETAIEF²,
S. AJMI³,
N. BOUJAFFAR¹,
A. TRABELSI²

Résumé : L'infection chronique par le Virus de l'Hépatite B représente la principale étiologie de carcinome hépatocellulaire au niveau mondial. La progression de la pathologie hépatique se fait selon un mécanisme multifactoriel encore mal élucidé probablement influencé par les caractéristiques virologiques propres à la souche virale en cause. Les objectifs de notre étude étaient d'optimiser les outils moléculaires de détection des mutations précocore et BCP (Basal Core Promoter) du Virus de l'Hépatite B puis de comparer la fréquence de ces mutations entre porteurs asymptomatiques et porteurs chroniques ayant évolué vers la cirrhose. Notre travail a porté sur 36 patients porteurs chroniques du Virus de l'Hépatite B, parmi lesquels 18 étaient cirrhotiques et 18 ne présentaient ni cytolysse hépatique, ni cirrhose, ni carcinome hépatocellulaire. Les mutants précocore et BCP ont été détectés par techniques de PCR (Polymerase Chain Reaction)-séquençage et PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), respectivement. La comparaison entre porteurs asymptomatiques et patients cirrhotiques a révélé une prévalence plus importante de mutations précocore (100% vs 83%) et BCP (44.4% vs 33.3%) parmi les patients cirrhotiques. Toutefois, la différence était statistiquement non significative. Notre travail soutient l'hypothèse que les patients porteurs de virus mutants précocore et BCP présentent un risque accru de développer une cirrhose. Cependant, des études approfondies restent nécessaires pour conforter cette théorie.

Mots clés : Virus de l'Hépatite B, Mutant précocore, Mutant BCP, Cirrhose.

Optimization of molecular methodology for the detection of Hepatitis B Virus precore/BCP mutations and analysis of the risk to develop cirrhosis in the center of Tunisia

Abstract : Chronic hepatitis B virus infections are the major cause of hepatocellular carcinoma worldwide. Progression of liver disease seems to be adversely affected by viral strain characteristics, such as genotype, precore and basal core promoter (BCP) mutation. The aims of the present study were the optimization of molecular methodology for the detection of Hepatitis B Virus precore/BCP mutations and thereafter the comparison in frequency of detection of such mutations between asymptomatic carriers and chronic Hepatitis B Virus infected patients with cirrhosis. Thirty-six Tunisian patients with chronic Hepatitis B Virus infection were investigated : 18 were asymptomatic carriers and 18 presented with cirrhosis. Precore and core-promoter mutations were detected using PCR (Polymerase Chain Reaction)-RFLP (Restriction

¹ UR06SP20, Laboratoire de Microbiologie, CHU Sahloul, Sousse, Tunisie

² Service de Gastrologie, CHU Farhat Hached, Sousse, Tunisie

³ Service de Gastrologie, CHU Sahloul, Sousse, Tunisie

Fragment Length Polymorphism) and PCR-sequencing methodology. The comparison between asymptomatic carriers and patients with cirrhosis showed a higher prevalence of precore (100% Vs 83%) and core-promoter mutations (44.4% vs 33.3%) in patients with cirrhosis. Nevertheless, these differences remained not significant statistically. The pathogenesis of hepatitis B infections is not completely understood. The present study supports the idea that patients with precore and BCP mutations seem to carry an increased risk for developing cirrhosis and hepatocellular carcinoma independently of viral load. Further studies are needed to definitely elucidate such a hypothesis.

Key words : Hepatitis B virus, Precore mutant, Core-promoter mutant, Cirrhosis.

Introduction

Le virus de l'hépatite B (VHB) demeure un problème de santé publique au niveau mondial. Selon l'OMS, 2 milliards de personnes ont été en contact avec le virus à travers le monde, avec plus de 350 millions de porteurs chroniques. L'infection par le VHB est le plus souvent bénigne, mais le passage à la chronicité, qui se fait chez 5 à 10% des adultes immunocompétents [1], peut conduire au développement d'une cirrhose voire d'un hépatocarcinome. Le VHB serait ainsi responsable de près d'un million de décès par an, par hépatite chronique active, cirrhose ou hépatocarcinome [2,3]. A ce titre, l'infection par le VHB représente la seconde cause de décès par cancer dans le monde, après le tabac [4].

Parmi les facteurs de risque susceptibles d'influencer péjorativement l'histoire naturelle de la maladie, certains sont actuellement admis : un âge jeune au moment de la contamination, une longue période d'infection, un taux élevé des transaminases sériques, le sexe masculin, la consommation d'alcool, et une co-infection par les virus de l'Hépatite C ou de l'Immunodéficience Humaine. Outre ces facteurs reconnus, il semblerait que la progression de la pathologie hépatique puisse être également influencée par les caractéristiques virologiques propres à la souche virale en cause, à savoir le génotype, la mutation précore G1896A et la double mutation BCP (Basal Core Promoter) A1762T/G1764A. Ces mutations entraînent la diminution voire l'arrêt de synthèse de l'AgHBe, alors que la répllication virale persiste et peut même augmenter [5,6]. En Tunisie,

l'hépatite B est moyennement endémique, avec un taux de portage chronique de l'ordre de 4 à 7%. De plus, un taux élevé de mutants précore et BCP a été rapporté par différentes études. [7]

Nous nous sommes proposés comme objectifs dans la présente étude d'optimiser les outils moléculaires de détection des mutations précore et BCP (Basal Core Promoter) du Virus de l'Hépatite B puis de comparer la fréquence de ces mutations entre porteurs asymptomatiques du VHB et porteurs chroniques ayant évolué vers la cirrhose dans la région du Centre tunisien.

Patients et méthodes

Patients

Notre travail a consisté en une étude rétrospective investiguant 36 patients porteurs chroniques du VHB (AgHBs positif ; IgM anti-HBc négatif) suivis par les services de Gastrologie des CHU Sahloul (Sousse) et Farhat Hached (Sousse) du 1^{er} janvier 2008 au 31 mars 2009.

Pour chaque patient, un prélèvement de sérum (pour examens sérologiques) et un prélèvement de plasma (pour examens moléculaires) ont été collectés et immédiatement conservés à -20° C jusqu'à leur analyse.

Chaque prélèvement reçu était accompagné d'une fiche de renseignements dûment complétée permettant de distinguer deux différents groupes de patients pour la réalisation d'une étude «cas-témoins» : d'une part, 18 patients présentant une cirrhose à l'examen clinique ont été inclus dans le groupe dit des «Malades» ; d'autre part, 18 patients, dont le taux des transaminases sériques

était normal et n'ayant évolué jusque-là ni vers la cirrhose ni vers le carcinome hépatocellulaire (CHC), ont constitué le groupe dit des «Témoins».

Les populations «malades» et «témoins» étudiées comportaient 67% et 61% d'hommes, respectivement. La moyenne d'âge des patients «malades» et «témoins» était de 49 ans et 57 ans, respectivement.

Dans tous les cas, seuls les patients non traités pour hépatite B ont été retenus. De plus, pour garantir des conditions optimales à l'analyse moléculaire des souches de VHB, tous les patients sélectionnés pour l'étude présentaient une charge virale en ADN-VHB > 10⁴ copies/ml. Concernant le marqueur sérologique HBe, l'antigène était présent et les anticorps absents pour un patient du groupe des «malades» versus 2 patients «témoins».

Méthodes

Détection des marqueurs sérologiques du VHB :

Les marqueurs sérologiques du VHB (AgHbs, IgM anti-HBc, AgHbe, Ac anti-Hbe) ont été déterminés en utilisant la technique ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) automatisée sur le système VIDAS (Biomérieux).

Extraction et quantification de l'ADN viral :

L'ADN du VHB a été extrait et quantifié directement à partir du plasma au moyen d'une technique commercialisée standardisée (Cobas AmpliCor HBV Monitor, Roche).

Détection des mutants précore du VHB :

La détection des mutants précore a fait appel dans un premier temps à une PCR nichée réalisée selon le protocole décrit par Wintermeyer et al. [8]. Le produit d'amplification a par la suite été séquencé pour permettre la mise en évidence de la mutation G1896A

caractéristique des mutants précore. Le séquençage a été réalisé à l'aide du séquenceur automatique à capillaires 3100 ABI (Applied Biosystems). L'analyse des chromatogrammes obtenus a été effectuée au moyen du logiciel Chromas et les séquences obtenues comparées aux séquences publiées sur Genbank (Figure 1).

Détection des mutants BCP du VHB :

La détection des mutants BCP a fait appel, dans un premier temps, à une PCR nichée effectuée selon le protocole décrit par Takahashi et al. [9], suite à quoi le produit d'amplification a été soumis à une digestion enzymatique par l'enzyme Sau3AI (Promega). La digestion a été réalisée dans un volume final de 10µl, en présence de 1µl du tampon de l'enzyme (10X), 0.1µl de BSA, 0.1µl d'enzyme Sau3AI (10U/µl) pour 1.5µg d'ADN. Le mélange a été incubé dans un bain-marie pendant 2 heures à 37°C puis analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% après ajout de 3µl de tampon de charge de l'ADN 6X (Loading Dye, Promega). Si la mutation BCP était présente, l'amplicon, d'une taille initiale de 306 pb, était alors coupé en 2 fragments, l'un de 190 pb et l'autre de 110 pb (Figure 2).

Analyse statistique :

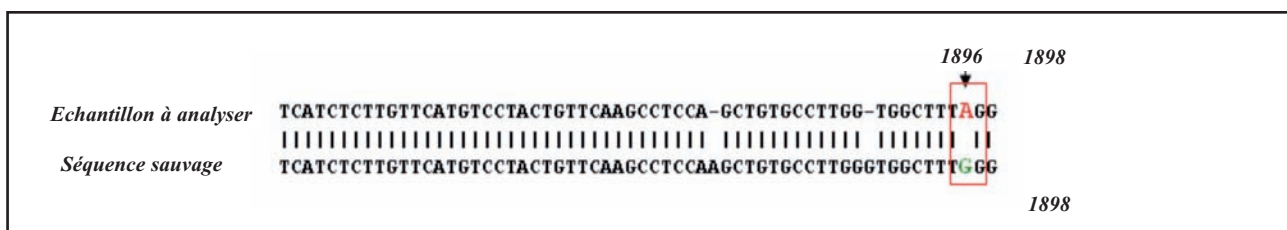
Les analyses statistiques comparatives pour les variables catégoriques ont été effectuées au moyen du test de corrélation de Pearson. L'analyse des différents résultats a été réalisée en utilisant le logiciel SPSS version 10 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Résultats

Distribution des virus mutants précore et BCP :

Au total, sur les 36 patients testés, le statut concernant la

Figure 1 : Recherche de la mutation précore par analyse comparative de séquences.



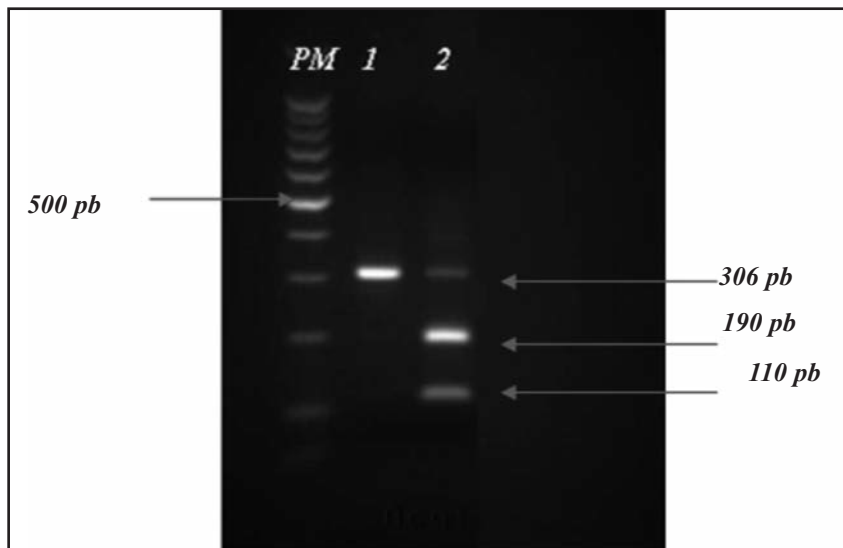


Figure 2 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 2% du produit de digestion des amplicons de la PCR nichée par Sau3AI.

PM : Marqueur de poids moléculaire (DNA ladder 100pb, Promega)

Puits 1 : fragment de 306 pb correspondant au VHB sauvage pour la mutation BCP.

Puits 2 : fragments de 190 pb et 110 pb correspondant au VHB mutant BCP.

mutation précore a pu être déterminé pour 21 d'entre eux, dont 9 étaient cirrhotiques et 12 porteurs asymptomatiques. Ainsi, sur 21 patients, 19 (90.5%) étaient porteurs de VHB mutants précore, alors que les 2 autres (9.5%) étaient porteurs de VHB sauvages pour la mutation précore. Le statut concernant la mutation BCP a pu être déterminé pour l'ensemble des 36 patients testés.

Ainsi, sur les 36 patients testés, 14 (38.9%) étaient porteurs de VHB mutants BCP, tandis que les 22 autres (61.1%) étaient porteurs de VHB sauvages pour la mutation BCP.

Analyse de l'impact des mutations sur l'évolution vers la cirrhose :

Afin d'évaluer l'impact des mutations précore et BCP dans l'évolution de l'infection par le VHB vers la cirrhose, une étude statistique a été menée par comparaison de la fréquence des mutations entre population cirrhotique et population asymptomatique témoin.

Impact de la mutation précore dans l'évolution vers la cirrhose :

Tous les patients cirrhotiques pour lesquels la recherche

de la mutation précore a été possible (9 cas) étaient porteurs de VHB mutants précore, soit 100% des cas.

Concernant les 12 patients témoins analysés, 10 (83%) étaient porteurs de VHB mutants précore. Ainsi, la fréquence de mutation précore était plus importante parmi

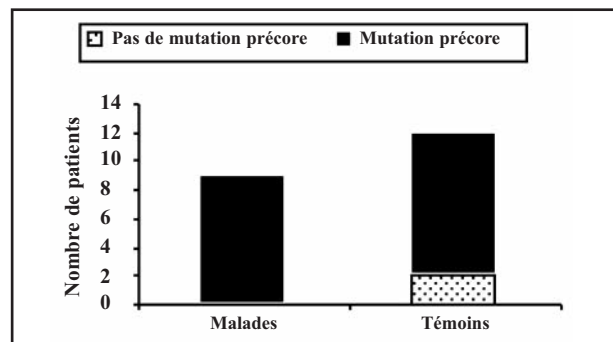


Figure 3 : Répartition des VHB mutants précore parmi les patients cirrhotiques et témoins.

la population de cirrhotiques que parmi les patients témoins (100% Vs 83%) (Figure 3). Toutefois, la différence s'est avérée statistiquement non significative selon le test de corrélation de Pearson.

Impact de la mutation BCP dans l'évolution vers la cirrhose :

Parmi les 18 patients cirrhotiques, 8 (44.4%) étaient porteurs de VHB mutants BCP, versus 6 (33.3%) parmi les 18 patients témoins asymptomatiques (Figure 4).

Ainsi, la fréquence de mutation BCP était plus élevée parmi les patients cirrhotiques que parmi les témoins. Néanmoins, le test de corrélation de Pearson n'a pas retrouvé de différence significative entre présence de mutation BCP et cirrhose.

Discussion***Distribution des virus mutants précocore et BCP dans la population d'étude :***

L'étude des mutants core et précocore du VHB pourrait contribuer à mieux comprendre l'évolution de la maladie et des symptômes qu'elle provoque. La mutation précocore était présente en forte proportion dans notre population d'étude (90.5%).

Ceci concorde avec les précédentes études menées en Tunisie par Triki et al. [10] (86%) et par Ayed et al. [11] (92.4%). Ces résultats sont en revanche nettement supérieurs à ceux rapportés en Asie [5] (47%) et en Amérique du Nord [12] (27%). Ceci semble pouvoir s'expliquer par la distribution différentielle des génotypes de VHB à travers le monde. En effet, d'après les données de la littérature, le génotype D, particulièrement fréquent en Tunisie au même titre que dans l'ensemble du pourtour méditerranéen, est fréquemment associé à la présence de mutation précocore. Il a été précédemment montré que cette association résultait de la stabilisation de la structure génomique du VHB du fait d'une liaison à forte affinité entre l'adénine en position 1896, caractéristique de la mutation précocore, et la thymine en position 1858, caractéristique du génotype D. [8]

Dans notre étude, les mutants BCP ont été retrouvés dans 38.9% des prélèvements. Cette fréquence, similaire à celles retrouvées en Asie (40%) [13]) et en Amérique du nord (25%) [14], est toutefois élevée par rapport à celle rapportée précédemment en Tunisie par Ayed et al. [11] (11%). Une telle différence pourrait être en partie due à

la population d'étude qui n'est pas semblable : alors que 50% des patients de notre étude étaient cirrhotiques, les patients investigués dans l'étude de Ayed et al. étaient des porteurs chroniques du VHB. Néanmoins, la fréquence de détection des mutants BCP parmi les patients porteurs non cirrhotiques de la présente étude reste tout de même supérieure à celle observée par Ayed et al. (33% Vs 11%).

Impact de la mutation précocore dans l'évolution péjorative vers la cirrhose :

Les résultats trouvés dans notre étude montrent que 100% des cirrhotiques étaient porteurs de virus mutants précocore, Vs 83% des témoins. Ces résultats sont en accord avec une étude menée en Asie [15], selon laquelle 31.2% des cirrhotiques étaient porteurs de mutants précocore Vs 25% de témoins. Ceci suggère une éventuelle implication de la mutation précocore dans l'évolution vers la cirrhose, bien que l'association se soit avérée statistiquement non significative. De ce fait, cette hypothèse reste à confirmer par des études approfondies réalisées à plus large échelle.

L'implication probable de la mutation précocore dans l'évolution vers la cirrhose ferait suite à un mécanisme très complexe mal élucidé. Elle serait due principalement au rôle joué par l'AgHBe comme immunorégulateur, en modulant l'action des lymphocytes T CD4+, ce qui favoriserait l'évolution de l'infection du VHB vers la chronicité [16]. Cependant, dans le cas de la présence de la mutation précocore en absence d'AgHBe, ce rôle d'immunorégulation est perdu, ce qui induit une réaction immunitaire violente causant la destruction des hépatocytes et augmentant le risque de l'évolution vers l'hépatite fulminante et/ou la cirrhose [16].

Impact de la mutation BCP dans l'évolution péjorative vers la cirrhose :

D'après notre étude, 44.4% des patients cirrhotiques étaient porteurs de la mutation BCP Vs 33.3% des témoins. Cette différence entre les deux populations suggère une éventuelle implication de la mutation BCP dans l'évolution vers la cirrhose, bien que l'association soit statistiquement non significative dans notre étude. Des études réalisées en Asie et en Afrique ont trouvé une

fréquence importante de mutants BCP chez des patients cirrhotiques et/ou souffrant de CHC. Selon une étude réalisée par Tong et al. [6], le portage de mutants BCP serait prédictif d'un développement de CHC. En effet, dans cette étude, 77.7% des patients souffrant de CHC étaient porteurs de mutants BCP Vs 21.2% des porteurs chroniques asymptomatiques du VHB.

La relation entre mutants BCP et cirrhose reste à ce jour mal connue. Certaines hypothèses ont toutefois été avancées : d'une part, il semblerait que le mutant BCP soit capable d'accentuer la virulence en augmentant la réponse immunitaire de l'hôte. De plus, il pourrait causer une altération de la région codante de l'antigène HBe [5], or la diminution de la circulation de l'AgHBe semble exacerber la réponse immunitaire envers les hépatocytes infectés par le VHB, ce qui augmenterait l'apoptose et la régénération des hépatocytes, conduisant à un endommagement du foie [5]. De plus, la mutation BCP augmenterait l'efficacité de la réplication virale en modulant les niveaux relatifs de transcription d'ARN par la création d'un récepteur du facteur nucléaire 1 de transcription [5].

Conclusion

La signification des infections par les virus mutants précore/core du VHB reste encore mal connue, tant pour les conséquences cliniques que pour les mécanismes physiopathologiques. Dans le présent travail, bien que l'association se soit avérée statistiquement non significative, la fréquence de détection des mutants précore et BCP était supérieure chez les patients cirrhotiques comparativement aux patients témoins. Ainsi, l'hypothèse de l'implication des mutations précore/core dans l'évolution vers la cirrhose reste vraisemblable.

Toutefois, les mécanismes impliqués dans l'évolution vers le CHC semblent être complexes et multifactoriels : ainsi, il a notamment été montré que l'antigène X interagissait directement avec le gène P53 et l'enzyme XAP-1 réparatrice d'ADN, et induisait un changement des acides aminés K130M et V131I dans l'antigène X, ce qui interférerait avec le contrôle de la croissance cellulaire et la réparation d'ADN, pouvant conduire au développement d'une

cirrhose et/ou d'un CHC [5]. Une étude à large échelle comportant des patients porteurs de CHC parallèlement aux patients cirrhotiques et asymptomatiques reste nécessaire afin d'élucider les mécanismes oncogènes conduisant au développement du CHC.

Références

1. Hyams KC : Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection : A review. *Clin Infect Dis* 1995, 20:992-1000.
2. Liu WC, Miozokami M, Buti M, Lindh M, Young KC, Sun KT et al. Simultaneous Quantification and Genotyping of Hepatitis B virus for Genotypes A to G by real time PCR and two steps melting curve Analysis. *J Clin Microbiol* 2006, 44: 4491-4497.
3. Paul SB, Sreenivas V, Gulati MS, Madam K, Gupta AK, Mukhopadhyay S et al. Incidence of hepatocellular carcinoma among Indian patients with cirrhosis of liver : an experience from a tertiary care center in northern Indi. *Indian J Gastro* 2007, 26: 274-278.
4. Denis F, Thibault V, Alain S. Hepadnaviridae. Virus de l'hépatite B. *Virologie Médicale*. Editions ESTEM 2003, 293-305.
5. Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL, Su J et al. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Nat Cancer Inst* 2008, 100:1134-1143.
6. Tong MJ, Blatt LM, Kao JH, Cheng JT, Corey WJ. Basal core promoter T1762/A1764 and precore A1896 gene mutations in hepatitis B surface antigen-positive hepatocellular carcinoma : a comparison with chronic carriers. *Liver Int* 2007, 1356-1363.
7. Rossana BM, Colombatto P, Bonino F. Personalized therapy in chronic viral hepatitis *Molec Asp Med* 2008, 29:103-111.
8. Wintermeyer P, Gerner P, Gehring S, Karimi A, Wirth S. Prevalence of hepatitis B Virus precore stop codon mutations in chronically infected children. *World J Gastroenterol* 2006; 12:2235-8.
9. Takahashi K, Aoyama K. The precore / core promoter mutant (T1762A1764) of hepatitis B virus : clinical significance and an easy method for detection. *J Gen virol* 1995;76 : 3159-3164.

10. Triki N, Said N, Ben Salah A, Arrouji A, Ben Ahmed F, Bouguerra A et al. Seroepidemiology of hepatitis B, C and delta viruses in Tunisia. *Transact Royal Soc Trop Med Hyg* 1997; 91 :11-14.
11. Ayed K, Gorgi Y, Ayed-Jendoubi S, Aouadi H, Sfar I, Najjar T. Hepatitis B virus genotypes and precore/core-promoter mutations in Tunisian patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Infect* 2007 ; 54 :291-297.
12. Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevila-Pico C et al. Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States. *Hepatology* 2003; 38:619-28.
13. Abbas Z, Muzaffar R, Siddiqui A, Naqvi SA, Rizvi SA. Genetic variability in the precore and core promoter regions of hepatitis B virus strains in Karachi. *BMC Gastroenterol* 2006; 6:20.
14. Hussain M, Chu CJ, Sablon E, Lok AS. Rapid and sensitive assays for determination of hepatitis B virus (HBV) genotypes and detection of HBV precore and core promoter variants. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3699-705.
15. Grandjacques C, Pradat P, Stuyver L, Chevallier M, Chevallier P, Pichoud C et al. Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B virus genome : correlation with viral persistence and disease severity. *J Hepatol* 2000; 33: 430-9.
16. Chen M, Sällberg M, Hughes J, Jones J, Guidotti LG, Chisari FV et al. Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. *J Virol* 2005 ; 79:3016-27.

intérêt du double test dans le Dépistage prénatal de la trisomie 21 : expérience du centre tunisien

H. CHAHED¹,
S. FERCHCHI¹,
Y. CHAABOUNTI¹,
N. SAAFI¹,
H. BEN LIMEM¹,
M. SAKOUHI²,
M. BERNARD³,
H. KHAIRI⁴,
S. LARADI¹,
A. MILED¹.

Résumé

Objectif : estimer le risque de la trisomie 21 en utilisant les marqueurs sériques maternels (AFP et HCG) au second trimestre chez toutes les femmes enceintes quelque soit leur âge.

Matériel et méthodes : 642 femmes enceintes (32,88 ± 14 ans) recrutées dans les services de maternité de Sousse et de Monastir avaient adhéré à notre étude.

Nous avons appliqué un dépistage séquentiel qui incluait la mesure de la clarté nucale, l'âge gestationnel, l'âge maternel et le dosage de deux marqueurs sérique (AFP et HCG) au deuxième trimestre. Le logiciel «Prenat interpretive software Maciel» avait été utilisé pour le calcul du risque.

Résultats : En fixant le risque seuil décidant ou non d'une amniocentèse à 1/250, une seule femme avait présenté un risque accru de trisomie 21 avec une valeur de 1/32, le caryotype proposé à cette femme avait confirmé l'existence de cette anomalie chromosomique. Ce même logiciel utilisé pour le dépistage de la trisomie 21 ; nous avait permis de détecter chez 3% des femmes un risque de défaut de fermeture de tube neural. 2,9% des femmes avaient présenté un taux faible de HCG, ce qui est en rapport avec une diminution de la viabilité fœtale.

Conclusion : A l'échelle nationale, il est souhaitable de généraliser le dépistage prénatal de la trisomie 21 à toutes les femmes enceintes quel que soit leur âge grâce à l'utilisation des marqueurs sériques. La diffusion de ce double test limitera l'utilisation des examens invasifs.

Mots clés : Trisomie 21 - Dépistage séquentiel - Marqueurs sériques maternels - alpha foetoprotéine, hormone gonadotrophine chorionique.

Sequential screening of trisomy 21 : experience of the center of Tunisia

Summary

Objective : To estimate the risk of trisomy 21 using maternal serum markers (AFP and HCG) in the second trimester for all pregnant women.

Material and methods : 642 pregnant women (32.88 ± 14 years) were recruited in the maternity units of Sousse and Monastir.

We applied a sequential screening that included measurement of nuchal translucency, gestational age, maternal age and the dosage of two serum markers (AFP and HCG) in the second trimester. The software "Prenat interpretive software Maciel" was used to calculate risk.

Results : Using the 1/250 cut off for this double test, only one woman has presented a high risk for Down's syndrome (1/32). The foetal karyotyping was performed and chromosomal abnormality was confirmed. The same sequential test allowed us to detect 3% of neural tube defects. In addition we found 2,9% of

¹ Laboratoire de biochimie
CHU Farhat Hached
Sousse - Tunisie.

² Service de maternité
CHU Fatouma Bourguiba
Monastir - Tunisie.

³ UF d'oncobiochimie
et biochimie prénatale,
groupe hospitalier Pitie-
Salpetrière, Paris.

⁴ Service de maternité
CHU Farhat Hached
Sousse - Tunisie.

cases with decrease of HCG demonstrating diminution of foetal viability.

Conclusion : Serum marker testing should be offered to all pregnant women, so invasive tests as amniocentesis will be avoided

Key words : Down's syndrome - sequential screening - Maternal serum markers - alpha fetoprotein - human chorionic gonadotropin.

Introduction

La trisomie 21 (tri 21) ou syndrome de Down est la plus fréquente des anomalies chromosomiques, elle constitue la première cause de retard mental. Sa prévalence est de 1/700 naissances, elle augmente significativement avec l'âge maternel surtout après 35 ans [1-3]. Le caryotype fœtal réalisé à partir du sang fœtal, des cellules amniotiques, ou villosités choriales constitue le diagnostic de certitude. Il est proposé aux femmes dont l'âge est supérieur à 38 ans. Toutefois, la naissance d'enfant atteint de tri 21 observée chez les jeunes remet en cause le critère âge maternel [4].

En France au début des années 90, la découverte de nouveaux marqueurs biochimiques dosables dans le sang entre 15 et 18 semaines d'aménorrhée (SA) a permis de généraliser une stratégie de dépistage qui permet de couvrir toutes les femmes enceintes indépendamment de leur âge.

Les modifications biochimiques observées chez une femme gestante porteuse d'un fœtus atteint de trisomie 21 se traduisent par une augmentation du taux de la fraction bêta libre de l'hormone chorionique gonadotrope (bêta HCG libre) et une diminution du taux de la -Pregnancy-Associated Plasma Protein A (PAPP-A) au cours du premier trimestre ; par contre au cours du deuxième trimestre, il y a une diminution du taux de l'alpha-foetoprotéine (AFP) et une augmentation du taux de l'hormone chorionique gonadotrope (HCG) [5-6].

Ainsi un risque intégré peut être calculé au second trimestre. Ce risque tient compte de l'âge de la patiente, de la mesure de la clarté nucale en fonction de la longueur craniocaudale de l'embryon lors de l'échographie du premier trimestre et du résultat des marqueurs biologiques (AFP, HCG) dosés au second trimestre (14 à 17 SA + 6 j). Si le risque est supérieur à 1/250, la femme gestante appar-

tient à un groupe à risque ce qui justifie l'amniocentèse [7]. Le but de ce travail est d'estimer le risque de la trisomie 21 en utilisant les marqueurs sériques maternels au second trimestre chez toutes les femmes enceintes quelque soit leur âge.

Matériel et méthodes

Il s'agissait d'une étude prospective préliminaire qui s'était déroulée dans le service de Biochimie du CHU Farhat Hached de Sousse en collaboration avec les Centres de maternité du CHU Farhat Hached de Sousse et du CHU Fattouma Bourguiba de Monastir, la période d'étude était du 1^{er} avril 2006 jusqu'au 30 juin 2009.

Population d'étude

Notre étude avait concerné 642 femmes enceintes de race blanche qui étaient suivies dans les deux centres de maternité déjà cités. Elles avaient un âge gestationnel qui variait de 14 SA + 0 jours à 17 SA + 6 jours.

L'âge gestationnel avait été déterminé par la date des dernières règles et par échographie précoce en mesurant la clarté nucale en fonction de la longueur craniocaudale de l'embryon (de 45 à 84 mm) entre 11 + 0 SA et 13 + 6 SA. Toutes les femmes gestantes étaient consentantes.

Un formulaire de la demande délivrée à chaque patiente avait été rempli de façon rigoureuse par les médecins et contenait des informations concernant la femme gestante (la date de naissance exacte, son poids en kg, sa taille en cm, la date des dernières règles, si elle était diabétique ou tabagique).

Elles avaient été exclues de l'étude les femmes gestantes qui présentaient un âge gestationnel supérieur à 18 SA, et celles qui présentaient une grossesse gémellaire ou multiple car il n'y avait pas suffisamment d'études

randomisées prospectives publiées dans la littérature. Toutes les femmes gestantes ayant accepté de participer à l'étude avaient été informées d'une part sur le caractère de cette anomalie chromosomique et les moyens actuels utilisés pour le dépistage. D'autre part, Elles avaient été aussi informées du fait que le test proposé dans notre protocole permettait un calcul de risque et non pas un diagnostic. Pour connaître l'issue des grossesses, nous avons consulté les dossiers médicaux des femmes gestantes qui avaient accepté d'adhérer à notre protocole après l'accouchement.

Prélèvements - dosages

Le terme des prélèvements sériques maternels était compris entre 14 SA + 0 jours et 17 SA + 6 jours. Les sérums non dosés le jour même avaient été congelés à - 20 °C en attente du dosage.

- AFP

C'est le premier marqueur utilisé par la quasi-totalité des laboratoires, son dosage est fiable et connu depuis longtemps [5]. Il avait été dosé par la technique immuno-enzymatique microparticulaire (MEIA) en se servant de l'automate AxSYM- ABBOT. La gamme d'étalonnage s'étendait de 0 à 350 ng/ml. Les coefficients de variation (CV) étaient les suivants : 9,7% (pour les valeurs basses), 6,8% (pour les valeurs moyennes), et 5,2% (pour les valeurs élevées).

- HCG

Elle avait été choisie pour sa fiabilité et sa stabilité dans [6]. La technique immuno-enzymatique microparticulaire (MEIA) avait été appliquée sur l'automate AxSYM - ABBOTT. La gamme d'étalonnage s'étendait de 0 à 100 UI/l, et les sérums étaient préalablement dilués au 1/100. Les coefficients de variation (CV) étaient les suivants : 7,2% (pour les valeurs basses), 5,6% (pour les valeurs moyennes), et 6,6% (pour les valeurs élevées).

- Expression des résultats de la HCG et de l'AFP :

Les valeurs brutes de chaque marqueur étaient transformées en MoM (multiple de la médiane) à l'aide du logiciel «Prenat interpretive software Maciel». Ce logiciel était commercialisé par les laboratoires ABBOTT et il était disponible au service de Biochimie du CHU Farhat Hached de Sousse. Il avait été validé par l'agence du

médicament en France.

La méthode statistique utilisée par ce logiciel pour évaluer le risque individuel est le «rapport de vraisemblance» ou «likelihood ratio» proposé par Wald et al [8]. Par ailleurs, ce logiciel intégrait dans le calcul du risque les facteurs influençant le dosage des marqueurs sériques (l'état diabétique, le poids de la femme gestante, le tabagisme).

Résultats

• Caractéristiques de la population étudiée :

Age maternel :

Les 642 femmes gestantes recrutées dans notre étude avaient un âge qui variait entre 19 et 49 ans, soit un âge moyen de $32,88 \pm 14$ ans. Les femmes qui avaient un âge supérieur à 38 ans représentaient 12,5%.

Nous avons trouvé une relation croissante entre l'augmentation du risque de trisomie 21 et celle de l'âge maternel (Figure 1).

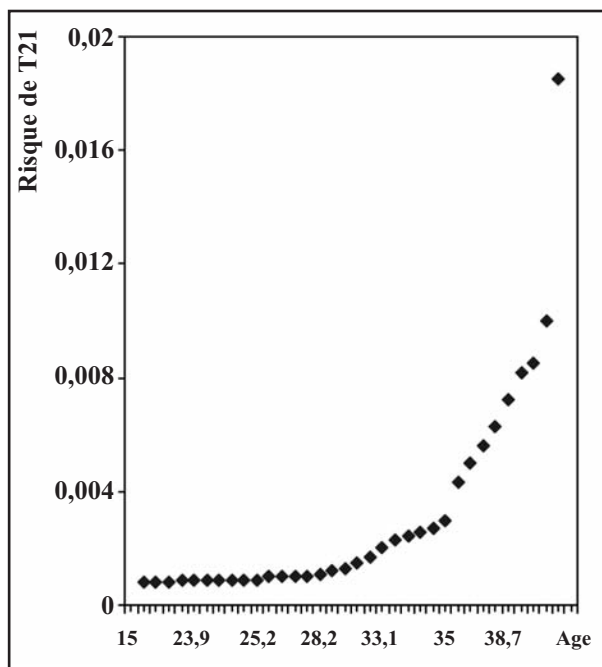


Figure 1 : Risque de trisomie 21 en fonction de l'âge maternel.

Poids maternel :

Le poids moyen était de $67,55 \pm 12,31$ Kg. Seulement 6,7% des femmes gestantes avaient un poids $>$ à 80 kg, ce qui a nécessité une correction de la valeur des marqueurs par le logiciel lors du calcul du risque.

Tabagisme :

Seulement 1,9% des femmes consommaient du tabac.

Présence de diabète

3% des femmes étaient diabétiques,

Antécédents d'anomalie chromosomique :

Sept femmes gestantes de notre étude (1,09%) avaient donné naissance au cours des grossesses précédentes à un enfant porteur d'une anomalie chromosomique.

Seulement deux femmes gestantes étaient porteuses d'une anomalie chromosomique connue au moment de leur recrutement, une avait un syndrome de Turner en mosaïque faible, l'autre présentait une translocation équilibrée.

• Résultats de mesure de la clarté nucale :

Dans notre étude, les valeurs de la mesure de la clarté nucale varient de 1,3 mm à 5,2 mm avec une moyenne de $2,7 \pm 1,4$ mm.

• Résultats du dosage des marqueurs sériques

- Dans notre étude, 2,9% des femmes gestantes avaient présenté un taux sérique très bas de HCG ($< 0,3$ MoM), reflétant une diminution de la viabilité fœtale.

- Le risque d'un défaut de fermeture du tube neural a été détecté chez 3% des femmes gestantes et ceci pour des taux sériques d'AFP élevés ($\geq 2,5$ MoM).

- Pour un risque supérieur ou égal à 1/250, 65 des femmes gestantes (soit 10%) avaient appartenu à un groupe à risque accru de trisomie 21, et pour chacune d'elle une amniocentèse avait été indiquée.

- Selon le tableau 1, la nécessité d'une amniocentèse varie de 7% chez les femmes les plus jeunes à 45% chez les femmes gestantes âgées de plus de 38 ans.

- Parmi les femmes chez lesquelles une amniocentèse avait été indiquée, seulement 10 (soit 15%) avaient accepté de faire cet examen.

- Parmi les 642 femmes gestantes recrutées dans notre étude, nous avons pu savoir l'issue de la grossesse chez

uniquement 187 femmes. Parmi ces dernières se trouvaient les 65 femmes qui présentaient un risque supérieur ou égal à 1/250.

- En appliquant ce double test, un seul cas de trisomie 21 avait été dépisté chez une femme âgée de 36 ans avec un risque calculé de 1/32. La confirmation diagnostique avait été faite par l'étude du caryotype après amniocentèse.

Discussion

En Tunisie, le dépistage prénatal de la trisomie 21 repose sur l'étude du caryotype fœtal réalisé à partir d'un prélèvement de villosités chorales, des cellules amniotiques ou du sang fœtal [3, 9]. Il est proposé aux femmes enceintes âgées de plus de 38 ans, âge auquel le risque de trisomie 21 est supérieur ou égal à 1/200, l'existence des anomalies chromosomiques lors d'une grossesse antérieure ou chez l'un des deux parents

Cette politique de santé est insuffisante car elle ne permet pas de couvrir tous les âges maternels en particulier les mères âgées de moins de 38 ans, avec risque d'avortement estimé à 1% lié à l'amniocentèse [10].

Notre étude préliminaire pour le dépistage prénatal de la trisomie 21 au second trimestre en Tunisie repose sur le calcul d'un risque séquentiel en combinant l'âge maternel, l'âge gestationnel la mesure de la clarté nucale (11-13 SA + 6 jours) et le dosage de deux marqueurs sériques (HCG, AFP) au second trimestre (4 à 17 SA + 6 j) pour cibler les femmes enceintes à haut risque.

par conséquent, un seul cas de trisomie 21 a été détecté avec un risque calculé de 1/32 chez une femme âgée de 36 ans.

Dans la littérature, le taux de détection de trisomie 21 est de 60% pour un taux de faux positif de 5% [11]. Cette différence est liée au fait que notre étude est préliminaire, et devra être validée sur un effectif plus grand pour pouvoir comparer nos résultats aux équipes françaises, britanniques et américaines [12].

Notre étude avait révélé la présence de femmes tabagiques, des femmes diabétiques, rappelons que le poids maternel, l'origine ethnique, le tabagisme, le diabète sont des facteurs qui influencent la distribution des

marqueurs sériques et par la suite peuvent influencer les performances de ce test de dépistage [13].

C'est par l'intermédiaire de ce double test que nous avons décelé des fœtus qui présentaient un risque potentiel de défaut de fermeture du tube neural, et des cas de mort fœtale. Nos résultats étaient cohérents avec ce qui avait été décrit dans la littérature et confirme la double utilité de ce test de dépistage [14].

Le dépistage utilisant ce double test (AFP, HCG) était utilisé par 75% des laboratoires français depuis 1997, date à laquelle le dépistage par dosage des marqueurs sériques dans le sang maternel entre 14 - 18 SA avait été encadré par des décisions politiques [15-16].

Mais vue le caractère tardif du dépistage par les marqueurs sériques au second trimestre, en 2007, la Haute Autorité de santé (HAS) recommande de proposer aux femmes enceintes un dépistage combiné du premier trimestre de la grossesse, réalisé entre 11 + 0 et 13 + 6 semaines d'aménorrhée, associant mesure de la clarté nucale et le dosage des marqueurs sériques du premier trimestre. Ces marqueurs sont la PAPP-A qui diminue en

cas de grossesse trisomique, et la fraction β libre de HCG qui augmente aussi chez les femmes gestantes porteuses d'un fœtus atteint [17-19].

En 2007, l'American College of Obstetricians and Gynecologists et la Society for Maternal Fetal Medicine avaient recommandé également la mesure de la clarté nucale et le dosage des marqueurs sériques du premier trimestre pour le dépistage de la trisomie 21 [20].

En outre, les données de la littérature ont prouvé les performances du dépistage combiné du premier trimestre en appliquant des critères de qualité clairement établis pour assurer la validité de ces examens [21].

Ainsi, l'Arrêté du 23 juin 2009 a fixé les règles de bonnes pratiques en matière de dépistage et de diagnostic prénatal de la trisomie 21, et le dépistage combiné du premier trimestre devient la norme en France [17].

Avec la diversité des méthodes de dépistage, différents logiciels calculant un risque en combinant les données de l'échographie du premier trimestre, des marqueurs sériques et l'âge ont été mis au point, ce qui facilite la généralisation du dépistage.

Tableau 1: Variation du nombre d'amniocentèse chez les femmes gestantes

Age maternel	Fréquence relative des femmes gestantes	Fréquence relative d'amniocentèse indiquée
< 30 ans	55%	7%
30-35 ans	5%	11%
35-37 ans	23%	37%
> 38 ans	17%	45%

Conclusion

Un dépistage séquentiel associant l'âge maternel, la mesure de la clarté nucale par échographie au premier trimestre et le dosage des marqueurs sériques (AFP et HCG) au deuxième trimestre constitue la stratégie que nous avons opté pour dépister les femmes enceintes ayant un risque accru de trisomie 21. Il ne s'agit en aucun cas de diagnostiquer la trisomie 21.

La formation d'un réseau de professionnels qui regroupe échographistes, biologistes, sages-femmes, gynéco-

logues obstétriciens, ou médecins généralistes qui suivent des grossesses, contribue à l'amélioration des prestations qui seront rendues aux femmes enceintes.

Références bibliographiques

1. NIVELON-CHEVALIER A. Trisomie 21 : Epidémiologie, diagnostic, pronostic. Rev Prat 1995, 45 (166) : 217-23.
2. GAY C. Trisomie 21 : Epidémiologie, diagnostic, évolution. Rev Prat 1998, 48 : 999-1002.

3. CHAABOUNI H, SAMAOUI N, NAAZOUL F, BENJEMAAL L. Etude épidémiologique et génétique de la trisomie 21 en Tunisie. *Tuni Méd* 1999, 77 : 407-14.
4. MACRI J.N, SPENCER K, GARVER K, BUSHAMAN D. Maternal serum free beta HCG screening : results of studies including 480 cases of Down's syndrome. *Prenat Diag* 1994, 14 : 97-103.
5. BOGART M, PANDIAN M.R, JONES W.O. Abnormal maternal serum chorionic gonadotrophin levels in pregnancy with fetal chromosome abnormalities. *Prenat Diag* 1987, 7: 626-30.
6. BRAMBATI B, TULUI L, BONACCHI I, SHRIMARKER K. Serum PAPP-A and free beta HCG are first trimester screening markers of Down's syndrome. *Prenat Diag*, 1994, 14 (11) : 1043-47.
7. MULLER F. Marqueurs sériques maternels de la trisomie 21 foetale. *Annal Biol Clin* 2002, 60 (6) : 689-92.
8. WALD NJ, CUCKLE HS, DENSEM JW et al. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *BMJ* 1988; 297: 883-87.
9. BERNARD J.P. Controverse : amniocentèse systématique pour les femmes de 38 ans et plus ? *Gynecol Obstet Fertil*, 2000, 28 : 765-71.
10. DE PARSCAU L. Trisomie 21 : épidémiologie, diagnostic, évolution. *Rev Prat* 2001, 51 : 545-49.
11. MULLER F, FORESTIER F, DINGEON B, ABA STUDY GROUP. Second trimestre trisomy 21 maternal serum marker screening results of a countrywide study of 854902 patients. *Prenat Diagn* 2002, 22 : 925-26.
12. BEAMEN J.M, GOLDIE D.J. Second trimester screening for Down syndrome seven years experience. *J Med Screen* 2001, 8 (3) : 128-31.
13. CROSSLEY J.A, AITKEN D.A, WAUGH S.M, KELLY T. Maternal smoking, age distribution, levels of alpha fetoprotein and human chorionic gonadotrophin and effect on detection of Down's syndrome pregnancies in second trimester screening. *Prenat Diag* 2002, 22 (3): 247-55.
14. GAGNON A, WILSON RD, AUDIBERT F, ALLEN VM, BLIGHT C, BROCK JA, DÉSILETS VA, JOHNSON JA, LANGLOIS S, SUMMERS A, WYATT P ; Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada Genetics Committee. Obstetrical complications associated with abnormal maternal serum markers analytes. *J Obstet Gynaecol Can.* 2008 Oct; 30(10):918-49.
15. MULLER F. Dépistage de la trisomie 21 par les marqueurs sériques. *EMC - Gynécol Obstet* 2005, 2 : 209-16.
16. DINGEON B, LEBRUN C, DOCHE C. Modernizing trisomy 21 screening in France. *Press Med.* 2007 Jan; 36:5-7.
17. <http://www.has-sante.fr>
18. SPENCER K, SOUTER V, TUL N et al. A screening program for trisomy 21 at 10-14weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 1999; 13 : 231-7.
19. NICOLAIDES KH, SPENCER K, AVGIDOU K et al. Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two stage first-trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2005; 25: 221-6.
20. BAHADO-SINGH R, DRISCOLL D, American College of Obstetricians and Gynecologists, Society for Maternal-Fetal Medicine. ACOG Practice Bulletin n° 77. Clinical management guidelines for obstetricians-gynecologists. Screening for fetal chromosomal abnormalities. *Obstet Gynecol* 2007; 109: 217-27.
21. KAGAN KO, WRIGHT D, BAKER A et al. Screening for trisomy 21 by maternal age, fetal nuchal translucency thickness, free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2008; 31: 618-24.

Les erreurs en biochimie clinique

F. NEFFATI,
I. HELLARA,
W. DOUKI,
A. BEN AMOR,
M. F. NAJJAR

Résumé : L'accréditation des laboratoires de biologie médicale passe par la réalisation de plusieurs actions nécessaires au maintien d'une bonne qualité des analyses rendues.

La bonne réalisation de ces analyses passe par l'existence d'équipements adéquats et nécessaires, de méthodes adaptées et contrôlées et de compétences habilitées en ressources humaines.

Un bon contrôle interne de qualité n'est plus suffisant pour garantir des résultats fiables. Les deux autres phases du processus analytique principal, la phase pré-analytique et la phase post-analytique, interviennent aussi dans la qualité totale.

La maîtrise des erreurs relatives à chaque phase impose aux biologistes leurs connaissances et celle des actions correctives et préventives nécessaires à leur minimisation maximale.

Mots-clés : Erreurs, pré-analytique, analytique, post-analytique.

Errors in clinical biochemistry

Summary : Accreditation of medical laboratories through the implementation of several actions needed to maintain a good quality of the analysis.

The successful completion of these tests requires the existence of adequate facilities and equipments, suitable and controlled methods and qualified human resources skills.

A good internal quality control is no longer sufficient to ensure reliable results. The other two main analytical phases of the process, the pre-analytical and post-analytical phases, are also involved in total quality.

The mastery of errors for each phase requires, from biologists, their knowledge and the corrective and preventive actions and measures to minimize them.

Key words : Errors, pre-analytic, analytic, post-analytic.

Laboratoire de biochimie-
toxicologie.
Hôpital Universitaire de
Monastir - 5000 Monastir

Introduction

L'analyse biologique est constituée d'une série d'étapes interdépendantes les unes des autres : une étape d'analyse proprement dite, précédée d'une phase pré-analytique dont l'acteur principal est le prélèvement et suivie d'une phase post analytique s'articulant autour du résultat.

Chaque phase constitue à elle seule une source majeure d'erreurs. L'assurance qualité a pour objectif de lutter contre ces erreurs afin de les annuler ou à défaut de les maintenir dans des limites acceptables.

Cette démarche nécessite la connaissance des différentes étapes de chaque phase et l'identification des sources potentielles d'erreurs.

Si la phase pré-analytique représente en moyenne 57% du temps alloué à la réalisation de la demande (20% hors laboratoire et 37% dans le laboratoire), elle est à l'origine de 85% des erreurs, les phases analytiques et post-analytiques étant à l'origine respectivement de 4 et de 11% des erreurs, pour des volumes horaires respectifs de 25 et 18%, et il est important de les maîtriser pour bien gérer les non conformités (8,13,29,32).

Cette approche rentre dans le cadre global aussi bien des normes internationales relatives à la qualité, que des référentiels règlementaires nationaux (7,10,11,19,23).

LES ERREURS DE LA PHASE PREANALYTIQUE (2,4,6,12,14,15,16,20,28,33)

La phase pré-analytique est définie par une série d'étapes commençant chronologiquement par la prescription des analyses par le clinicien et comprenant la demande d'analyse, la préparation du patient, le prélèvement et l'étiquetage du spécimen, le transport et l'acheminement du prélèvement jusqu'au laboratoire et aux postes de travail, la préparation de l'échantillon à analyser et sa conservation éventuelle, et finissant au début de la phase analytique.

Les erreurs de la phase pré-analytique comprennent celles liées à la prescription de la demande d'analyse, celles liées à la préparation du patient et celles relatives aux prélèvements.

La prescription

La demande d'analyse peut être illisible à cause d'une mauvaise écriture. Dans ce cas, la généralisation de l'informatisation aux différents postes et principalement au niveau de la prescription peut résoudre le problème. La demande d'analyse peut également comporter une fausse transcription de l'analyse ou une analyse erronée. La coordination entre le laboratoire et les services de soins, ainsi que le maintien d'un flux continu d'informations et de sensibilisation avec les services cliniques, sont fortement recommandés pour limiter le nombre de ces erreurs, et ces échanges d'informations doivent être aussi conduits entre les biologistes de libre pratique et les prescripteurs aussi.

La préparation du patient

Certaines analyses nécessitent une position particulière parce que le passage d'une position à une autre s'accompagne d'une variation importante du paramètre étudié. De plus, les valeurs de référence sont établies selon une position bien déterminée. L'exemple type de

ces paramètres est l'aldostérone qui varie selon la position du patient. Il faut donc informer tout le personnel préleveur, aussi bien des services cliniques et que des salles de prélèvement, de toutes les recommandations nécessaires, et ceci pour une interprétation adéquate des résultats.

Il faut aussi standardiser la préparation des patients, en équipant les salles de prélèvement d'un nombre suffisant de chaises assurant un temps minimum de repos, nécessaire avant le prélèvement.

Pour les paramètres ayant un rythme biologique, le moment du prélèvement est important : c'est le cas du cortisol ou de l'ACTH qui présentent un cycle nyctéméral, ou encore de toutes les hormones participant au cycle menstruel de la femme pour lesquelles le prélèvement doit se faire entre J3 et J4 du cycle.

Il faut également vérifier qu'un jeûne de 10h au minimum a été respecté par le patient, notamment pour le bilan lipidique et s'il y a une notion de prise de médicaments qu'il faudrait préciser.

Le prélèvement

Les erreurs rencontrées lors du prélèvement proprement dit peuvent se résumer en un mauvais choix du récipient ou du milieu biologique : sérum, plasma, urines fraîches, urines des 24 heures,... De plus, pour un récipient et un milieu corrects, les proportions anticoagulant/sang, ou les modalités de prélèvement sang artériel/veineux (pour la détermination des gaz du sang), peuvent ne pas être respectées et causer des erreurs.

Lors de la réalisation de la ponction veineuse, il ne faut pas trop serrer le garrot, ni le poser longtemps, ce qui peut modifier certains paramètres (acide lactique, K⁺,...). La durée optimale est d'une minute : ainsi, après six minutes de pose du garrot, la CK augmente de 10%, les protéines de 8 à 10% et la kaliémie de 0,8 mmol/L. De plus, le risque d'hémolyse augmente, ce qui entraînerait l'augmentation des activités enzymatiques des transaminases et de la LDH, du potassium et du magnésium.

Il y a aussi l'ordre des tubes à prélever qui devrait être connu par tous les préleveurs, en particulier pour les analyses relatives à l'hémostase.

Une bonne information du personnel, une planification

de cycles de formation continue, une charge de travail convenable et une mise à la disposition du personnel d'un système documentaire, peuvent constituer des solutions à ces problèmes de prélèvement.

L'identification

Le préleveur devrait en premier lieu, au moment du prélèvement, s'assurer de l'identité réelle du prélevé.

Elle doit se faire dans les mêmes conditions (temps et espace) que la ponction pour éviter une mauvaise identification entraînant une inversion de tubes ou un étiquetage non conforme à l'analyse prescrite.

Un étiquetage illisible ou labile peut se rencontrer, l'identification par code à barres diminue ce problème en collant la même étiquette sur la demande et sur l'échantillon biologique.

Le transport

Si le prélèvement n'est pas réalisé au sein du laboratoire, son acheminement jusqu'au lieu de l'analyse peut constituer une source d'erreurs : délais inappropriés d'arrivée des échantillons au laboratoire, non respect des règles d'hygiène et de sécurité, température et milieu de transport non respectés,... Dans ce cas, les actions correctives peuvent porter sur l'indication de l'heure de prélèvement sur la demande d'analyse, l'élaboration de procédures écrites précisant les règles de sécurité et enfin l'information du personnel à propos des températures et des milieux appropriés pour certaines analyses.

La réception

Dès son arrivée au laboratoire, le prélèvement et la demande d'analyse doivent être validés avant leur acheminement aux salles d'analyse. Parmi les difficultés rencontrées lors de la réception du prélèvement, on peut citer un étiquetage illisible ou non conforme entre le tube de prélèvement et la demande. L'informatisation et l'installation d'un système d'identification à code à barres constituent la solution la mieux appropriée pour résoudre ce problème.

De plus, nous pouvons avoir un prélèvement non étiqueté ou une demande sans précision de la nature du

prélèvement surtout pour les liquides rarement analysés tels que les liquides de ponction, de drain, d'ascite, d'épanchement pleural ou de genou (liquide synovial). Dans ce cas, il faut insister sur la sensibilisation du personnel chargé du prélèvement concernant l'identification adéquate des prélèvements.

Le traitement pré-analytique

Certains prélèvements nécessitent un traitement pré-analytique : centrifugation, extraction, concentration,... Pour éviter d'éventuelles erreurs au cours de cette étape, il est préconisé de mettre à la disposition du personnel des procédures, des instructions et des modes opératoires écrits précisant la durée, la température et la vitesse de centrifugation ainsi que la nature du solvant d'extraction et du support de concentration.

La conservation

Pour les analyses différées, celles à sous-traiter ou celles soumises à une réglementation particulière, des procédures écrites fixant la température optimale, la durée maximale et les conditions de conservation (obscurité, durée, identification,...) sont indispensables.

LES ERREURS DE LA PHASE POST-ANALYTIQUE (1,8,9,33)

La phase post analytique est définie par l'ensemble des étapes qui suivent l'analyse jusqu'à la transmission des résultats au prescripteur. Elle comprend la validation technique et biologique (qui peut faire partie de la phase analytique selon les auteurs), l'enregistrement des résultats et si nécessaire, l'adjonction de commentaires sur la qualité du prélèvement et/ou sur le résultat et enfin la transmission des résultats aux prescripteurs.

Toutes ces étapes peuvent constituer des sources potentielles d'erreurs. Lors de la transcription, on peut assister à une inversion des résultats ou à une confusion des termes (urée/urates,...) ; c'est pour cela que la relecture des résultats écrits est fortement recommandée avant leur transmission, sans oublier que l'informatisation réduit considérablement les erreurs de la phase post-analytique.

Pour l'expression des résultats, il faut utiliser les unités du système international et se référer aux tables de conversion pour éviter un facteur de mesure erroné.

LES ERREURS DE LA PHASE ANALYTIQUE

La biologie clinique n'étant pas une science exacte, toute analyse est entachée d'erreurs qu'il faudrait donc enlever ou à défaut minimiser à l'extrême et les maintenir dans des limites les plus basses possibles.

L'idéal de la phase analytique serait donc un état le plus proche possible de ce «parfait» avec une distribution très homogène des différentes valeurs mesurées et une dispersion extrêmement faible autour d'une «valeur vraie» appelée aussi «valeur cible X_0 ».

L'erreur totale d'une mesure est donc la différence entre le résultat obtenu et la valeur conventionnellement vraie, et elle est constituée d'une composante d'erreurs aléatoires et d'une composante d'erreurs systématiques.

Si nous représentons le manipulateur en biochimie comme un tireur, et la valeur cible du paramètre à doser comme le centre d'une cible de tir, une manipulation parfaite donnera des impacts de tirs bien regroupés (les dosages et les tirs sont précis) et en même temps très proches du centre de la cible (les dosages et les tirs sont exacts). La représentation de la distribution statistique donnera le graphique de la figure 1a.

1- NOTIONS SUR LA PRECISION ET L'EXACTITUDE

La Précision analytique

C'est la qualité de l'accord, dans une zone définie de valeurs à mesurer, entre des mesures répétées, effectuées sur un même échantillon, dans des conditions constantes et déterminées. Elle est évaluée par l'écart-type (S) et le coefficient de variation (CV%). Plus l'écart-type est faible, plus le CV% est faible et plus la précision est grande.

Moyenne m
$$m = \frac{\sum x_i}{n}$$

Si $n > 30$, l'écart-type S est déterminé par
$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - m)^2}{n - 1}}$$

Si $n < 30$, l'écart-type S est déterminé par
$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - m)^2}{n}}$$

Le coefficient de variation CV% est calculé comme suit
$$CV\% = 100 \frac{S}{m}$$

Cette précision est mesurée de deux façons :

La répétabilité : c'est l'expression de la précision lorsque le même opérateur réalise la technique sur le même échantillon, au même moment, dans le même laboratoire, avec les mêmes réactifs, sur les mêmes appareils de mesure et dans la même série d'analyse. Elle renseigne sur la stabilité de la méthode et sur l'habileté de l'opérateur.

La reproductibilité : c'est l'expression de la précision lorsque la même méthode utilisée est appliquée dans diverses conditions bien définies sur le même échantillon, les variables étant l'opérateur, la série et l'appareil de mesure :

- Lorsqu'on se trouve au même laboratoire, c'est la *reproductibilité intralaboratoire*, c'est le contrôle interne de qualité (CIQ). Dans la même série, c'est la reproductibilité intra série et dans des séries différentes, c'est la reproductibilité inter séries.

- Lorsqu'on se trouve dans différents laboratoires, c'est la *reproductibilité interlaboratoire* : c'est l'évaluation externe de la qualité (EEQ).

L'exactitude analytique

C'est la qualité de l'accord entre l'estimation d'une propriété mesurable (valeur mesurée) et la valeur «vraie» ou «cible» ou X_0 . Elle est évaluée par le coefficient d'exactitude (CE%). Plus la valeur mesurée est proche de la valeur «vraie», plus le CE% est faible et plus l'exactitude est grande. L'exactitude est désignée par la justesse lorsque la valeur «vraie» est rattachée à un matériau de référence.

$$CE\% = 100 \frac{|X_0 - m|}{X_0}$$

2- LES ERREURS ALEATOIRES ET LES LIMITES D'ACCEPTABILITE (3,5,17,18, 22, 25-27,30,31)

Elles sont appelées aussi «erreurs fortuites». Elles sont inévitables fondamentalement et sont acceptables dans les limites d'acceptabilité préconisées par les sociétés savantes (IFCC, SFBC, DGKC, ...). Elles sont inhérentes à l'opérateur (qualité du travail, qualité du pipetage, habileté technique,...) et à la qualité des équipements utilisés (micropipettes, stabilité des spectrophotomètre,...). Elles sont minimisées par l'automatisation (uniformisation des gestes et des prises d'essai, lecture automatisée) et elles sont évaluées par l'écart-type des valeurs trouvées et expriment le degré de précision. Plus l'écart-type de distribution est faible, plus la précision est grande et plus les erreurs fortuites sont grandes, plus la précision est faible.

L'exemple du tireur face à sa cible montre que les tirs sont tous dans la cible (exacts), mais sont dispersés de façon plus large que dans le cas idéal (imprécis) (figure 1b). Plus la dispersion est grande, plus la précision est faible et il faut augmenter le score du tireur en «rectifiant» les tirs pour améliorer la précision.

Les limites d'acceptabilité sont importantes à connaître et doivent figurer dans les procédures de contrôle de qualité. Elles permettent de définir les qualités souhaitables d'une technique d'analyse. Le choix des méthodes optimisées incombe au biologiste qui doit utiliser les méthodes reconnues par la communauté scientifique internationale ou validées par lui-même.

L'erreur totale (ET) peut être considérée comme "un cahier de charge analytique" et évaluée comme suit :

$$ET = \text{Reproductibilité}^2 + \text{Exactitude}^2$$

Les limites sont définies pour chaque analyte en fonction :

- de l'état de l'art, c'est-à-dire de l'état le plus performant actuel des connaissances scientifiques (techniques, automates,...) ;
- des variations biologiques, autrement dit des variations

des valeurs selon l'état physiologique des personnes (enfants, âgés, adultes, hommes, femmes, grossesse,...) ;

- des besoins de l'interprétation clinique, certains paramètres imposent des variations plus faibles du fait de leur importance clinique ou de leur étroite variation physiologique (Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, cholestérol,...).

Ces limites servent aussi à toute la communauté scientifique :

- aux biologistes, pour la validation des performances.
- aux organismes compétents, pour les expertises et la validation de nouveaux systèmes analytiques.
- aux industriels, au cours des différentes phases de développement de nouveaux produits à visée diagnostique.

La variabilité des résultats inclut divers facteurs :

- pré-analytiques concernant le choix des techniques, le stockage, les prétraitements,...;
- analytiques en particulier la précision (reproductibilité et répétabilité) et l'exactitude ;
- biologiques et physiologiques, intra- et/ou interindividuels.

Les normes d'acceptabilité varient et s'expriment donc par:

- les limites d'erreurs de reproductibilité
- les limites d'erreurs de justesse
- les limites d'erreurs d'exactitude

Les différentes approches des limites d'acceptabilité sont :

- l'intervalle des valeurs de référence (analytiques et interindividuelles). Les limites tolérables d'erreurs (LTE) (2 CV analytiques) doivent être inférieurs à : qui, pour l'exemple du calcium, donne une valeur de 3% ;
- les variations biologiques inter et intra-individuelles ;
- l'opinion des cliniciens sur le paramètre concerné ;
- l'état de l'art.

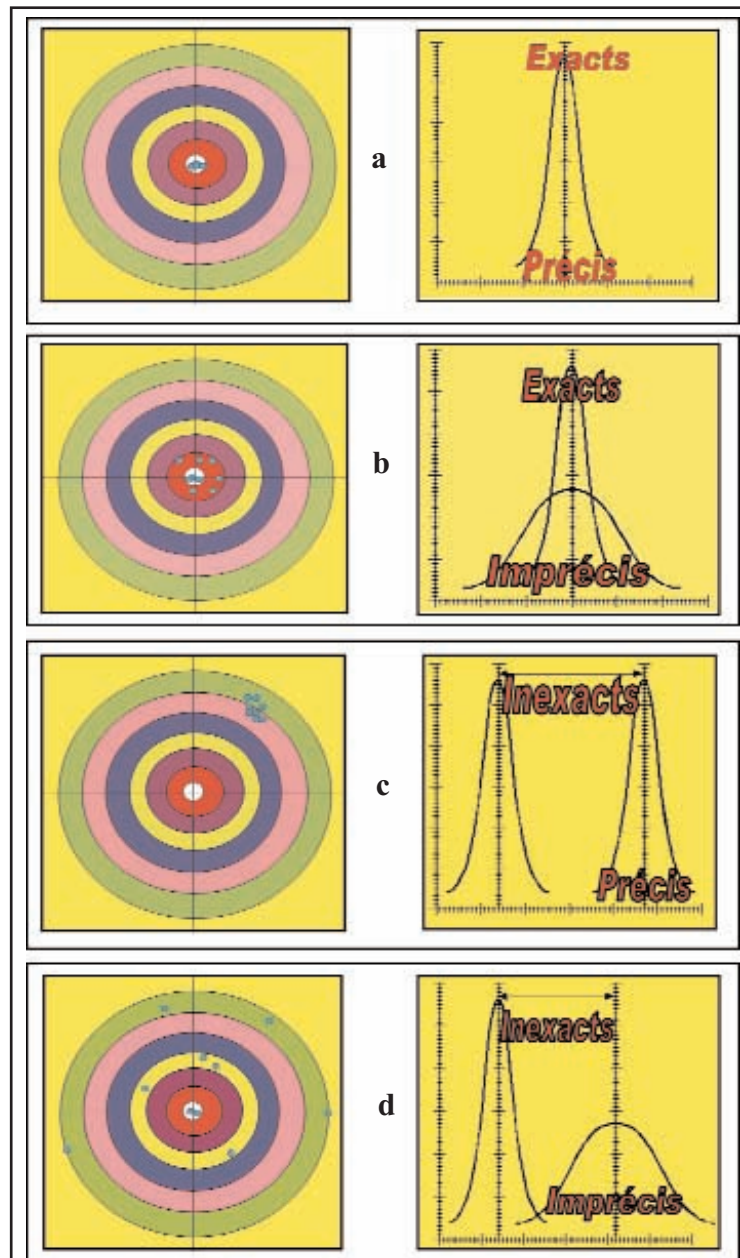
$$LTE = \frac{1/4 \text{ intervalle de référence}}{\text{Moyenne de l'intervalle de référence}} \times 100$$

Le tableau I résume les limites d'acceptabilité de certains paramètres selon des sociétés savantes.

3- LES ERREURS SYSTEMATIQUES (17,18,21,25,27,31)

Elles sont dénommées aussi «erreurs fixes». Elles font

Figure 1 : Représentation graphique des différents types d'erreurs



- a : Les tirs (Les dosages) sont précis et exacts
- b : Les tirs (les analyses) sont exacts mais peu précis. La moyenne m est très proche de X_0 , mais l'écart-type est plus grand
- c : Les tirs (les analyses) sont précis mais inexacts. La moyenne m est éloignée de X_0 mais avec un même écart-type
- d : Les tirs (les analyses) sont imprécis et inexacts. La moyenne m est éloignée de X_0 et avec un grand écart-type

Tableau I : Exemples de limites d'acceptabilité (%) selon quelques sociétés savantes (25,26,27,31)

Paramètres	Reproductibilité	Justesse	Erreur totale
Glucose	2,4/2,9	2,2/4,4	5,0/6,9/10
Sodium	0,4/1,1	0,3/1,4	0,9/1,8/9,0
Potassium	1,6/2,4	1,8/3,1	3,5/5,8/9,0
Chlorure	0,6/1,6	0,5/1,9	1,5/2,5/9,0
Calcium total	1,0/1,6	0,8/1,7	2,3/2,4/12,0
Créatinine	2,2/2,7/4,5	3,4/3,8/7,8	6,9/8,2/9,0/20,0
Acide urique	3,2/4,5	4,9/6,2	7,0/12,4/15,0
Triglycérides	4,8/10,5	6,4/10,7	8,0/20,0/27,9
Cholestérol	2,7/4,0	4,0/5,7	7,0/8,5/10,0
ALAT	6,0/12,1	6,7/12,0	9,0/21,0/32,0
ASAT	6,0/6,0	5,4/6,7	9,0/15,2/21,0

Les valeurs représentent les % selon les références citées

dévier les résultats vers des valeurs par défaut ou par excès par rapport à la valeur cible et sont liées à la qualité des réactifs (instabilité, dégradation), des étalons (surdosés, sous-dosés ou altérés) et à la linéarité de la réponse des appareils (linéarité photométrique) ou encore à leurs dérives électroniques. Elles sont plus fréquentes avec l'automatisation (dérives, étalonnage en mémoire, vieillissement des lampes,...) et peuvent être évitées grâce à un contrôle régulier et à une maintenance correcte des équipements. Elles sont évaluées par l'écart entre la valeur mesurée et la valeur cible et par le coefficient d'exactitude. Plus le coefficient est faible, meilleure est l'exactitude. Plus les erreurs systématiques sont grandes, plus l'écart par rapport à la valeur cible est grand et plus l'exactitude est faible.

L'exemple du tireur montre que les tirs sont bien regroupés (précis) mais tous déviés par rapport au centre de la cible d'autant plus que l'exactitude est faible (inexact) (figure 1c). Ces erreurs entraînent des déviations parfois graves vers des valeurs faibles ou élevées. La correction se fait par «ajustement» des tirs pour améliorer l'exactitude. L'inexactitude peut être fixe (erreur constante indépendante de la concentration de l'analyte,

avec une différence toujours fixe) ou proportionnelle (erreur cumulative, avec une différence qui croît avec la concentration, mais avec un rapport fixe). Le tableau II donne un exemple de ces erreurs systématiques.

4- Les Erreurs grossières

Ce sont des erreurs graves, pouvant être à l'origine de résultats aberrants avec des conséquences néfastes, aussi bien pour la santé du patient que pour la crédibilité du laboratoire. Elles peuvent survenir à toutes les étapes de l'analyse : enregistrement des malades, prélèvement, étiquetage et identification (phase pré-analytique), mais aussi par la confusion de réactifs ou de micropipettes au niveau de la prise d'essai, de la longueur d'onde ou de l'étalon (phase analytique) ou encore dans la transcription des résultats (phase post-analytique).

L'exemple du tireur montre que les tirs sont trop dispersés (imprécis) et éloignés de la cible (inexact) (figure 1d). Pour y remédier, il faut beaucoup d'attention au cours des manipulations dans les trois phases de déroulement de l'analyse biochimique, avec en premier lieu l'amélioration de l'exactitude suivie de celle de la précision.

Tableau II : Exemples d'erreurs systématiques

Glycémie vraie (mmol/L)	5	10	15	20
Glycémie trouvée (mmol/L)	5,5	10,5	15,5	20,5
Biais (différence)	0,5	0,5	0,5	0,5

Erreur systématique constante : La différence entre la valeur mesurée et la valeur vraie est constante.

Glycémie vraie (mmol/L)	5	10	15	20
Glycémie trouvée (mmol/L)	5,5	11	16,5	22
Différence (mmol/L)	0,5	1,0	1,5	2,0
Rapport %	10	10	10	10

Erreur systématique cumulative : Le rapport des résultats exprimé en % est une constante, mais la différence croît avec la concentration.

Conclusion

L'analyse biologique est un processus complexe, faisant intervenir de nombreuses étapes interdépendantes les unes des autres et mettant en jeu diverses ressources (personnels, équipements, locaux, spécimen et consommables).

De plus, chaque laboratoire possède ses propres erreurs. Il est donc impératif de contrôler toutes les étapes pour retrouver les sources d'erreurs, les corriger et prévenir leur réapparition, ce qui permet de rendre des résultats fiables en toute sécurité.

Ainsi, les sources d'erreurs sont multiples et seul un système qualité efficace peut minimiser ces erreurs et les maintenir dans des limites acceptables. Ce système qualité, basé principalement sur la formation du personnel, le management des ressources et le système documentaire, est le seul garant d'une analyse fiable.

Une fois maîtrisées, les erreurs n'influencent plus la qualité des analyses, ce qui constitue un point de départ pour une démarche qualité totale vers l'accréditation (1,11,24).

Références

1. Cembrowski GS. The pursuit of quality in clinical laboratory analyses. *Clin Chem* 1990 ; 36 : 1602 - 1604.

2. Chevillon I, Larosse C, Moreau N, Orsonneau JL. Conservation des échantillons de sang avant analyse des paramètres biochimiques les plus courants. *Ann Biol Clin* 1998 ;56 : 200-204.

3. Chinchilli VM, Miller WG. Evaluating test methods by estimating total error. *Clin Chem* 1994;40:464-471.

4. Clark S, Youngman LD, Palmer A, Parish S, Peto R, Collins R. Stability of plasma analytes after delayed separation of whole blood: implications for epidemiological studies. *Inter J Epidemiol* 2003;32:125-130.

5. COFRAC. Le contrôle de la qualité analytique en biologie médicale. Document LAB GTA 06. Révision 00, juillet 2005.

6. Duchassaing D. l'assurance de la qualité de la phase pré-analytique : le prélèvement. *Ann Biol Clin* 1997;55:497-508.

7. GBPL. Guide de bonne pratique de laboratoire. Ministère de la santé publique. Mai 2011.

8. Guez P, Vassault A, Aurignac R, Braconnier F, Dizazzo M, Morion S, et al. Questionnaire d'audit interne qualité dans les LABM des établissements de santé. *Ann Biol Clin* 2002 ; 60(1) :111-122.

9. Henny J. interprétation des examens de laboratoire chez la personne âgée : effet de l'âge ou du vieillissement. *Ann Pharm Fr* 2009 ; 67 :173-181.

10. ISO 9001 : 2008. Systèmes de management de la qualité - Exigences.

11. ISO 15189:2007. Laboratoires d'analyses de biologie médicale. Exigences particulières concernant la qualité et la compétence.
12. Kailajärvi M, Takala T, Grönroos P, Tryding N, Viikari J, Irjala K, Forsström J. Reminders of drug effects on laboratory test results. *Clin Chem* 2000; 46(9):1395-1400.
13. Larrose C, Le Carrer D. Traitement des non conformités en pratique quotidienne. *Ann Biol Clin* 2007;65(1):99-105.
14. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC. Influence of needle bore size used for collecting venous samples on routine clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med* 2006;44(8):1009-1014.
15. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Franchini M, Guidi GC. Plebotomy issues and quality improvement in results of laboratory testing. *Clin Lab* 2006;52(5-6):217-230.
16. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Guidi GC. Influence of short-term venous stasis on clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med* 2005;43(8):869-875.
17. Najjar M F, Chaker E, Memmi M A. Gestion du matériel biotechnique de laboratoire. Ministère de la santé publique. Unité des laboratoires de biologie médicale. 2^{ème} édition, Mars 2003.
18. Najjar MF. Le contrôle interne de qualité en biochimie clinique. Ministère de la santé publique. Unité des laboratoires de biologie médicale. Septembre 2010 ; 68 pages.
19. JORT. Loi n° 2002-54 du 11 juin 2002, relative aux laboratoires d'analyses médicales.
20. Ono T, Kitaguchi K, Takehara M, Shiiba M, Hayami K. serum-constituents analyses : effect of duration and temperature of storage of clotted blood. *Clin Chem* 1981;27(1):35-38.
21. Parvin CA. Comparing the power of quality control rules to detect persistent systematic error. *Clin Chem* 1992;3: 358-363.
22. Parvin CA. Comparing the power of quality control rules to detect persistent increases in random error. *Clin Chem* 1992;38:364-369.
23. Pascal P, Beyerle F. les référentiels qualité applicables dans les laboratoires d'analyses de biologie médicale. *Pathol Biol* 2006;54:317-324.
24. Potie JC. Le vécu d'une démarche qualité en biologie. *Spectra Biologie* 1996;15:14-19.
25. QUALAB. Commission suisse pour l'assurance de qualité dans le laboratoire médical. Directive pour le contrôle de qualité interne. Annexe au Concept d'assurance qualité dans le laboratoire médical. (Concept QUALAB). Contrôle de qualité interne. Version 2.0 : 11.6.2008.
26. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, JimenezCV et al. current databases on biological variations : pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59(7):491-500.
27. Scherrer F, Boisson RC, Eynard JC, Chamard D, Poggi B, Grafmeyer D. Etat de l'art et validation de techniques : application aux performances de fidélité. *Ann Biol Clin* 2008 ; 66(6) : 721-5.
28. Stryer D, Clancy C. Patients safety. *Br Med J* 2005;330:553-554.
29. Togni G, Volken C, Sabo G. Préanalytique. *Forum Med Suisse* 2002;6:113-120.
30. Vassault A, Grafmeyer D, De Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. *Ann Biol Clin* 1999;57(6):685-695.
31. Westgard JO, Ceehafa JJ, Barry PL. European specifications for imprecision and inaccuracy compared with operating specifications that assure the quality required by US CLIA proficiency testing criteria. *Clin Chem* 1994;40:1228-1232.
32. Witte DL, VanNess SA, Angststadt DS, Pennel BJ. Errors, mistakes, blunders, outliers, or unacceptable results : how many ? *Clin Chem* 1997 ; 43(8):1352-1356.
33. Zaninotto M, Plebani M. the "hospital central laboratory": automation, integration and clinical usefulness. *Clin Chem Lab Med* 2010;48(7):911-917.

activités de la société

Activités de la STBC et informations scientifiques

En raison des événements vécus par notre pays au début de l'année 2011, certaines manifestations programmées pour cette année ont été retardées. Celles qui ont eu lieu ont rencontré un vif succès, notamment la journée sur les légionella le 06.05. 2011 (voir résumé de cette journée) et la journée sur le suivi de la grossesse le 03.06. 2011.

Les Journées Nationales de Biologie Clinique ont eu lieu cette année du 06 au 08 octobre 2011 à La Medina de Hammamet. Malgré une date à laquelle les biologistes ne sont pas habitués, les JNBC ont atteint leurs objectifs, avec la présence de plus de 500 participants, et un programme ayant comporté 25 conférences, 185 communications affichées et 4 ateliers. Le 4^{ème} cours de Biologie Moléculaire a eu lieu en pré congrès les 04 et 05 octobre 2011. Ces JNBC ont été également marquées par la tenue de l'assemblée générale électorale de la STBC.

Nouveau Bureau de la STBC

La Société Tunisienne de Biologie Clinique a tenu son assemblée générale électorale le vendredi 7 octobre 2011 à Hammamet au cours des Journées Nationales de Biologie Clinique et a procédé à l'élection d'un nouveau bureau dont la composition est la suivante :

HMIDA Slama	Président
BEN HASSINE Fathi	1^{er} vice président
MESSAOUD Taieb	2^{ème} vice président
BEN RAYANA Med Chiheb	Secrétaire général
ELKHADI Amina	Secrétaire général adjoint
ENNABLI Naoufel	Trésorier
BEN ARIBIA Med Lahbib	Trésorier adjoint
MERDASSI Ghaya	Membre
MESSAADI Fériele	Membre

La rédaction de la RTBC souhaite plein succès au nouveau Bureau.

Parutions de textes réglementaires

Les textes réglementaires suivants, relatifs à la Biologie Clinique sont parus récemment :

- arrêté du premier ministre du 08 août 2011, modifiant l'arrêté du 01 mars 1995 fixant les régions sanitaires prioritaires pour l'octroi de certains avantages au profit de certains corps particuliers du ministère de la santé publique y exerçant dans certaines spécialités
- création officielle de la Fédération Euro méditerranéenne des laboratoires d'analyses de biologie médicale en Tunisie, par décret n° 1106/2011 du 04 août 2011.
- arrêté de la ministre de la santé publique du 12 mai 2011 fixant les règles de bonne pratique des laboratoires d'analyses médicales JORT N°36 du 20 Mai 2011
- arrêté du ministre de la santé publique et du ministre de l'agriculture, des ressources hydrauliques et de la pêche du 14 décembre 2010, relatif à l'approbation du cahier des charges fixant les règles de transfert ou de fermeture d'un laboratoire privé d'analyses médicales sur l'initiative du titulaire de l'autorisation

Condolances

Le bureau de la Société Tunisienne de Biologie Clinique et la rédaction de la Revue Tunisienne de Biologie Clinique très affectés par les décès de :

- notre confrère et maître Docteur Abderraouf Mebazaa, Professeur de Biochimie, imminent biologiste, membre fondateur de la STBC et ancien rédacteur en chef de la RTBC,
- Docteur Farah Belaiba biologiste et Directeur Général de la Société Biomaghreb,

s'associent à toute la famille des biologistes pour adresser leurs sincères condoléances à leurs familles et leurs proches.

**Synthèse des travaux de la journée
«Legionella : De l'environnement à la
clinique»**

La journée «Legionella : De l'environnement à la clinique» organisée par la société tunisienne de biologie clinique s'est déroulée le 6 Mai 2011, et a permis de faire une mise à jour des connaissances et des actualités sur cette bactérie de part son épidémiologie, les infections qu'elle engendre et son diagnostic biologique.

Le programme a comporté les interventions suivantes :

Données tunisiennes et épidémiologie dans le monde
Pr. L. Slim-Saidi

Infections à *Legionella*
**Pr. M. Besbes,
Dr. K. Belkhouja**

Legionella et environnement
Dr. S. Jarraud

Diversité et fitness des *Legionella*
Dr. S. Jarraud

Méthodes de diagnostic :

- Diagnostic classique
Dr. A. Ghariani

Apport des méthodes moléculaires dans le diagnostic et dans les études épidémiologiques
Dr. S. Jarraud

Enquêtes autour d'un cas de légionellose
Dr S. Jarraud

Cas cliniques
**Dr. R. Baaboura,
Dr. E. Mehiri,
Dr. K. Belkhouja**

Résumé des principales conférences

**Données tunisiennes et épidémiologie dans le monde
(Pr. L. Slim-Saidi)**

Legionella, a été découverte lors du 56^{ème} congrès des légionnaires à Philadelphie en 1976 à la suite de la survenue

de 200 cas de pneumonies foudroyantes. Ce genre regroupe actuellement 52 espèces et 70 sérogroupes dont *Legionella pneumophila* séro groupe 1 principale espèce incriminée dans les infections humaines. D'autres espèces peuvent être pathogènes chez l'homme telles *Legionella anisa*, *Legionella bozmeanii*, *Legionella longbeachae*.

Legionella est un bacille à Gram négatif ubiquitaire à multiplication intracellulaire, retrouvé essentiellement dans l'environnement. La transmission des *Legionella* chez l'homme, se fait par inhalation d'aérosols infectés et qui est souvent à l'origine d'épidémies ou de cas groupés. Aucune transmission interhumaine n'a été décrite. De nombreux cas de légionelloses nosocomiales sont décrits, entre autre une épidémie survenue en Chypre dans une unité de néo-natologie et qui a affecté 11 nouveau-nés. *Legionella pneumophila* a été retrouvée chez 8 des 11 patients et une investigation est en cours pour déterminer la source de contamination.

D'autres espèces de *Legionella*, ont été incriminées telle que *Legionella longbeachae* et dont la transmission a été associée dans certaines études à la manipulation de terreau contaminée. On dénombre 25000 cas de légionelloses par an dans le monde, 8000 à 18000 aux USA, 4000 à 5000 en Europe avec une incidence de 0,1 à 4,2/100000 habitants. Une étude réalisée en 2008, regroupant les données de 34 pays, retrouve une incidence de 11,8 cas pour un million d'habitants. Les sujets de plus de 40 ans et particulièrement les hommes, sont les plus touchés. En Tunisie, le diagnostic des légionelloses a commencé en 1989, plusieurs hôpitaux ont développé cette activité (laboratoire de microbiologie de l'hôpital Abderahman Mami de l'Ariana, les laboratoires régionaux d'hygiène : Sfax, Nabeul, Sousse et Monastir ainsi que le laboratoire de contrôle des eaux de l'Institut Pasteur de Tunis) mais les données cliniques et épidémiologiques concernant cette maladie restent fragmentaires par l'absence de texte réglementant la déclaration de la maladie, le manque de sensibilisation et l'absence d'enquête prospective permettant d'établir la place réelle des légionelloses parmi les infections respiratoires. En effet, entre 1990 et 2010, le nombre de cas de légionellose répertorié en Tunisie était de 83 : La prévalence de la

légionellose est sous-estimée.

Des enquêtes menées dans des hôpitaux, hôtels et bain-maure, retrouvent respectivement 40% et 48% des eaux des hôpitaux et des eaux des hôtels colonisés par *Legionella*. Par contre cette bactérie n'est pas retrouvée au niveau des bains maures, ceci est probablement dû à la température élevée au niveau de ces établissements.

Infections à *Legionella* (Pr M. Besbes, Dr K. Belkhouja)

Les manifestations cliniques causées par *Legionella* peuvent se présenter sous 3 formes cliniques :

- La fièvre de Pontiac qui se traduit par un syndrome pseudo grippal, généralement bénigne.
- La maladie des légionnaires qui se présente sous forme de pneumopathie pouvant être très grave et parfois mortelle. La durée d'incubation est de 2 à 10 jours, le début n'est pas spécifique, puis s'installe des signes respiratoires (toux, dyspnée...) et une fièvre élevée. Ces symptômes peuvent se compliquer d'atteintes digestives ou neurologiques.
- Les formes extrapulmonaires sont rares (neurologiques, cardiaques, digestives, rénales...) et concernent essentiellement les immunodéprimés.

De nombreux facteurs de risque peuvent être évoquer tels que l'âge (plus de 50 ans), le sexe masculin, affection respiratoire chronique, atteinte cardio-vasculaire, l'immunodépression, la ventilation et l'aérosolthérapie à domicile et la notion de séjour dans les hôtels, hôpitaux ou stations thermales.

Legionella est le premier agent bactérien intracellulaire des pneumonies aiguës communautaires responsables de 0,5 à 10% des cas et jusqu'à 15% de ceux nécessitant une hospitalisation. La gravité de ces infections, nécessite un diagnostic rapide.

A côté des pneumopathies communautaires *Legionella* est responsable de légionelloses nosocomiales qui sont définies comme suit :

- Cas certain : Si hospitalisation de plus de 10 jours avant la date de début des signes cliniques.
- Cas probable : Si hospitalisation de moins de 10 jours avant la date de début des signes cliniques.

Le traitement des légionelloses dépend de la sévérité de

l'infection :

- Macrolide ou fluoroquinolone en cas de pneumonie commune.
- Association macrolide ou fluoroquinolone à la rifampicine en cas de pneumonie sévère.

«*Legionella* et environnement» et «Diversité et fitness des *Legionella*» (Dr S. Jarraud)

Legionella est retrouvée dans les milieux aquatiques naturels (eaux douces, rivières, lacs...), le sol, dans les réseaux de distribution d'eau (douches, robinets...), tours aéro-réfrigérantes et les systèmes de thérapie respiratoire. Elle peut se développer dans les eaux chaudes jusqu'à 42°C. La multiplication des *Legionella* est favorisée par la stagnation de l'eau, la température, le pH, un mauvais entretien du réseau, la présence de bras morts, de biofilms et la présence d'amibes qui les protègent dans l'environnement du froid, des biocides et des antibiotiques et les rendent plus mobiles et plus invasives.

Legionella est une bactérie à multiplication intracellulaire entraînant la formation d'un phagosome où se fera la multiplication.

Les souches responsables d'infections humaines, sont dans 98,8% des cas des *L. pneumophila* et dans 95,4% des cas des *L. pneumophilasérotype 1*.

Une étude réalisée en 2009 dans 14 hôpitaux français, retrouve *Legionella pneumophila* sérotype 1 dans 42% des cas suivie de *Legionella anisa* (18%) et démontre la grande hétérogénéité de *L. pneumophilasérotype 1* contrairement à *L. anisa* qui présente une bonne stabilité génomique. L'hétérogénéité des Lp1, pourrait augmenter la probabilité d'avoir des souches capables d'infecter les cellules humaines.

Le génome de *Legionella* présente une grande plasticité avec de nombreux îlots de pathogénicité et des gènes de mobilité avec une grande diversité génétique : 7 à 10% des gènes de chaque souche sont spécifiques.

Actuellement 3 génomes de *L. pneumophilasérotype 1* sont connus (Lp Paris, Lp Lens et Lp Philadelphia). *Legionella* est capable d'interagir avec les cellules hôtes et de moduler les fonctions de la cellule hôte pour les détourner à son avantage.

La surveillance du risque de légionellose, nécessite des méthodes de quantification des *Legionella* dans l'environnement (eau). 2 méthodes sont standardisées en France :

- Méthode basée sur le dénombrement après mise en culture (AFNOR NFT 90-431 et ISO 1731)
- Méthode basée sur l'amplification quantitative d'ADN par PCR (AFNOR NFT 90-471)

La quantification des *Legionella* par culture est intéressante vu qu'elle ne nécessite pas d'équipement lourd, elle est indispensable dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques mais par contre elle est limitée par le potentiel de cultivabilité, le délai de croissance peu adapté aux situations d'urgence et sa faible sensibilité, la culture sous-estime la quantité de légionelles infectieuses.

En ce qui concerne la quantification par PCR, elle est rapide et permet de quantifier les *Legionella* non cultivables mais aussi les légionelles mortes et n'est pas applicable lors d'études épidémiologiques.

Dans le cas de détection de *Legionella* dans les eaux chaudes sanitaires (ECS) en quantité significative (supérieure à 10^3 UFC/L), il faut informer les autorités concernées, nettoyer, désinfecter et vérifier l'efficacité des mesures mises en place.

Diagnostic classique (Dr A. Ghariani)

Il n'y a pas de spécificité clinique de la légionellose, néanmoins un tableau de pneumonie sévère précédée ou accompagnée de signes cliniques digestifs et neurologiques oriente vers ce diagnostic, qui sera confirmé ou infirmé par la biologie.

De nombreux tests permettent de poser le diagnostic bactériologique :

- La recherche d'antigènes solubles urinaires est une technique rapide (résultat en moins d'une heure) et pouvant détecter l'excrétion des antigènes urinaires, dès les premiers jours de la maladie. La durée d'excrétion de ces antigènes est d'environ 2 mois, mais des durées plus longues (jusqu'à une année) ont été retrouvées. Cette technique, permet d'améliorer le diagnostic étiologique des pneumopathies. Sa sensibilité varie de 56 à 90%, sa spécificité est de 99% et la valeur prédictive négative est

de 95%. Son inconvénient est qu'elle ne détecte que *Legionella pneumophila* sérotype 1.

- L'immunofluorescence directe sur les prélèvements respiratoires permet de donner un résultat rapidement mais présente de faibles sensibilité et spécificité.

- La culture de prélèvements respiratoires après décontamination sur milieu adapté (BCYE) est la méthode de référence, elle nécessite un délai de 3 à 10 jours. Sa sensibilité varie de 50 à 80% selon les études quant à sa spécificité, elle est de 100%.

Quand une culture est positive, il est nécessaire d'identifier les colonies obtenues, tout d'abord par l'aspect des colonies à l'aide de loupe binoculaire, l'IFD et l'agglutination à l'aide de particules de latex sensibilisés. Des techniques moléculaires peuvent être utilisées.

- La sérologie, ne permet de poser le diagnostic que dans moins de 10% des cas de légionellose. Il faut prélever 2 sérums, l'un au début des signes cliniques et le second 2 à 3 semaines après le début de la maladie.

L'interprétation est en faveur d'un cas confirmé s'il y a augmentation du titre d'anticorps par 4 et d'un cas probable s'il y a un titre unique des anticorps supérieur à 256. La sensibilité de la sérologie est de 40 à 75% et sa spécificité est de 95%.

Apport des méthodes moléculaires dans le diagnostic et dans les études épidémiologiques (Dr S. Jarraud)

Le diagnostic de légionellose doit être évoqué devant toute pneumonie, car il n'existe pas de spécificités radio-clinique. Le critère de choix de la méthode de diagnostic dépend de l'importance de la rapidité du résultat et de la gravité de la maladie. Donc la rapidité du diagnostic est en relation directe avec le pronostic vital.

L'amplification génique permet une détection précoces *Legionella spp* (gène mip) ou *Legionella-pneumophila* (ARN 16S) dans les échantillons pulmonaires par réaction en chaîne par polymérase (PCR). Les résultats doivent être interprétés en corrélation avec les données cliniques, radiologiques et biologiques. La sensibilité de la PCR est bonne pour les prélèvements pulmonaires (80 à 100%) mais de moindre performance pour les autres échantillons (urines et sérum).

Actuellement, de nombreux laboratoires utilisent la PCR en temps réel qui est plus rapide que la PCR classique, minimisant les contaminations et présentant de bonnes sensibilité et spécificité. La mise au point d'une PCR en temps réel à la recherche de *L. pneumophila sérotype 1* dans les prélèvements respiratoires au niveau du centre national de référence des *Legionella* et ciblant le gène *wzm* retrouve une sensibilité de 95,6% et une spécificité de 100%.

Il est possible aussi d'amplifier plusieurs cibles en un seul tube : PCR multiplex qui associe la détection de *Legionella spp* à *Legionella pneumophila* ou *L. pneumophila* à d'autres pathogènes respiratoires (bactéries et virus).

La légionellose est une maladie à déclaration obligatoire en France, lors d'un signalement d'un cas isolé ou de cas groupés, il est nécessaire de réaliser un interrogatoire et une enquête épidémiologique à la recherche de la source de contamination. L'enquête, nécessite de réaliser des prélèvements d'eau aux endroits suspects et en cas de présence de souches de *Legionella*, une comparaison est mise en œuvre par typage des différentes souches. Parmi les techniques de typage les plus discriminantes, nous

retrouvons l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et le séquençage nucléotidique (SBT ou *sequence based type*). La première est la méthode de référence basée sur une macro-restriction de l'ADN et migration en champ pulsé, elle est longue (4 jours) mais ayant un pouvoir discriminant supérieur à 98%. La SBT est un séquençage nucléotidique de fragments de 7 gènes choisis et les séquences obtenues sont comparées à celles d'une banque de données internationales.

Le centre national de référence des Légionelles à Lyon, dispose de 6000 souches collectées depuis 1996, des profils génomiques des souches cliniques et environnementales ont été établis et retrouvent que pour les souches sporadiques 56% de diversité, pour les souches épidémiques, elle est inférieure à 7% et pour les souches endémiques, elle est de 37%.

Synthèse réalisée par :

Dr. Emna MHIRI

Laboratoire de microbiologie

CHU A. Mami, Ariana

Agenda des manifestations scientifiques

- **12th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology**
October 2-6, 2011 - Stuttgart, Germany
www.iatdmct2011.de
- **11th EFCC Continuous Postgraduate Course in Clinical Chemistry “New trends in classification, diagnosis and management of inflammation”**
October 22-23, 2011 - Dubrovnik, Croatia
www.dubrovnik-course.org
- **First World Congress on Water Channel Proteins - Aquaporins and Relatives - Celebrating the 25th Anniversary of the Discovery of the First Water Channel Protein - October 27-30 2011 - Cluj-Napoca - Romania**
www.ifcc.org
- **22nd ESPNIC Medical And Nursing Annual Congress - November 2-5 2011 - Hannover - Germany** www.ifcc.org
- **JIB 2011**
jours Internationales de Biologie
8-10 Novembre 2011, CNIT La défense - Paris, France
www.jib-sdbio.fr
- **COLABIOCLI 2011 - XX Congreso Latinoamericano de Bioquímica Clínica - November 24-27 2011 - Punta Cana - Rep Dominicana**
www.ifcc.org
- **Fray International Symposium**
December 4-7, 2011 - Cancun, Mexico
www.flogen.com/FraySymposium
- **XXIII National Congress of Biochemistry of the Turkish Biochemical Society - TBD - November 29 - December 2 2011 - Adana - Turkey**
www.ifcc.org
- **ARAB MEDLAB 2012 - Marrakech, Maroc**
13th arab Congress of Clinical biology
12th Moroccan Congress of clinical chemistry and Laboratory Medicine
2-5 May, 2012 - Palais des Congrès, Marrakech - Morocco
smccbm@gmail.com / www.smccbm.org
- **XXXIII Nordic Congress in Clinical Chemistry - June 12-15 2012 - Reykjavik - Iceland**
www.ifcc.org
- **EUROMEDLAB - Milano 2013**
20th IFCC-EFCC European Congress of Clinical chemistry and Laboratory Medicine
19-23 May 2013 - Milano, Italy
info@milan2013.org / www.milan2013.org
- **APCCB 2013 - 13th Asian Pacific Congress of Clinical Biochemistry - November 17-20 2013 - Bali - Indonesia**
- **IFCC WorldLab Istanbul 2014**
22-26 June 2014
Istanbul, Turkey
Istanbul Congress Center
info@istanbul2014.org / www.istanbul2014.org

Hommage à la mémoire du Professeur Abderraouf Mebazaa

Pr. Naziha Kaabachi

Docteur Abderraouf Mebazaa, Professeur en Biochimie à la Faculté de Médecine de Tunis et chef de service du laboratoire de Biochimie de l'hôpital La Rabta de Tunis nous a quittés le 13 août 2011, laissant pour nous un grand chagrin et une immense tristesse.

Docteur Abderraouf Mebazaa fut un homme d'exception dont le souvenir reste si vivace en chacun d'entre nous. Chacun sait à quel point il était un homme remarquable tant par ses qualités humaines et intellectuelles que par son engagement professionnel. Pendant plus de trente ans, il a consacré sa vie au service de la biologie, de l'enseignement, de la formation et de la recherche.

Il était le maître respecté de toute une génération de biologistes et de techniciens grâce à ses qualités humaines, son talent d'enseignant, sa grande compétence, sa rigueur scientifique et son entière disponibilité pour ses collaborateurs et ses étudiants.

Initiateur et pionnier des grands projets dans le domaine de la Biologie médicale, et soucieux de l'amélioration continue de la prise en charge des patients, professeur Abderraouf Mebazaa avait introduit dans le laboratoire dès les années 70 :

l'automatisation des analyses,

l'assurance qualité des analyses,

une organisation moderne conforme aux normes internationales du processus analytique

le développement de secteurs spécialisés d'exploration biochimique, faisant appel à des techniques de pointe (chromatographie, biologie moléculaire,...). C'est ainsi qu'il a été le pionnier de l'exploration biochimique des maladies métaboliques héréditaires, qui constitue le pôle d'excellence du laboratoire

Il avait un esprit de chercheur, il allait au fond des choses, il comprenait très vite l'essentiel et travaillait beaucoup pour aller toujours plus loin.

Il avait mis en place plusieurs protocoles de recherche en collaboration avec les services cliniques dans plusieurs domaines (maladies cardiovasculaires, gérontologie, insuffisance rénale, grossesse,...).

Il fut initiateur et responsable de nombreux projets franco-tunisiens ayant permis le transfert de technologie et l'approfondissement du savoir scientifique. Son dévouement pour la recherche a été couronné par sa nomination en 1999 comme directeur du premier laboratoire de recherche sur le thème «marqueurs biochimiques et génétiques de l'athérosclérose en Tunisie».

Les résultats de ses travaux scientifiques ont été valorisés sous forme de plus d'une centaine de publications et de très nombreuses productions doctorantes (thèses, mastères,...)

Professeur Mebazaa était un homme dont la valeur était si grande dans de multiples domaines, qu'il était sollicité de partout :

- Au sein de l'EPS La Rabta, il avait eu des responsabilités en tant que Président du comité médical pendant 8 ans

(1991 - 1998) et Président du Comité d'éthique (1995 - 2002).

- Au niveau du Ministère de la Santé Publique, il a été désigné Président de nombreuses Commissions scientifiques et techniques
- Consultant au Centre National de Médecine du Sport
- Consultant au CNEAR

Soucieux de l'évolution de la biologie médicale en Tunisie, il fut :

- membre fondateur et président de la Société Tunisienne de Biologie Clinique (1986-1990), de l'Association Tunisienne d'Etude des Maladies Métaboliques Héritaires (2002-2005) et Rédacteur en Chef de la Revue Tunisienne de Biologie Clinique de 1999 à 2009, période au cours de laquelle la RTBC a été dotée d'un comité de rédaction et d'un comité de lecture, et où son édition a gagné en rigueur, en qualité et en régularité.

- Il a contribué pendant toute sa carrière au soutien et à la formation des Techniciens Supérieurs en Biologie et a participé aux activités de leur association scientifique ; l'ATUTEB.

Professeur Abderraouf Mebazaa laisse un exemple de modestie, de grande générosité, de curiosité scientifique, d'honnêteté intellectuelle et de responsabilité professionnelle. Il avait un respect de l'autre quelque soit son niveau social. C'est ce qui lui valu le respect et l'amour de tous ceux qui l'ont connu et travaillé avec lui.

Merci pour tout ce que vous avez donné à la biologie et à la Tunisie.

Une demande de changement de la dénomination du laboratoire de Biochimie de l'EPS La Rabta en «Laboratoire Abderraouf Mebazaa» a été déposée auprès des autorités de tutelles.

Que Dieu le Tout Puissant lui accorde son infinie miséricorde et l'accueille dans son éternel Paradis.

A la mémoire de Farah Bel Aiba

Le 7 Aout 2011, le 7^{ème} jour du mois ramadan à 8h du matin, nous a quitté un ami exceptionnel, Farah Bel Aiba.

Né le 6 juin 1954 à la Chebba, il a poursuivi ses études secondaires au lycée de garçons de Sfax. En 1976, il a rejoint la faculté de pharmacie de Monastir pour décrocher son diplôme de pharmacien en 1982.

Durant sa vie estudiantine, Farah a marqué son passage par son adhésion précoce et active à la vie syndicale et associative.

On le voyait animer les cercles de discussions, de divers groupes et défendre les droits et les intérêts des étudiants. Ses profondes convictions du droit de l'étudiant à un syndicat indépendant, l'ont poussé à militer pour une UGET libre...

En 1981, il est parti poursuivre ses études de 3^{ème} cycle en France où il a préparé un DEA et une thèse en chimie analytique. En parallèle, il a travaillé dans différents hôpitaux de Paris, faisant fonction d'interne, ce qui lui a permis d'acquérir une bonne expérience en biologie clinique.

En 1988, Farah est rentré en Tunisie plein de projets. Il a monté en quelques années la première société tunisienne, et arabe, de fabrication des réactifs de biologie "BIOMAGHREB" défiant ainsi les grandes boîtes multinationales qui dominaient le marché national depuis des décennies. Très vite la marque Biomaghreb s'est imposée en Tunisie et dans plusieurs pays arabes.

Dans le monde de la biologie, Biomaghreb s'est distinguée par son soutien logistique et matériel infaillible à toutes les activités scientifiques et biologiques des sociétés savantes (STBC, l'ATUTEB, STI,...) des laboratoires régionaux et de circonscriptions ; des centres de transfusion ; perfectionniste, Dr Farah Belaiba a mis toute son énergie dans la mise en place d'une démarche qualité, ce qui lui a permis de décrocher la certification ISO 9001 version 2000 en 2006.

L'homme aimait la vie, il était de compagnie agréable, excellait dans le discours, et avait des avis sur tout. Ambitieux à l'extrême, serviable toujours disponible, et jamais pressé de partir. Mais la mort était pressée de l'emporter, laissant des projets inachevés, des projets non encore réalisés, et des projets non encore conçus, et laissant une famille, et des amis atterrés par la soudaineté de l'évènement.....mais ainsi va la vie.

Que Dieu ait son âme ; Une pensée sincère de tous ses amis à son épouse, et à ses enfants : Ines et Yassine.

La famille élargie de la biologie

instructions aux auteurs

La Revue Tunisienne de Biologie Clinique (RTBC) est publiée par la Société Tunisienne de Biologie Clinique. Les sujets publiés se rapportent à tous les aspects de la Biologie Clinique de toutes disciplines et tout mode d'exercice. La revue publie des articles originaux, des revues générales, des notes de pratique quotidienne ou de formation continue, des revues de presse ou de livres et des lettres à la rédaction. Toutes les publications se font en français, en anglais ou en arabe et doivent être obligatoirement accompagnées d'un résumé en anglais (Les lettres à la rédaction, les revues de presse ou de livres ainsi que les notes, ne requièrent pas de résumé).

Les manuscrits soumis à la revue ne doivent pas avoir fait l'objet de publication antérieure (en dehors des thèses, mémoires, ou abstracts). Les manuscrits sont soumis à aux moins deux lecteurs anonymes sélectionnés par le comité de rédaction.

Si des corrections sont demandées aux auteurs, la version corrigée doit être soumise de nouveau à la rédaction dans un délai ne dépassant pas 2 mois. Elle doit être accompagnée d'une version sur disquette informatique (logiciel word).

Une fois accepté, le manuscrit ne peut être publié dans une autre revue sans l'autorisation préalable de la RTBC.

Recommandations générales

• Soumission des manuscrits

Les manuscrits sont adressés en 3 exemplaires (y compris les illustrations) au rédacteur en chef, à l'adresse suivante :

Revue Tunisienne de Biologie Clinique

BP. N°320 El Menzah 8 - 2037 Tunis - Tunisie

E-mail : contact@stbc.org.tn

chiheb.rayana@rns.tn

Les manuscrits doivent être accompagnés d'une lettre précisant la rubrique à laquelle les auteurs désirent voir apparaître leur manuscrit et les engageant quant à la non soumission à une autre revue. Cette lettre doit porter la signature de tous les auteurs.

• Préparation des manuscrits

Les manuscrits doivent être rédigés en interligne 1,5, taille des caractères : 12, sur du papier format A4, en recto uniquement.

Laisser une marge de 2,5 cm des 4 côtés de la page.

Mettre les références, les tableaux et les figures sur des pages séparées du texte. Toutes les pages doivent être numérotées, en commençant par la page de titre. Les différentes sections du manuscrit doivent répondre aux recommandations suivantes :

page de titre comportant

- le titre de la publication, reflétant son contenu (2 lignes maximum)
- les noms et prénoms des auteurs, ainsi que les adresses professionnelles des équipes (lorsqu'il existe plus d'un laboratoire d'origine, indiquer en "exposant" après chaque nom, le numéro du laboratoire correspondant).
- une adresse de correspondance avec N° de téléphone. Fax et E-mail.

résumé et mots clés

- Le résumé consiste en un paragraphe unique comportant moins de 200 mots.

- Aucune abréviation ni référence ne doivent apparaître dans le résumé.

- Le résumé est suivi d'une série d'au maximum six mots clés.

remerciements

Les remerciements éventuels sont placés à la fin du texte, avec un caractère différent.

références (1)

Les références sont numérotées par ordre d'apparition dans le texte et présentées selon le modèle suivant :

• **Pour les articles de revues** : Noms des auteurs suivis des initiales des prénoms. Titre de l'article dans la langue d'origine. Nom abrégé de la revue année ; volume : première et dernière page de l'article.

Exemple : Boscato LM, Stuart MC. Incidence specificity of interfe-

rence in two-site immunoassays. *Clin Chem* 1986 ; 32 : 1491-5.

(1) : *International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. N Engl J Med* 1991 ; 324 : 424-8.

• **Pour les articles de livres** : Noms des auteurs de l'article suivis des initiales des prénoms. Titre de l'article dans la langue d'origine.

In : noms et initiales des auteurs de l'ouvrage. Titre du livre. Ville, éditeur, année de publication : première et dernière page de l'article.

Exemple : Kohn RR. Aging and age related disease : Normal processes. In : Johnson HA. Relation Between Normal Aging and Disease. New York, Raven Press, 1985: 1-44.

• **Pour un livre** : Noms des auteurs suivis des initiales des prénoms. Titre du livre. ville, éditeur, année de l'édition : nombre de pages ou les pages exactes à consulter (la 1^{ère} et la dernière).

Exemple : Forbes GB. Human body composition. New York : Springer Verlag, 1987 : 27.

tableaux et figures

Ils sont présentés sur des pages séparées du texte et numérotés respectivement en chiffres romains et arabes.

Ils sont accompagnés de titres et de légendes suffisamment clairs et explicites.

abréviations

Tout sigle ou abréviation nécessaire doit être explicité à sa première apparition dans le texte.

Rubriques

• Editorial

Habituellement écrit à la demande du Comité de Rédaction, sur une question « d'actualité », par un auteur qui fait autorité sur le sujet. Il doit être court, de l'ordre de cinq pages dactylographiées et comporter moins de 10 références bibliographiques.

• Revues générales

Elles ont pour objet de présenter une mise au point des connaissances et de souligner les acquisitions récentes.

Les revues générales sont normalement publiées sur invitation du comité de rédaction. Toutefois, des suggestions au rédacteur en chef peuvent être avancées.

Les recommandations de la rédaction sont identiques à celles concernant les articles originaux.

• Articles originaux

Ils ont pour objet de présenter un travail original se rapportant à la résolution de problèmes en pathologie humaine et où la biologie tient une place prépondérante.

Le nombre de pages est limité à 15, illustrations, références et résumé compris.

Ils doivent comporter les sections suivantes dans l'ordre : titre, résumé, mots clés, introduction, matériel et méthodes, résultats, discussion, remerciements (éventuellement), références, tableaux et figures.

• Lettres à la rédaction

Cette rubrique permet aux lecteurs de réagir à propos d'un article paru dans la RTBC, d'une nouveauté ou d'un événement en biologie clinique. La lettre doit être concise (moins de 750 mots, références comprises). Une figure ou un tableau peut y être inclus.

• Notes de pratique quotidienne

Il s'agit d'un espace réservé à des articles courts consacrés à l'exercice quotidien de la biologie (évaluation technique et réactovigilance, cas cliniques, valeur sémiologique des analyses, organisation et gestion des laboratoires,...). Ces articles doivent comporter moins de 1500 mots, 2 tableaux ou figures au maximum, et moins de 15 références.