

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. Koaabachi,
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
- ✓ *Les résistances bactériennes : un enjeu en Santé Publique*
Saïda Ben Redjeb
- *Revue générale*7
- ✓ *La Protéine Z : un nouvel inhibiteur de la coagulation impliqué dans plusieurs pathologies*
F. Abderrazak, I. Makhoulouf, F. Mehdioui, M. Hassine
- ✓ *Les milieux gélosés chromogènes en microbiologie clinique*
S. Mahfoudh, B. Jemli, L. Bakir, S. Gargouri
- *Articles originaux*23
- ✓ *La coagulation intravasculaire disséminée : complication des leucémies aiguës au moment du diagnostic*
S. Hizem, N. Braham Jmili, T. Mahjoub, M. Kortas.
- ✓ *Interprétation de la digoxinémie : facteurs à prendre en considération*
I. Hellara, L. Boudhib, F. Neffati, W. Douki, R. Boukef, A. Ben Amor, MF. Najjar.
- *Pratique quotidienne*35
- ✓ *La recherche négative d'anticorps anti nucléaires en immunofluorescence indirecte doit-elle être suivie d'une détermination des anti-corps anti ENA ?*
S. Yalaoui
- *Informations scientifiques et nouvelles professionnelles*.....40

SAIDA BEN REDJEB

Les résistances bactériennes : un enjeu en Santé Publique

La résistance bactérienne aux antibiotiques a augmenté dans des proportions inquiétantes ces dernières années de telle sorte qu'elle constitue actuellement un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. En effet, l'émergence croissante et la dissémination des bactéries multirésistantes (BMR) représente une menace grave, notamment en milieu hospitalier, mettant en jeu la validité de l'arsenal thérapeutique. De plus les infections liées à ces germes entraînent une augmentation de la morbidité et de la mortalité et des coûts de soins de santé.

Parmi les facteurs impliqués, la prescription excessive souvent inadaptée des antibiotiques joue un rôle essentiel. Elle sélectionne les bactéries résistantes et favorise la diffusion des gènes plasmidiques codant pour ces résistances. La dissémination des résistances liée à la circulation des gènes entre les bactéries rend compte ainsi de la rapidité avec laquelle évolue le phénomène de la résistance au sein du monde bactérien. De plus, l'importance des flux migratoires fait de la résistance aux antibiotiques un problème mondial. Il concerne aussi bien les pays en voie de développement que les pays développés, à des degrés variables selon les espèces pathogènes et les pays en fonction des habitudes de prescription et des pratiques d'hygiène. Aussi est-il important que chaque pays puisse établir une surveillance régulière de la résistance aux antibiotiques des principaux pathogènes, tant à l'échelle locale et régionale qu'à l'échelle nationale. Ceci permet d'évaluer l'ampleur du problème et de détecter l'émergence de nouvelles résistances créant ainsi un phénomène d'alerte qui permettra de mettre en place les mesures de prévention appropriées.

En Tunisie, une surveillance régulière de la résistance aux antibiotiques établie depuis 1999 par le Laboratoire de Recherche sur «la résistance aux antimicrobiens», regroupant 4 centres hospitalo-universitaires, montre une situation particulièrement préoccupante en milieu hospitalier où certains bacilles à Gram négatif (BGN), parmi les entérobactéries, *Pseudomonas* et *Acinetobacter*, sont souvent responsables d'infections dues à des souches multirésistantes (publications LART2005 et LART2008). La pression de sélection exercée par l'utilisation importante de l'antibiothérapie et la diffusion épidémique des souches résistantes sont les deux facteurs principaux conditionnant

Professeur en Microbiologie
à la Faculté de Médecine
de Tunis
Directrice du Laboratoire
de Recherche «Résistance
aux antimicrobiens»

cette évolution. Ainsi, parmi les entérobactéries, *K. pneumoniae* multirésistantes par production de bêtalactamases à spectre étendue (BLSE) conférant la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) constituent un problème croissant dans nos hôpitaux avec une fréquence globale allant de 27,9% en 1999 pour atteindre 51,5% en 2007 (LART 2008). Les fréquences les plus élevées sont observées dans les hémocultures où leur taux atteint 73% en 2007 ce qui doit faire tirer la sonnette d'alarme au risque de se trouver dans une impasse thérapeutique. Les services concernés sont essentiellement les services de réanimation, de néonatalogie et de pédiatrie où elles sont responsables de bouffées épidémiques sur un fond d'endémie. De plus, le type enzymatique de ces BLSE a changé ces dernières années. Alors que les premières souches isolées dès les années 1986 étaient productrices de BLSE, dérivés de TEM ou de SHV, ces dernières années ont vu apparaître un nouveau type CTX-M (céfotaximase) de distribution mondiale qui a disséminé dans les différentes espèces d'Entérobactéries, essentiellement *E. coli* diffusant sous forme épidémique. Ceci est d'autant plus grave que ces souches multirésistantes sont de plus en plus observées dans les infections communautaires. Ainsi, le problème des résistances bactériennes qui était longtemps resté un problème hospitalier, réservé aux seules infections nosocomiales, intéresse ces dernières années également les infections communautaires. En Tunisie, les études multicentriques effectuées en 2008 ont montré que 8% des *E. coli* et 50% des *K.pneumoniae* isolées étaient résistantes aux C3G pour la plupart des BLSE de type CTX-M dont le plus fréquent est le type CTX-M15.

Les deux espèces les plus redoutables en milieu hospitalier restent *P. aeruginosa* et *A. baumannii* responsables d'infections, essentiellement en milieu de réanimation, chez des sujets aux défenses immunitaires amoindries. Ces infections sont d'autant plus graves que ces germes sont devenus multirésistants voire totorésistants aux antibiotiques, mettant le clinicien dans une impasse thérapeutique. En effet, la résistance à l'imipénème de ces souches est en augmentation progressive dans nos hôpitaux allant pour *P. aeruginosa* de 14% en 1999 pour atteindre 21,5% en 2008. Concernant *A. baumannii*, 45% des souches isolées en 2008 sont résistantes à l'imipénème. L'utilisation de plus en plus fréquente de la colistine pour le traitement des infections dues à ces souches multirésistantes a vu émerger des résistances à la colistine. On

assiste ainsi à une spirale infernale des résistances bactériennes avec ses conséquences socio-économiques.

Parmi les cocci à Gram positif, *S. aureus*, réputé pour sa fréquence croissante de multirésistance dans de nombreux pays, ne constitue pas une préoccupation majeure dans nos hôpitaux. En effet, la surveillance régulière établie depuis 1999 montre des taux d'isolement des *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) relativement stables avec fréquence globale inférieure à 25%. Des fréquences plus élevées sont observées dans les services de réanimation, néanmoins *S. aureus* ne constitue pas la cause la plus importante d'infections en milieu de réanimation. Il se situe après les bacilles à Gram négatif.

D'autres espèces bactériennes longtemps épargnées par le phénomène et responsables d'infections communautaires ont à leur tour évolué dans le sens de la résistance notamment *S. pneumoniae* qui a développé des résistances essentiellement aux bêtalactamines. Parmi nos souches, près de 50% ont une sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP), 27 à 32% une sensibilité diminuée à l'amoxicilline et 16 à 23% une sensibilité diminuée au céfotaxime, néanmoins la plupart des souches présentent des bas niveaux de résistance. Les fréquences élevées de PSDP placent la Tunisie parmi les pays où la prévalence est la plus élevée.

Ainsi, les BMR sont devenues un problème préoccupant non seulement en milieu hospitalier mais aussi en milieu communautaire (infections respiratoires à PSDP, infections à SARM, infections urinaires à *Klebsiella* et *E. coli* productrices de BLSE..).

Cette évolution sans cesse croissante des BMR impose la mise en place d'une politique nationale de contrôle et de prévention s'inscrivant dans une politique globale de Santé. Cela nécessite des mesures pour promouvoir l'utilisation rationnelle des antibiotiques et des mesures pour prévenir la transmission croisée des infections. En pratique de ville, une utilisation raisonnée des antibiotiques doit passer par la sensibilisation des prescripteurs et l'éducation des patients.

A l'hôpital, la lutte contre les BMR s'inscrit dans une politique globale de prévention des infections nosocomiales et de maîtrise des résistances bactériennes. Elle nécessite la sensibilisation de tout le personnel de santé ; la réduction de l'incidence des infections à BMR pourra constituer un indicateur simple de la qualité des soins. Chaque établissement de soins doit disposer d'une commission de l'antibiothérapie chargée d'élaborer

les protocoles adaptés à l'épidémiologie locale et d'en réaliser le suivi.

Par ailleurs, le développement de l'hygiène hospitalière permet de réduire les risques de dissémination. Là, l'activité des comités de lutte contre les infections nosocomiales (CLIN) est fondamentale pour définir les mesures d'isolement, renforcer les mesures d'hygiène, contrôler l'application des procédures.

La mise en place d'un observatoire national des résistances bactériennes aux antibiotiques permettra de mieux coordonner les efforts et de définir un programme national de prévention adapté aux données de la surveillance épidémiologique.

La Protéine Z : un nouvel inhibiteur de la coagulation impliqué dans plusieurs pathologies

F. ABDERRAZAK,
I. MAKHLOUF,
F. MEHDIOUI,
M. HASSINE

Résumé : La protéine Z (PZ) est un facteur vitamine-K dépendant isolé dans le plasma humain en 1987. Sa structure est proche de celles d'autres protéines de la coagulation vitamine-K dépendantes à savoir les facteurs VII, IX, X et la protéine C. Son rôle physiologique est resté longtemps méconnu, mais il a pu être établi ces dernières années qu'elle agit comme le cofacteur d'une serpine appelée inhibiteur dépendant de la PZ (ZPI). Ce dernier est également synthétisé par le foie et a été purifié à partir du plasma humain en 1998. Le complexe PZ /ZPI a une activité protéolytique et inhibe directement le facteur Xa.

La protéine Z augmente au cours de la grossesse. Son taux semble être stable chez l'adulte et ne varie pas avec le sexe selon la majorité des études.

La PZ diminue en cas d'insuffisance hépatocellulaire, de traitement par les antivitamines K, dans le syndrome néphrotique, les pathologies rénales et chez les patients atteints de tumeurs malignes.

En revanche le taux de PZ augmente dans les inflammations en particulier dans les arthrites rhumatoïdes, les lymphomes, en cas d'hémodialyse, et de contraception orale.

Une relation entre le déficit en PZ et les thromboses veineuses et artérielles a été rapportée par plusieurs auteurs et non confirmée par d'autres. La diminution de la PZ a été observée chez les patients ayant le syndrome des antiphospholipides. Le déficit en PZ est associé dans certaines études à des fausses couches et aux morts fœtales intra-utérines, d'où l'intérêt d'associer son dosage dans le bilan étiologique chez les femmes ayant présenté des pertes fœtales à répétition.

Mots-clés : Protéine Z, Structure, Synthèse, Fonctions, Thromboses, Grossesse.

Summary : Protein Z (PZ) is a vitamin-K dependent factor isolated from human plasma in 1987. Its structure is near to that of other proteins of coagulation vitamin-K dependents. Its physiological role had been unrecognized for a long time but it was established that the protein Z act as a cofactor of an inhibitor dependent of PZ (ZPI). The latter is also synthesized by liver and was purified from human plasma in 1998. The PZ/ZPI complex inhibe directly the factor Xa.

An increase of PZ was observed in pregnancy, and inflammation such as lymphoma, rheumatoid arthritis and haemodialysis.

The level of PZ is markedly low in liver disease, the use of vitamin-K antagonist and oral contraception, the patients with nephrotic syndrome and patients with malignant tumors.

Several studies reported conflicting results on the role of PZ in venous and

Laboratoire d'hématologie-
Banque du Sang
E.P.S. «Fattouma Bourguiba»
Monastir

arterial thrombosis. Low PZ levels were observed in patients with antiphospholipid syndrome. It was reported a high frequency of PZ deficiency in woman with unexplained primary early foetal losses and early foetal death. Consequently PZ level should be performed in the etiologic check up for unexplained foetal losses.

Key words : Protein Z, structure, synthesis, function, thrombosis, pregnancy.

Introduction

La coagulation est un processus dynamique qui requiert un équilibre entre les activateurs et les inhibiteurs agissant à différentes étapes. Plusieurs inhibiteurs physiologiques de la coagulation ont été identifiés durant les 40 dernières années.

Un nouvel inhibiteur a été mis en évidence, il s'agit du complexe protéine Z (PZ)/inhibiteur dépendant de la PZ(ZPI) (1).

La PZ a été identifiée pour la première fois en 1977 par Prowse et Esnouf (1) à partir d'un plasma bovin. Il s'agit de la dernière protéine à éluer sur une chromatographie d'échange d'anions (d'où le patronyme Z).

L'équivalent humain de la PZ bovine a été isolé en 1984 par Broze et Miletich (3).

La protéine Z n'a pas de fonction protéolytique, seul le complexe PZ/ZPI possède cette fonction et inhibe le facteur Xa. Elle se comporte alors comme une héparine de bas poids moléculaire naturelle en développant une activité anti-Xa.

La PZ a été largement étudiée ces dernières années dans diverses pathologies essentiellement thrombotiques.

La Protéine Z : Structure et synthèse

La protéine Z est une glycoprotéine monocaténaire de poids moléculaire égal à 62000 Da. Elle peut être clivée dans sa partie NH₂ terminale par la thrombine en une protéine de 56000 Da (3,4). Elle présente une homologie structurale de 59% avec la protéine Z bovine et contient 13 résidus acides γ carboxy-glutamiques dans les positions 7,8,11,15,17,20,21,26,27,30,33,35, et 40. Elle est formée de 360 acides aminés (AA). Récemment, un modèle de structure de la PZ humaine a été proposé. Cette approche insiste sur le rôle du résidu

glutamique en position 30 dans la stabilisation et la sécrétion de la protéine (5).

Le gène de la PZ est situé sur le chromosome 13, il mesure 14 kbases et est constitué de 9 exons dont un exon alternatif (6).

La PZ est synthétisée majoritairement par le foie.

Cependant, sa synthèse par les cellules endothéliales humaines a été mise en évidence (7). Elle subit plusieurs modifications post-ribosomales communes avec les autres facteurs vitamine K dépendants notamment une β - hydroxylation d'un résidu acide aspartique en position 64 et une carboxylation de l'acide glutamique présent à son extrémité - COOH (7).

Plusieurs polymorphismes de la PZ ont été identifiés. Les 2 polymorphismes A13G, et G79A influencent la concentration plasmatique de la PZ. En effet, les taux les plus bas sont associés avec les génotypes GG et AA (8).

Le résidu glutamique 30 joue un rôle important dans la sécrétion de la PZ. Une mutation lysine de ce résidu (E30Q) est associée à un défaut de sécrétion de la PZ (9).

Le ZPI : structure et synthèse

Le ZPI est une protéine de poids moléculaire 72000 Da, purifiée à partir du plasma humain en 1998 (10) et clonée en 1999 (11).

Il est constitué de 423 AA et présente 25 à 35% d'homologie avec les membres de la superfamille des serpins (inhibitrices des sérines protéases).

Son centre actif est composé d'un résidu tyrosine en position 387 et d'une sérine en 388. La substitution du résidu tyrosine par une alanine lui fait perdre son activité biologique (11). Le foie semble être le principal lieu de synthèse du ZPI (11).

Mode d'action du complexe PZ/ZPI

La protéine Z est le cofacteur du ZPI et son rôle est de le présenter à la surface phospholipidique (12).

Le plasma humain contient un excès de ZPI par rapport à la protéine Z et toute la protéine Z apparaît complexée au ZPI (13).

Le ZPI inhibe le facteur Xa à la surface des phospholipides, en présence de calcium et de PZ comme le montre la figure n°1 (14). De ce fait, le complexe PZ/ZPI joue le rôle d'une héparine de bas poids moléculaire naturelle en développant une activité anti Xa.

La PZ augmente in vitro d'environ 1000 fois la vitesse d'inhibition du facteur Xa par le ZPI (15). L'action anticoagulante de la PZ précède l'activation du facteur V et la formation du complexe prothrombinique. Ceci a été démontré in vitro par la diminution de la génération de thrombine dans un mélange de prothrombine, de facteur V, de phospholipides et de calcium.

Le ZPI est capable également d'inhiber in vitro l'activité du facteur XIa et cela indépendamment de la PZ, de phospholipides ou de calcium (15).

Le ZPI entre en compétition avec d'autres inhibiteurs du facteur XIa comme l' α_1 antitrypsine, l'inhibiteur de la C1 estérase, ou du facteur IX, principal substrat du facteur XIa. L'importance physiologique de cette inhibition reste à établir (15).

Dosage et valeurs usuelles de la protéine Z

Le recueil et le traitement du plasma

Le prélèvement est effectué sur citrate trisodique 0,109 M puis il est centrifugé 10 minutes à 2500 g entre 2 et 8°C.

Les échantillons peuvent être conservés 4 heures à température ambiante, 8 h à 2-8°C ou 1 mois à -20°C. (16,17,18).

Les méthodes de dosage :

La faible concentration plasmatique en PZ nécessite l'emploi de méthodes immuno-chimiques et immuno-enzymatiques suffisamment sensibles. Les techniques les plus utilisées sont : la méthode de Laurell sur gel d'agarose contenant un antisérum de lapin anti-PZ, et la technique ELISA (17,18,19).

Les valeurs normales recensées dans la littérature varient de 0,63 à 5,67 $\mu\text{g/ml}$ (Tableau I)

Variations physiopathologiques :

Les variations physiologiques :

- *En fonction de l'âge :*

Comme les autres facteurs vitamine K dépendants, le taux plasmatique de PZ est très diminué à la naissance en raison de l'immaturation hépatique du nouveau-né.

La PZ augmente rapidement durant les premiers jours de vie, suivie par une augmentation plus lente pendant l'enfance pour atteindre les taux adultes à la puberté (17). Chez l'adulte, aucune corrélation entre le taux de PZ et l'âge n'a pu être déterminée (18). Le taux de PZ semble être stable au cours du temps d'après deux études effectuées sur une période de deux ans par l'équipe de Ravi (20) et celle de Vasse (21), suggérant d'avantage un contrôle génétique du taux de la PZ.

- *En fonction du sexe :*

Aucune corrélation entre le taux de PZ et le sexe n'a pu être mise en évidence dans la majorité des études (22,23). Cependant, certaines équipes ont trouvé un taux plus élevé chez les hommes (24,25,26).

- *Cas particulier de la grossesse :*

Une augmentation progressive de la PZ durant la grossesse a été décrite. Le retour à la normale s'effectue 6 à 12 semaines après le post-partum. Cette augmentation est surtout observée chez les femmes obèses (27).

Les variations pathologiques

- *L'insuffisance hépatique :*

La PZ étant synthétisée au niveau du foie, une insuffisance hépatique aura donc une influence négative sur ses taux plasmatiques (28).

- *Le traitement par un anticoagulant oral :*

La concentration plasmatique de la PZ diminue plus fortement que celles des autres facteurs vitamine K dépendants quand un traitement oral est instauré. Ainsi, la PZ est le marqueur d'un traitement par les antivitamines K le plus sensible comparé aux autres facteurs vitamine K dépendants (29).

- *Le syndrome inflammatoire :*

Une augmentation de la concentration de la PZ est notée dans les inflammations. Elle pourrait être due à une régulation par des cytokines de l'inflammation. Son taux est particulièrement élevé dans les arthrites rhumatoïdes

Tableau I : valeurs normales de la PZ selon certaines études

Etude	Année	Technique	Nombre de plasma Nature de l'anticoagulant	Moyenne µg/ml	Valeurs extrêmes µg/ml	Population
Broze (3)	1984	LAURELL	10 sur sang citraté	2.200+/- 0.400	1.600- 2.950	Américaine
Miletich (16)	1987	ELISA	455 sur sang EDTA	2.900+/- 0.100	0.630- 5.670	Américaine
Kemkes (28)	1995	ELISA	24 sur sang citraté	2.680+/- 0.490	NR	Allemande
Gamba (19)	1998	ELISA	27 sur sang citraté	2.540+/- 0.770	1.000- 4.000	Italienne
Ravi (24)	1998	ELISA	200 sur sang citraté	1.424+/- 0.552	0.284- 2.690	Suisse
Vasse (22)	2001	ELISA	88 sur sang citraté	2.230+/- 0.640	1.010- 3.570	Française
Gris (59)	2002	ELISA	200 sur sang citraté	2.080+/- 0.420	0.680- 3.250	Française

NR : non recensées.

et les lymphomes (21).

- *Autres pathologies :*

On note une diminution du taux de la PZ dans le syndrome néphrotique (30,31), les pathologies rénales (29), au cours de la maladie de Behçet (32) et chez les patients atteints de tumeurs malignes (33).

En revanche, les concentrations plasmatiques de PZ sont augmentées en cas d'hémodialyse chronique (34), de dialyse péritonéale (35), ou de contraception orale (36) et normales dans les neuropathies optiques (37).

Implication de la protéine Z en clinique

La PZ et le syndrome hémorragique inexpliqué.

La PZ a une action inhibitrice de la coagulation. Son déficit apparaît plutôt comme thrombotique. Cependant, une étude réalisée par Barth et al (38) chez un groupe de patients à tendance hémorragique en per et post opératoire d'origine inconnue a suggéré que le déficit en PZ pourrait s'accompagner de manifestations hémorragiques mais cette première observation n'a pas été confirmée par d'autres études.

La PZ et les pathologies thrombotiques

La PZ et les thromboses veineuses :

La majorité des études ont démontré qu'il n'existe aucune corrélation entre l'apparition de thromboses veineuses profondes et les taux plasmatiques de PZ et de

ZPI, chez des patients porteurs ou non de la mutation du facteur V Leiden. Ceci a été démontré par quatre études groupant au total 1122 patients présentant des manifestations thrombotiques, et qui ont trouvé des taux normaux de la PZ chez les malades et les contrôles (39,40,41,42).

En revanche l'équipe de Kemkes-Matthes (43) a mis en évidence sur une étude de 46 patients que l'association de la mutation du facteur V Leiden et le déficit en PZ, accentue le risque de survenue du premier épisode thrombotique et augmente le nombre de récurrences des thromboses chez ces patients.

La PZ et les thromboses artérielles :

- *Le syndrome coronarien aigu :*

Plusieurs études ont démontré qu'il existe une association significative entre les taux diminués de PZ et la survenue d'un syndrome coronarien aigu (infarctus du myocarde, angor instable) (25,44,45,46).

Ces résultats sont remis en cause par l'équipe de Staton (47) qui a démontré que des taux augmentés de PZ sont retrouvés chez des patients ayant présenté un syndrome coronarien aigu. De même, l'étude PRISME (48) qui a inclus 10000 sujets contrôles âgés de 50 à 59 ans et suivis pendant 5 ans, n'a trouvé aucune association entre un taux diminué de PZ et le risque de survenue de syndrome coronarien aigu.

- *Les accidents vasculaires cérébraux (AVC).*

Les études qui ont étudié l'implication de la PZ dans les

AVC sont controversées. En effet trois situations se présentent selon les auteurs :

- Taux bas en PZ et AVC : Les équipes de Vasse et de Heeb (22,26) ont démontré qu'il existe une corrélation entre un taux diminué en PZ et les AVC. Ces auteurs considèrent le déficit en PZ comme un facteur de risque isolé d'AVC chez les sujets âgés de moins de 58 ans. L'étude ARIC (49), qui a suivi 16000 personnes pendant une durée moyenne de 9.7 ans, a montré également une association entre un taux bas de PZ et la survenue d'AVC chez les noirs américains. Récemment, Sofi et al (24) ont trouvé des taux diminués de PZ (antigène et activité) dans diverses pathologies artérielles. Ces auteurs considèrent le déficit en PZ comme risque majeur de maladies cardiovasculaires.
- Taux élevé en PZ et AVC : L'étude de Kobelt en 2001 (50) qui a inclus 125 patients ayant présenté un AVC et dont l'âge moyen est de 41 ans a démontré qu'il existe une corrélation entre un taux élevé de PZ et le risque d'AVC. Des taux très élevés de PZ (> 160%) multiplient par 4 le risque d'AVC selon cette étude.
- La PZ non impliquée dans l'AVC : En 2002 Lopaciuk (51) a conclu qu'il n'existe aucune corrélation entre le taux de PZ et le risque d'AVC. Cet auteur a évalué le taux de PZ chez 99 patients dont l'âge moyen est de 38 ans et dont les causes de l'accident ischémique sont connues et multiples. Les résultats sont comparés à ceux de 30 sujets contrôles, et aucune différence significative en taux de PZ n'a été trouvée chez les 2 groupes.

Polymorphisme de la PZ et thrombophilie

14 polymorphismes de la PZ ont été identifiés (52), certains sont plus fréquents que d'autres : le polymorphisme A136, l'insertion ou la délétion en 3' de l'intron C, et le polymorphisme G79A. Cette dernière mutation n'est pas associée aux syndromes coronariens selon Cesari (53).

Il a été décrit la présence de la mutation R255H sur le gène de la PZ chez deux patients porteurs de la mutation du facteur V Leiden qui avaient présenté des événements thrombotiques plus fréquents que d'autres patients porteurs de la mutation V Leiden sans substitution R255H (54).

Une autre mutation du gène de la PZ (E30Q) a été décrite chez une patiente porteuse du polymorphisme G79A et ayant présenté de multiples thromboses veineuses profondes et fausses couches spontanées (9).

En 2006, l'équipe de Corral a étudié le gène du ZPI chez des patients âgés de moins de 60 ans ayant présenté de multiples thromboses veineuses profondes et/ou embolies pulmonaires comparativement à un groupe témoin. Les résultats de cette étude ont montré qu'il existe une plus grande incidence de mutations et de polymorphismes dans le groupe de patients en particulier les mutations R67X et W303X qui aboutissent à des codons stop et donc à un déficit en ZPI. Ainsi le déficit en ZPI est proposé comme étant une nouvelle forme de thrombophilie (55).

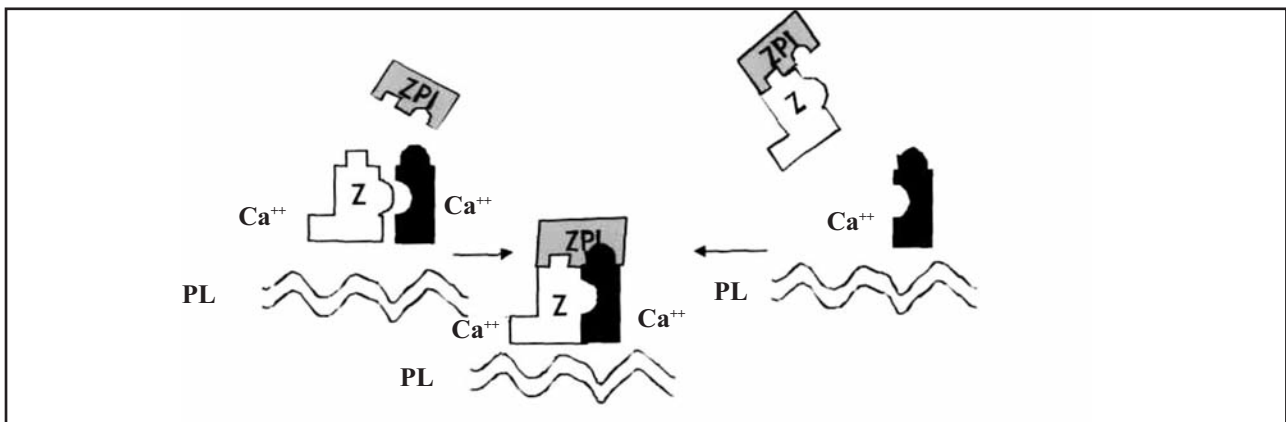


Figure 1 : Mécanisme de l'inhibition du facteur Xa par le complexe PZ/ZPI (4)

PZ et syndrome des antiphospholipides :

Une diminution de la concentration de la PZ a été observée chez des patients ayant le syndrome des antiphospholipides (56,57). Le déficit en PZ a été également noté chez des patients lupiques avec ou sans anticorps anticardiolipines (57). La fréquence du déficit en PZ est remarquablement plus élevée chez les patients ayant tous les critères diagnostiques du syndrome des antiphospholipides par rapport aux patients n'ayant pas la totalité des critères clinico-biologiques (respectivement 24.3% versus 10.3%). Il a été démontré *in vitro* que les anticorps antiphospholipides diminuent considérablement l'inhibition du facteur X par le complexe PZ/ZPI. L'existence d'anticorps anti-PZ dans le syndrome d'antiphospholipides a été démontrée. Ces anticorps sont associés surtout aux antiphospholipides de nature IgM (58).

PZ et les pertes fœtales à répétition

A propos d'un rôle possible de la PZ dans les complications obstétricales, les résultats des différentes études sont également controversés. Gris et al (59) ont étudié le taux de PZ chez 3 groupes de femmes ayant présenté des fausses couches à différents stades de la grossesse (groupe 1 : 200 femmes ayant eu au moins 3 pertes fœtales avant la 8^{ème} semaine de grossesse, groupe 2 : 200 femmes ayant eu au moins une fausse couche entre la 10^{ème} et la 19^{ème} semaine de grossesse, et groupe 3 : 50 femmes avec une mort foetale *in utero* après la 20^{ème} semaine de grossesse).

Les résultats de cette étude ont montré que le déficit en PZ est statistiquement plus élevé chez les femmes ayant fait une fausse couche entre la 10^{ème} et 19^{ème} semaine de grossesse (groupe 2)

En 2004, l'équipe de Grandone (37) a évalué les taux de PZ, deux mois après la perte fœtale chez 124 femmes ayant présenté des complications obstétricales. Aucune corrélation n'a été montrée entre un éventuel déficit en PZ et l'apparition de fausses couches.

Paidas et al en 2005 (60) ont démontré que l'association d'un déficit en PZ et en protéine S constitue une combinaison synergique qui favorise l'état pro thrombotique chez la femme enceinte.

Une étude cas-témoin (61) a montré qu'il existe une cor-

rélation entre un taux diminué de PZ et les morts fœtales intra-utérines ainsi qu'avec le retard de croissance intra-utérin. L'examen du placenta chez ces patientes montre la présence de thromboses dans 50% des cas.

Conclusion

La PZ est un inhibiteur physiologique de la coagulation. Elle potentialise l'inhibition du facteur Xa par le ZPI. Le rôle de la PZ dans la survenue de différentes pathologies a été étudié par plusieurs auteurs. Si son rôle dans les hémorragies reste encore à établir, son rôle dans les manifestations thrombotiques a été rapporté par plusieurs équipes et controversés par d'autres. Cependant, les études cliniques semblent indiquer qu'un déficit en PZ est un facteur de risque de pathologies thrombotiques surtout lorsqu'il est associé à la mutation Leiden du facteur V. Certaines études cliniques ont rapporté également l'association du déficit en PZ et la survenue de fausses couches à répétition. De ce fait, le dosage de la PZ plasmatique pourrait représenter un élément d'appoint dans le bilan étiologique chez des femmes ayant présenté des pertes fœtales à répétition.

Bibliographie

1. Prowse CV, Esnouf MP « The isolation of a new warfarine sensitive protein from bovine plasma Biochem soc trans 1977, 5(1) : 255-6
2. Han X, Fiehler R, Broze GJ Jr « Characterization of the protein Z – dependent protease inhibitor. » Blood 2000; 96(9): 3049-55.
3. Broze GJ Jr, Miletich JP « Human protein Z » J clin invest 1984, 73(4): 933-8.
4. Vasse M. Protein Z, a protein seeking a pathology. Thromb Haemost 2008; 100(4): 548-56.
5. Lee CJ, Chandrase Qaran V., Duke R.E., Perera L., Pedersen LG.
A proposed structural model of human protein Z. J Thromb Haemost 2007; 5: 1558-61.

6. Fujimaki K., Yamazaki J., Taniwaki M, Ichinose A. The gene for human protein Z is localized to chromosome 13 at band q34 and is coded by eight regular exons and one alternative exon. *Biochemistry* 1998; 37(19): 6838-46.
7. Vasse M, Denoyelle C, Corbiere C, Litzler PY, Legrand E, Vannier JP Human endothelial cells synthesize protein Z, but not the protein Z dependant inhibitor. » *Thromb Haemost* 2006, 95 (3): 519-23
8. Sofi F, Cesari F, Gensini GF, Abbate R, Fedi S « Protein Z levels, protien Z G79A polymorphism and prothrombotic conditions. » *Stroke* 2005, 36(9): 1821-2
9. Souri M, Koseki-Kuno S, Iwata H, Kemkes-Matthes B, Ichinose A . A naturally occurring E30Q mutation in the Gla domain of protein Z causes its impaired secretion and subsequent deficiency. *Blood* 2005, 105(8): 3149-54
10. Han X, Fiehler R, Broze GJ Jr . Isolation of a protein Z dependent plasma protease inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95 (16): 9250-5.
11. Han X, Huang ZF, Fiehler R, Broze GJ Jr « The protein Z dependant protease inhibitor is a serpin. » *Biochemistry* 1999, 38(34): 11073-8
12. Magy N « La protéine Z : un nouvel élément du bilan de thrombophilie ? » *Rev Med interne* 2005, 26 : 891-893
13. Broze GJ Jr. Protein Z and thrombosis. *Lancet* 2001, 357(9260): 900-1
14. Rezaie AR. Determinants of specificity of factor Xa interaction with its physiological inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 2006, 6(8): 859-65
15. Broze Jr. Protein Z dependant regulation of coagulation. *Throm Haemost* 2001, 86(1): 8-13
16. Miletich JP, Broze GJ Jr « Human plasma protein Z antigen: range in normal subject and effect of warfarine therapy » *Blood* 1987, 69 (6): 1580-6
17. Yurdakok M, Gurakan B, Ozbag E, Vigit S, Dundar S, Kirazli S
Plasma protein Z levels in healthy newborn infants. *Am J Hemato.* (1995, 48(3): 206-7.
18. Al Shanqeeti AA, Van Hylckama Vlieg A, Berntorp E, Rosendaal FR, Broze GJ Jr. Protein Z and protein Z-dependant protease inhibitor: determinants of levels and risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2005, 93(3): 411-3
19. Gamba G, Bertolino G, Montani N, Spedin P, Balduini CL . Bleeding tendency of unknown origin and protein Z levels. *Thromb Res.* 1998, 90(6): 291-5.
20. Ravi S, Mauron T, Lammle B, Wuillemin WM . Protein Z in healthy individuals and in patients with a bleeding tendency. *Br J Haematol* 1998, 102 (5): 1219-23
21. Vasse M., Denoyelle C., Legrand E., Vannier JP., Soria C. Weak regulation of protein Z biosynthesis by inflammatory cytokines. *Thromb Haemost* 2002, 87(2) : 350-1.
22. Vasse M, Guegan -Massardier E, Borg JY, Woimant F, Soria C
Frequency of protein Z deficiency in patients with ischaemic stroke. *Lancet* 2001, 357 (9260): 933-4
23. McQuillan AM, Eikelboom JW, Hankey GJ, Baker R, Thom J, Staton J Yi Q, Cole V. Protein Z in ischemic stroke and its etiologic subtypes. *Stroke* 2003, 34(10): 2415-9
24. Sofi F, Cesari F, Tu Y, Pratesi G, Pulli R, Pratesi C, Gensini GF, Abbate R, Broze GJ Jr. Protein Z-dependent protease inhibitor and protein Z in peripheral arterial disease patients. *J Thromb Haemost.* 2009, 7(5):731-5
25. Fedi S, Sofi F, Brogi D, Tellini I, Cesari F, Sestini I, Gazzini A, Comeglio M, Abbate R, Gensini F.
Low protein Z plasma levels are independently associated with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost* 2003, 90(6): 1173-8
26. Heeb MJ, Paganini-Hill A, Griffin JH, Fisher M
Low protein Z levels and risk of ischemic stroke: differences by diabetic status and gender. *Blood Cell Mol Dis* 2002, 29(2): 139-44
27. Quack Loetscher KC, Stiller R, Roos M, Zimmermann R
Protein Z in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 2005, 93(4): 706-9
28. Kemkes-Matthes B, Matthes JK. Protein Z, a new haemostatic factor in liver disease. *Haemostasis.*1995,25(6):312-6
29. Malyszko JS, Malyszko J, Skrzydlewska E, Pawlak K, Mysliwiec M . Protein Z and vitamin K in kidney disease. *Rocz Akad Med Bialymst* 2004, 49: 197-200
30. Malyszko J, Malyszko JS, Mysliwiec M. Markers of endothelial cell injury and thrombin activable fibrinolysis inhibitor in nephrotic syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002, 13(7): 615-21

31. Ozkaya O, Bek K, Fisgin T, Aliyazicioglu Y, Sultansuyu S, Acikgoz Y, Albayarak D, Baysal K. Low protein Z levels in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2006, 21(8): 1122-6
32. Ozturk MA, Ozbalkan Z, Onat AM, Ertenli I, Kiraz S, Aytemir K, Ureten K, Abali G, Calguneri M, Kirazli S, Haznedaroglu IC. Decreased protein Z concentration complicating the hypercoagulable state of Behcet's disease. *Clin Appl Throm Hemost* 2003, 9(3): 259-63
33. Shang Y, Pan XY, Ding CP, Yang XM, Cai XY, Ding Y, Zhang RL. Clinical significance of protein Z detection in patients with malignant tumors. *Ai Zheng* 2005, 24(9) : 1144-7
34. Usulan C, Erdem Y, Altun B, Arici M, Haznedaroglu IC, Yasavul U, Turgan C, Caglar S. Protein Z levels in haemodialysis patients. *Int Urol Nephrol* 1999, 31(4): 541-5
35. Malyszko J, Skrzydlewska E, Malyszko JS, Mysliwiec M. Protein Z, a vitamin K dependant protein in patients with renal failure. *J Thromb Haemost* 2003, 1(1): 195-6
36. Grandone E, Colaizzo D, Cappuci F, Cocomazzi N, Margaglione M. Protein Z levels and unexplained fetal losses. *Fertil Steril* 2004, 82(4): 982-3
37. Asprondis I, Felekis TL, Gorezis S, Dova L, Dokou E, Vartholomatos G, Aspiotis M, Kolaitis NI. Protein Z plasma levels are not elevated in patients with non-arteric anterior ischemic optic neuropathy. *Open Ophthalmol J*. 2009. 3:15-9
38. Barth J, Rohl K, Jager D. Protein Z deficiency as a rare cause of perioperative bleeding. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2003, 38(9): 605-8
39. Santacroce R., Sarno M., Capucci F, Sessa F, Colaizzo D, Brancaccio V, Grandone E, Margaglione M. Low Protein Z levels and risk of occurrence of deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2006; 4(11): 2417-22.
40. Martinelli I, Razzari C., Biguzzi E, Bucciarelli P, Manucci PM. Low levels of protein Z and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2005; 35(12): 2817-9.
41. Michiels JJ. Low protein Z associated with venous thrombophilia and with ischemic stroke. *Semin Vasc Med*. 2002; 2(2): 121-4
42. Al-Shanqueeti A., Van Hylckama Vlieg A., Berntorp E, Rosendaal FR, Broze GJ Jr. Protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor. Determinants of levels and risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2005; 93(3): 411-3.
43. Kemkes-Matthers B, Nees M, Cuhnel G, Matzdorff A, Matthes KJ. Protein Z influences the prothrombotic phenotype in Factor V Leiden patients. *Thromb Res* 2002, 106(4-5): 183-5
44. Pan XY, Ding CP, Zhong LY, Huang XM, Zhou WX, Guo Y, Yin JZ, Cai XY, Guan ZB, Zhang RL. Clinical significance of protein Z alteration in patients with cardio-cerebral thrombotic diseases. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2004, 25(11): 671-4
45. Sofi F, Cesari F, Vigiani S, Fatini C, Marcucci R, Giglioli C, Valente S, Abbate R, Gensini GF, Fedi S. Protein Z plasma levels in different phases of activity of coronary atherosclerosis. *J Thromb Haemost*. 2005, 3(10): 2254-8
46. Sofi F, Cesari F, Marcucci R, Fatini C, Gori AM, Giglioli C, Valente S, Fedi S, Abbate R, Gensini GF. Protein Z levels and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Clin Chem Lab Med* 2006, 44(9): 1098-102
47. Staton J, Sayer M, Hankey GJ, Cole V, Thom J, Eikelboom JW. Protein Z gene polymorphisms, protein Z concentrations and ischemic stroke. *Stroke* 2005, 36(6): 1123-7
48. Morange PE., Juhan-Vague I. Protein Z plasma levels are not associated with the risk of coronary heart disease: The Prisme Study. *J Thromb Haemost*. 2004; 2(11): 2050-1.
49. Refaai MA., Ahn C, Lu L, Wu K, Broze GJ Jr. Protein Z and ZPI levels and cardiovascular events. *J Thromb Haemost*. 2006; 4(7): 1628-9.
50. Kobelt K, Biasutti FD, Mattle HP, Lammler B, Willemin WA. Protein Z in ischaemic stroke. *Br J Haematol* 2001, 114(1) : 169-73
51. Lopaciuk S, Bykowska K, Kwiecinski H, Czlonkowska A, Kuczynska-Zardzewialy A. Protein Z in young survivors of ischemic stroke. *Thromb Haemost* 2002, 88(3): 536
52. Rice GI, Futers TS, Grant PJ. Identification of novel polymorphisms within the protein Z gene, haplotype distribution and linkage analysis. *Thromb Haemost* 2001, 85(6): 1123-4.

- 53.** Cesari F., Fatini C., Sticchi E., Fedi S., Abbate R., Gensini GF., Sofi F. Protein Z gene polymorphisms (intron F79 G>A ; -13A>G) are note associated with acute coronary syndromes. *Thromb haemost* 2006, 96(1): 98-9.
- 54.** Kemkes-Matthes B, Matthes KJ, Sourì M, Koseki-Kuno S, Ichinose A. R255h amino-acid substitution of protein Z identified in patients with factor V Leiden mutation. *Br J Haematol* 2005, 128(2): 248-52
- 55.** Corral J, Gonzalez-Conejero R, Soria JM, Gonzalez-Porras JR, Peres-Ceballos E, Iecumberri R, Roldan V, Souto JC, Minano A, Hernandez-Espinosa D, Alberca I, Fontcuberta J, Vicente V.
A nonsense polymorphism in the protein Z dependant protease inhibitor increases the risk of venous thrombosis. *Blood* 2006, 108(1): 177-83
- 56.** Steffano B., Forastiero R., Martimuzzo M, Kordich L.
Low plasma protein Z levels in patients with antiphospholipid antibodies. *Blood coagul Fibrinolysis* . 2001; 12(5): 411-2.
- 57.** McColl MD, Deans A., Maclean P, Tait RC, Greer IA, Walker ID,
Plasma Protein Z deficiency is common in women with antiphospholipid antibodies . *Br J Haematol* 2003; 120(5): 913-4.
- 58.** Sailer T., Vormittag R, Koder S, Quehenberger P., Kaider A., Pabinger I.
Clinical significance of antiprotein Z antibodies in patients with lupus anticoagulant. *Thromb Res.* 2008; 122 (2): 153-60.
- 59.** Gris JC, Quéré I, Dechaud H, Mercier E, Pinçon C, Hoffet M, Vsse M, Marès P.
High frequency of protein Z deficiency in patients with unexplained early foetal loss. » *Blood* 2002, 99(7): 2606-8
- 60.** Paidas M, Ku DH, Lee MJ, Manish S, Thurston A, Lockwood CJ, Arkel YS. Protein Z, protein S levels are lower in patients with thrombophilia and subsequent pregnancy complications. *J Thromb Haemost* 2005, 3(3): 497-501
- 61.** Bretelle F, Arnoux D, Shojai R, D'Ercole C, Sampol J, Dignat F, Camoin-Jan L. Protein Z in patients with pregnancy complications. *Am J Obstets Gynecol* 2005, 193(5): 1698-702.

Les milieux gélosés chromogènes en microbiologie clinique

S. MAHFOUDH¹,
B. JEMLI²,
L. BAKIR¹,
S. GARGOURI²

¹ Service Laboratoire de
Biologie Clinique, CHU
Mongi Slim de La Marsa
² Service de Parasitologie,
Hôpital Militaire de Tunis

Résumé : Le développement des milieux chromogènes constitue une des principales innovations dans le diagnostic microbiologique ces 20 dernières années. En se basant sur l'activité enzymatique des microorganismes, ces milieux ont permis une détection et une identification directe, rapide et spécifique des germes par rapport aux milieux classiques. Grâce à leurs nombreuses applications, ces milieux chromogènes ont facilité le diagnostic microbiologique en routine.

Mots clés : milieux chromogènes, substrats enzymatiques

Summary : Since 1990, a wide range of chromogenic culture media has been developed. By the inclusion of chromogenic enzyme substrates targeting microbial enzymes, such media are able to detect and identify microorganisms in polymicrobial cultures with high specificity and reducing time. The introduction of these media has led to facilitate and to perform microbiology diagnostic in routine.

Keywords : chromogenic media, enzyme substrates

Introduction

Depuis les années soixante-dix, les techniques de diagnostic utilisant les substrats chromogènes ont révolutionné la microbiologie classique (tests rapides d'identification, systèmes API, automates d'identification...). Les milieux de culture constituent l'une des principales applications de ces substrats chromogènes. Le premier brevet a été déposé en 1979 par Alain Rambach pour son milieu chromogène de détection d'*E. coli*, mais ce n'est qu'en 1989 qu'a commencé la diversification de ce type de milieux avec la commercialisation de divers géloses comme par exemples la gélose Rambach Agar SalmonellaTM (Technogram) utilisée pour les coprocultures et la gélose CPS IDTM (bioMérieux) ou UriselectTM (BioRad) utilisés pour les germes urinaires. Les premiers milieux ont permis surtout de différencier les colonies entre elles. A partir des années 1990, ces milieux ont commencé à être bien connus et à intégrer les méthodes normatives vu les nombreux avantages qu'ils ont apporté à l'identification phénotypique des microorganismes. En effet, les différentes étapes d'isolement, de subculture et d'identification sont longues et

consomment beaucoup de réactifs. Les milieux chromogènes permettent une détection et parfois même une identification directe, rapide et spécifique des microorganismes par rapport aux milieux classiques (1, 2, 3).

Principe des milieux chromogènes

Les chromogènes sont des molécules de synthèse, incolores. Ce sont des analogues structuraux de molécules naturellement clivées par les enzymes bactériennes ou fongiques. Le chromogène est constitué d'une association d'un chromophore, molécule colorée et d'un auxochrome, qui module l'intensité de la couleur (4). Lorsque le chromogène subit l'action d'un enzyme spécifique d'une bactérie ou d'une levure, il y a libération du chromophore, encore appelé aglycone qui va colorer la colonie (figure 1) (3,4). Les milieux chromogènes contiennent donc un ou des substrats qui vont révéler une activité enzymatique spécifique d'un ou de plusieurs microorganismes (3).

1. Spécificité de l'activité enzymatique

Le microorganisme à rechercher doit posséder l'enzyme

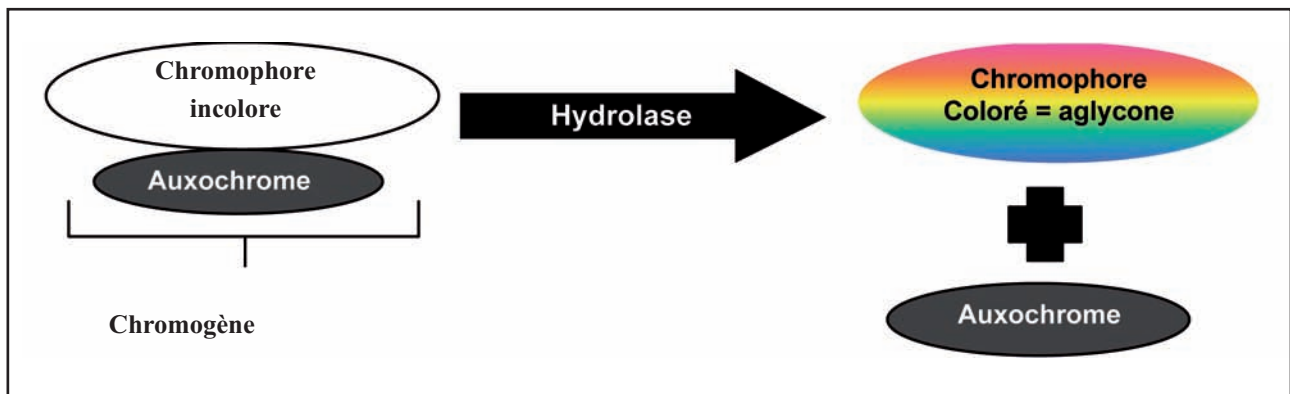


Figure 1 : Principe des milieux chromogènes

nécessaire à l'hydrolyse du substrat chromogène utilisé. En effet, les enzymes mis en évidence appartiennent au métabolisme bactérien ou fongique, elles doivent être spécifiques d'une seule partie du substrat utilisé. Plusieurs enzymes ont été ciblés, notamment des glycosidases (galactosidase, glucosidase, glucuronidase...), mais aussi des estérases et des peptidases spécifiques de certaines bactéries (tableau 1) (3, 4).

2. Choix des substrats chromogènes

Le choix des substrats introduits dans les milieux est dicté par les activités enzymatiques que l'on souhaite révéler et par les propriétés physico-chimiques du substrat. Les critères requis sont :

- le chromogène et son produit de dégradation ne doivent pas inhiber la croissance bactérienne ou fongique (2, 4).
- Pour les milieux gélosés, la coloration obtenue après hydrolyse du chromogène doit être insoluble dans l'eau afin de ne pas diffuser dans la gélose et se restreindre à la colonie, contrairement aux milieux liquides utilisés en bactériologie alimentaire où les aglycones, de type nitrophényl sont solubles (3, 4, 5).

Parmi les chromogènes utilisés dans la préparation de ces milieux, on cite :

- L'indoxyl et ses dérivés : ce sont les substrats les plus utilisés dans la préparation des milieux de culture. L'indoxyl s'oxyde rapidement à l'air en un dimère bleu indigo, insoluble dans l'eau. Plusieurs substitutions au niveau de la fonction indole de la molécule, ont permis

d'obtenir des esters ou des dérivés glycosylés solubles dans l'eau et dont les couleurs varient du bleu au rouge, et ne diffusent pas dans le milieu gélosé. On peut citer comme exemples : Magenta™ (rouge) et Salmon™ (rose) (1, 4, 5). Les dérivés glycosylés de l'indoxyl sont très utilisés dans la préparation des milieux de culture du fait de leur haute sensibilité, leur faible toxicité et leur disponibilité (Tableau 1) (4).

- Autres chromogènes :

3,4 cyclohexenoesculine, 8-hydroxyquinoline, alizarine et 3',4'hydroxyflavone...(4, 5).

Principales applications

Les applications des milieux chromogènes utilisés en microbiologie clinique dérivent des nombreuses applications de milieux développés en microbiologie alimentaire (3). Certains milieux permettent de repérer un agent pathogène minoritaire parmi la flore commensale dans un prélèvement plurimicrobien. Dans ce cas, de nombreux enzymes sont détectés. Un mélange de substrats est incorporé dans la gélose afin d'avoir plusieurs couleurs. La couleur de la colonie est alors une expression d'un ou de plusieurs enzymes et donc la superposition de plusieurs couleurs ; on peut citer par exemple le milieu AES Salmonella Agar Plate™ (ASAP) (AES CHEMUNEX) pour la détection et l'identification présumptive des Salmonella (figure 2) (2,3).

D'autres milieux permettent de détecter et parfois même

Tableau 1 : Principaux enzymes et substrats utilisés dans les milieux chromogènes (4)

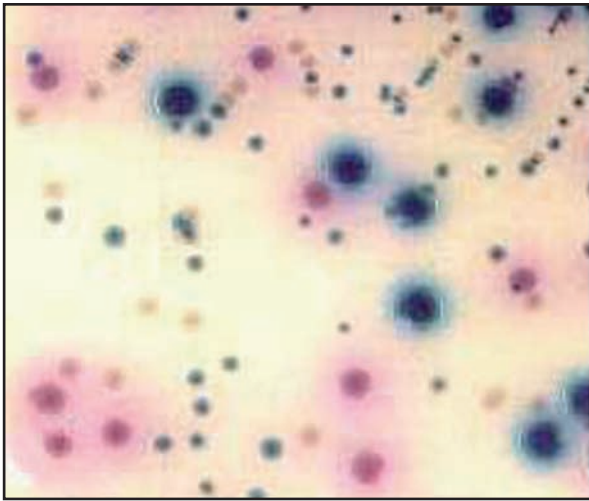
	Enzymes	Substrats	Microorganismes
Glycosidases	α -galactosidase	indoxyl indoxyl	<i>Salmonella</i> <i>E. coli</i> O157 : H7
	β -galactosidase	indoxyl indoxyl indoxyl Alizarine	<i>E. coli</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>E. coli</i> O157 : H7 Enterocoque résistant à la vancomycine
	α -glucosidase	indoxyl indoxyl indoxyl	<i>S. aureus</i> <i>S. aureus</i> résistant à la méticilline Enterocoque résistant à la vancomycine
	β - glucosidase	indoxyl	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter</i>
		indoxyl indoxyl indoxyl indoxyl indoxyl	Entérobactéries β LSE <i>Vibrio</i> Enterocoques Enterocoque résistant à la vancomycine <i>C. keyfir, C. tropicalis, C. lusitaniae</i>
	β -glucuronidase	4-MUG, indoxyl indoxyl indoxyl	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i> β LSE <i>Streptococcus agalactiae</i>
	β -ribofuranosidase	indoxyl, 3,4 dihydroxyflavone	<i>Yersinia enterocolitica</i>
	hexosaminidase	indoxyl	<i>C. albicans, C.dublinsiensis</i>
Estérases	lipase	indoxyl	<i>Salmonella</i>
	phosphatase	indoxyl indoxyl indoxyl	<i>S. aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Candida spp.</i>
Arylamidase / peptidase	β -alanyl arylamidase	7-amido-1-pentyl- phenoxazin-3-one	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

α LSE : Beta-lactamase à spectre élargi, S. : Staphylococcus, C.: Candida, MUG : méthyllumbelliféryl- α -D-glucuronide.

d'identifier une seule espèce présentant un intérêt clinique. Dans ce cas un substrat spécifique du germe est intégré dans la gélose. Des agents sélectifs peuvent être additionnés au milieu tel que les antibiotiques ; exemple : milieu de détection et d'identification de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) (2, 3).

1. Détection des microorganismes uropathogènes

L'examen cyto bactériologique des urines (ECBU) représente une grande partie de l'activité d'un laboratoire de bactériologie clinique d'où la nécessité de simplifier cet examen. Les milieux chromogènes proposés sont utilisés comme milieux de primoculture des urines. Ils ont la



**Figure 2 : coproculture sur ASAP™
(AES CHEMUNEX)**

**(Colonies rouges pour Salmonella et colonies bleues
pour les autres coliformes)**

capacité d'isoler et de quantifier les microorganismes uropathogènes. Ces milieux permettent l'identification directe de 80% des souches retrouvées dans les urines selon la couleur des colonies. Ils représentent également une meilleure discrimination des colonies dans les cultures plurimicrobiennes par rapport aux milieux classiques et ils inhibent l'envahissement de la culture par le voile des *Proteus* (2, 6, 7).

Il existe des études comparant la sensibilité de détection et la performance d'identification des quelques milieux chromogènes par rapport aux milieux classiques. D'après la littérature, CPS2 ID™ (bioMérieux), Chromogenic UTI™ (OXOID), CHROMagar Orientation™ (CHROMagar Company) et CHROMagar Orientation™ (BBL) n'ont pas démontré de différences significatives de point de vue sensibilité et spécificité, ils sont tous aussi performants et peuvent être utilisés pour l'isolement primaire (2, 8, 9). Selon Perry JD et coll., Uriselect 4™ (BioRad) semble avoir une meilleure sensibilité (98,3%) que CPS ID2 (10).

Les enzymes cibles sont la β -glucuronidase ou la β -galactosidase pour *E.coli*, la β -glucosidase pour *Enterococcus spp.* et pour le groupe KES-C (*Klebsiella spp.*- *Serratia spp.*- *Enterobacter spp.*- *Citrobacter spp.*),

la tryptophane désaminase (TDA) spécifique du groupe *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* et la β -galactosaminidase spécifique de *Candida albicans*. L'identification nécessite parfois des tests complémentaires simples (recherche de l'indole, TDA...). Les milieux utilisant la β -galactosidase comme substrat diminuent la spécificité d'identification d'*E.coli* qui est confondue avec *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter freundii* (6, 7, 8, 9). Il est possible de réaliser l'antibiogramme directement à partir de certains milieux commercialisés (7, 9, 10).

Mais en cas de suspicion de tuberculose urinaire ou d'une infection à germe à croissance difficile : *Corynebacterium urealyticum*, germes anaérobies, *Haemophilus*, les milieux non chromogènes seront toujours à utiliser (6, 7, 9).

2. Détection et identification de *S. aureus*

S. aureus est un germe associé aux infections suppuratives souvent sévères. Sa détection est parfois difficile notamment dans les prélèvements plurimicrobiens contenant des staphylocoques à coagulase négative ou des bacilles à Gram négatif. Plusieurs milieux chromogènes ont été développés pour l'isolement et l'identification de *S. aureus*. Les plus connus sont *S. aureus* ID™ (bioMérieux) et CHROMagar Staph aureus medium™ (BD Diagnostics) (2, 3).

Des études comparatives ont montré des performances similaires des deux milieux avec une sensibilité de 98%. *S. aureus* ID™ utilise un substrat de l' α -glucosidase, *S. aureus* donne alors des colonies vertes. CHROMagar Staph aureus medium™ détecte la phosphatase, Les colonies de *S. aureus* sont roses sur ce milieu. De plus ces deux milieux sont rendus sélectifs par l'ajout d'inhibiteurs des bacilles à Gram négatif et des entérocoques. La confirmation de *S. aureus* peut être complétée par une recherche de la coagulase ou par l'agglutination latex directement sur la colonie (2, 4).

3. Détection et identification des souches de SARM

Les souches de SARM sont de plus en plus isolées de par le monde, elles sont surtout impliquées dans les infections nosocomiales et elles posent parfois de véritables

problèmes thérapeutiques. L'identification rapide de ces souches doit permettre la mise en place de mesures adéquates d'isolement et de décontamination des patients (11, 12).

Les milieux chromogènes additionnés d'antibiotiques montrent de meilleures performances de détection des SARM que les milieux sélectifs classiques de type Chapman additionné d'antibiotique (3, 11, 13). Les nouvelles formulations de ces milieux utilisant la céfoxitine tels que MRSA ID™ (bioMérieux), CHROMagar MRSA™ (BD), MRSA select™ (BioRad) sont plus performantes que les milieux chromogènes utilisant l'oxacilline, notamment MRSA select™, qui semble avoir une sensibilité de 91% et une spécificité de 99% (12, 13, 14).

D'autres milieux sont aussi discriminants, mais nécessitent un enrichissement dans un bouillon pendant 24 heures afin d'augmenter la sensibilité, ce qui retarde le délai de rendu des résultats (11, 14).

4. Détection et identification présomptive de Streptocoque du groupe B

Le dépistage des femmes enceintes colonisées par *Streptococcus agalactiae* est une étape importante dans la prévention des infections néonatales. Les milieux chromogènes constituent une alternative pour un dépistage anténatal du streptocoque du groupe B dans les prélèvements vaginaux.

Sur le milieu Strep B Select™ (BioRad), *S. agalactiae* donne des colonies bleu foncé après 24 heures d'incubation en aérobiose, mais il est nécessaire de confirmer l'identification par un groupage à l'aide d'un test d'agglutination de particules de latex car les streptocoques non groupables peuvent donner de fausses réactions positives. Ce milieu possède une sensibilité et spécificité comparables à celles du milieu Granada, considéré à tort comme un milieu chromogène (15).

5. Détection et identification présomptive des *Salmonella* spp. dans les selles

Les méthodes classiques de détection de *Salmonella* dans les selles sont longues et manquent de spécificité et de sensibilité. En effet, elles sont basées sur un enrichis-

sement, une culture sur des milieux peu spécifiques ainsi qu'une identification biochimique et sérologique. Pour pallier à ces difficultés, plusieurs milieux chromogènes ont été commercialisés (4, 5).

La gélose Rambach™ et SM ID™ (bioMérieux) ont été les premiers milieux mis sur le marché. La gélose Rambach™ utilise un substrat de la β -galactosidase additionné de propylène glycol qui fermenté par *Salmonella*, génère un acide qui précipite donnant des colonies rouges. Ce milieu ne détecte pas *Salmonella enterica* serovar typhi et serovar paratyphi A qui n'expriment pas ces enzymes (3, 5).

SM ID™ (bioMérieux) utilise le substrat de la β -galactosidase et l'acide glucuronique, ce milieu est moins spécifique que le précédent (2, 16).

De nombreux autres milieux chromogènes pour la recherche des *Salmonella* se basant sur la présence de la C8 estérase ont été développés, tels que COMPASS Salmonella agar™ (Biokar diagnostics), CHROMagar Salmonella™ (CHROMagar Microbiology), Salmonella Agar Plate™ (AES). Ces milieux présentent une bonne sensibilité et spécificité qui sont améliorés par une étape de pré enrichissement dans un bouillon sélénite et une prolongation de l'incubation de 48 heures (3, 16).

Ces milieux chromogènes ne détectent pas les *Shigella* spp. dans les selles d'où la nécessité d'utiliser de milieux de culture complémentaires en routine (2).

6. Détection et identification présomptive d'*E. coli* 0157: H7

Ce sérotype d'*E. coli* est responsable de colites hémorragiques et du syndrome urémique hémorragique, parfois mortels. Les milieux chromogènes utilisés pour la détection de ce pathogène dans les selles se sont avérés très utiles compte tenu de l'urgence diagnostique.

Le principe est basé sur la non acidification du sorbitol et / ou du rhamnose, associée à l'absence de l'activité β -glucuronidase pour les souches d'*E. coli* 0157: H7. L'ajout d'un deuxième substrat chromogène de la β -galactosidase a amélioré l'identification d'*E. coli* 0157: H7 à partir de la flore commensale. Mais ces milieux sont rarement utilisés car d'autres techniques ont été développées pour rechercher la vérotoxine de cette bactérie dans les selles (1, 2, 3).

7. Détection des Résistances aux antibiotiques

La détection des bactéries résistantes aux antibiotiques est devenue une analyse de routine notamment chez les malades hospitalisés dans les unités de soins intensifs. Plusieurs milieux chromogènes ont été développés notamment pour la détection des entérobactéries sécrétrices de β -lactamases à spectre élargi et les entérocoques résistants à la vancomycine. Ces milieux sont en cours d'évaluation (17, 18).

8. Détection et identification présomptive des levures

En mycologie et depuis la fin des années 1990, une variété de milieux chromogènes a vu le jour. Tout d'abord, l'incorporation de substrats chromogènes a permis la différenciation de colonies de levures dans une culture pluri-microbienne, ensuite l'utilisation de substrats multiples a abouti à la différenciation de plusieurs espèces, sélection qui s'est avérée très utile surtout dans les primocultures. Ils ont ainsi permis dans un premier temps l'isolement et l'identification rapide de *Candida albicans* (*C. albicans*) principale espèce pathogène tel Fluoroplate Candida™ (Merck) ou Albicans ID™ (bioMérieux) qui colore les colonies de *C. albicans* en bleu avec une sensibilité et une spécificité supérieures à 95% (2, 3).

Actuellement, ces milieux chromogènes permettent non seulement une discrimination dans les primocultures mixtes mais aussi une identification présomptive d'autres espèces de levures du genre *Candida* de plus en plus retrouvées telles que *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. krusei*. Les milieux les plus discriminants actuellement disponibles sont Candida ID™ (bioMérieux) qui colore en bleu *C. albicans*, en rose *C. tropicalis*, les autres espèces restant blanches mais aussi CHROMagar Candida™ (Becton-Dickinson) et CandiSelect4™ (BioRad) qui permettent l'identification présomptive de quatre espèces de levures *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* et *C. krusei* avec une sensibilité et spécificité de 99%. Cependant, ces milieux semblent avoir une faible discrimination pour certaines espèces comme *C. parapsilosis* (2, 3, 19).

Ces deux derniers milieux présentent un intérêt majeur dans la détection des cultures mixtes, du fait de la différenciation des espèces par leur couleur. Cette reconnaissance est difficilement réalisable sur les milieux de culture conventionnels en mycologie (19).

9. Autres applications

Un nouveau milieu chromogène PS-ID™ (bioMérieux) a été développé pour l'isolement et l'identification de *Pseudomonas aeruginosa* dans les crachats de patients atteints de mucoviscidose, ce milieu a montré une bonne spécificité et il a permis d'isoler les souches variantes de *P. aeruginosa* et de diminuer la production d'alginat par les souches mucoïdes (4, 20).

Un milieu pour la détection de *Yersinia enterocolitica* dans les selles a été aussi développé par Weagent en 2008 (21).

Conclusion

De nombreuses études ont montré des taux de spécificité et de sensibilité élevées des milieux chromogènes par rapport aux milieux classiques surtout pour les prélèvements polymicrobiens avec également des taux élevés de détection. Ces milieux sont de lecture facile même pour un personnel peu expérimenté. En plus, ils permettent une économie substantielle en réactifs et en temps technique. Ainsi, pour certaines demandes, le délai du rendu des résultats est nettement raccourci ce qui permet une thérapie plus rapidement adaptée. Le coût élevé de ces milieux par rapport aux milieux classiques pourrait être considéré comme une limite à leur utilisation. Il est à noter que dans de rares cas ce système d'identification peut être pris en défaut et du fait de la grande diversité des entérobactéries, le microbiologiste devra rester vigilant et bien contrôler l'adéquation entre l'identification et l'antibiogramme.

Les milieux chromogènes semblent donc relancer le diagnostic phénotypique, qui reste plus accessible aux laboratoires dans une ère où le diagnostic microbiologique se base de plus en plus sur la biologie moléculaire.

Références

1. Leclercq A. Les milieux gélosés chromogènes. Bull Soc Fr Microbiol 2007; 22 (2): 96-107.
2. Perry J.D, Freydière A.M. The application of chromogenic media in clinical microbiology. J Appl Microbiol 2007; 103: 2046-2055.
3. Freydière A.M, Freyney J. Milieux chromogènes en microbiologie clinique. In Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P. Précis de bactériologie clinique. 2ème édition ESKA 2007, 109- 128.
4. Orega S, James A. L, Manafi M, Perry J.D, Pincus D.H. Enzymatic Substrate in microbiology. Journal microbiological methods 2009; 79 : 139-155.
5. Manafi M. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. Int J Food Microbiology 2000; 60: 205-218.
6. Croize J, Freydière A.M, Perard A, Le Noc P, Gille Y. Bactériologie urinaire: comparaison de deux géloses à substrats chromogéniques et /ou fluorogéniques. Revue française des laboratoires 1996; 288 : 51-55.
7. Reisner B.S, Austin E.F. Evaluation of CPS ID 2 chromogenic agar as a single medium for urine culture. Diagn Microbiol Infect Dis 1997; 28: 113-117.
8. Aspevall O, Osterman B, Dittmer R, Sten L, Lindback E, Forsum U. Performance of four chromogenic culture media after one or tow days of incubation compared with reference media. J Clin Microbiol 2002, 40: 1500-1503.
9. Samra Z, Heifetz M, Talmor J, Bain E, Bahar J. Evaluation of use of a new chromogenic agar in detection of urinary tract pathogens. J Clin Microbiol 1998, 36: 990-994.
10. Perry J.D, Butterworth L.A, Nicholson A, Appleby M.R, Orr K.E. Evaluation of a new chromogenic medium, Uriselect 4, for the isolation and identification of urinary tract pathogens. J Clin Pathol 2003; 56: 528-531.
11. Apfalter P, Assadian O, Kalczyk A, Lindenmann V, Makristathis A, Mustafa S and al. Performance of a new chromogenic oxacillin resistance screen medium (oxid) in the detection and presumptive identification of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Diagnostic Microbiology and infection disease 2002; 44: 209-211.
12. Athanasopoulos A, Devogel P, Beken C, Pille C, Bernier I, Gavage P. Comparaison de trois milieux sélectifs chromogènes pour la détection de *Staphylococcus aureus* résistant à la métilcilline. Path Bio 2007, 55: 366-369.
13. Reyes C. R, Stoakes L, Milburn Sue, Lennox G, Daniel J, Silver N.S and al. Evaluation of a new chromogenic medium for the detection of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage on nasal and perianal specimens. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2008; 60: 225-227.
14. Grandin S, Deschamps C, Magdoud F, Zihoune N, Branger C, Eveillard M. Evaluation de l'influence des conditions de culture sur les performances du milieu gélosé sélectif MRSA-ID pour l'identification de *Staphylococcus aureus* résistant à la métilcilline dans les prélèvements de dépistage. Path Bio 2009 ; 57 : e37-e42.
15. Tazi A, Doloy A, Réglie-Poupet H, Hemet M.E, Raymond J, Poyart C. Evaluation du nouveau milieu chromogène Strep B Select pour le dépistage anténatal des streptocoques du groupe B chez la femme enceinte. Path Bio 2009 ; 57 : 225-228.
16. Perez J.M, Cavalli P, Roure C, Renac R, Gille Y, Freydière A.M, Comparison of four media and Hektoen agar for detection and presumptive identification of *Salmonella* strains in human stools. J Clin Microbiol 2003, 41: 1130-1134.
17. Kuch A, Stefaniuk E, Ozorowski T, Hryniewicz. New selective and differential chromogenic agar medium, chrom ID VRE, for screening vancomycine-resistant *Enterococcus* species. J microbiol methods 2009; 77: 124-126.
18. Huang T.D, Bogaerts P, Berhin C, Guisset A, Gluperczynski Y. Evaluation of Brilliance ESBP agar, a novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 2010, 48: 2091-2096.
19. Gaschet A, L'Ollivier C, Laplanche A, Vagner O, Dalle F, Cuisenier B and al. Evaluation of CandiSelect4, a new chromogenic medium for isolation and presumptive identification of *Candida* species from clinical specimens. Journal de Mycologie Médicale 2008; 18: 89-95.
20. Laine L, Perry J.D, Lee J, Oliver M, James A.L, De La Foata C and al. A novel chromogenic medium for isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from the sputa of cystic fibrosis patients. Journal of Cystic Fibrosis 2009; 8: 143-149.
21. Stephen D. Weagant. A new chromogenic agar medium for the detection of potentially virulent *Yersinia enterocolitica*. J microbiol methods 2008; 72: 185-190.

La coagulation intravasculaire disséminée : complication des leucémies aiguës au moment du diagnostic

S. HIZEM,
N. BRAHAM JMILI,
T. MAHJOUB,
M. KORTAS.

Résumé : La coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) est un syndrome qui peut compliquer et aggraver le pronostic d'une leucémie aiguë (LA) au moment du diagnostic mais aussi suite à une chimiothérapie. Le tableau clinique et biologique est très hétérogène : il peut associer des manifestations thrombotiques et hémorragiques comme au cours de la leucémie aiguë promyélocytaire (LAM3), contrairement des tableaux plus modérés peuvent s'observer au cours des autres types de leucémies d'où la difficulté de son diagnostic. Nous nous proposons d'évaluer la fréquence de survenue de la CIVD au cours des leucémies aiguës au moment du diagnostic et avant chimiothérapie. 36 nouveaux cas de LA ont été diagnostiqués dans notre laboratoire: 23 LA myéloblastique (LAM), 12 LA lymphoblastique (LAL) et 1 LA biphénotypique. La médiane d'âge de nos patients est de 40 ans (extrêmes de 4 à 80 ans). Nous avons réalisé un bilan d'hémostase à la recherche d'une CIVD. Ce bilan comporte une numération plaquettaire, un temps de quick, un dosage de fibrinogène, un test à l'éthanol et une recherche de produit de dégradation de fibrinogène et de fibrine : PDF et D- dimères. Le diagnostic de CIVD a été retenu selon les critères de l'ISTH (International Society of Thrombosis and Haemostasis). La fréquence de survenue de CIVD dans notre population est de 30% (11/36 cas), elle est plus élevée que celle rapportée dans la littérature. La CIVD est beaucoup plus fréquente au cours des LAM qu'au cours des LAL et constante au cours des LA promyélocytaire. La complexité de ses mécanismes physiopathologiques et la difficulté de diagnostic des formes modérées incitent à sa recherche systématique au cours des LA afin d'adopter un traitement précoce.

Mots clés : La coagulation intravasculaire disséminée ; Leucémie aiguë.

Disseminated intravascular coagulation in acute leukemia at presentation

Abstract : Disseminated intravascular coagulation (DIC) is a complex syndrome which may complicate acute leukemia at presentation and during chemotherapy. The presentation of DIC may range from thrombo-hemorrhagic symptoms as in acute promyelotic leukemia (APL) to moderate formes with low grade of severity in other leukemia subtype that makes difficulty in its diagnosis. The aim of this study was to evaluate the prevalence of DIC in acute leukemia at presentation and before chemotherapy. We studied 36 patients with newly diagnosed acute leukemia : 23 acute myeloblastic leukemia (AML), 12 acute lymphoblastic leukemia (ALL) and 1 biphenotypic

Laboratoire d'hématologie,
centre hospitalo-niversitaire
Farhat Hached, Sousse 4000,
Tunisie.

acute leukemia. Their median age was 40 years (range 4-80). They were screened for DIC according to the ISTH (International Society of Thrombosis and Haemostasis) diagnostic criteria by analysing the results of routine laboratory tests : platelet count, prothrombin time, plasma fibrinogen, Ethanol test, fibrinogen/fibrin degradation product (FDP), D-dimer. The prevalence of DIC in our population was 30% (11/36), it was higher than reported in literature. The DIC was more prevalent in AML than in ALL, and constant in APL. The complexity of its pathophysiological mechanisms and the difficulty of its diagnosis in the moderate formes, suggest that DIC should be investigated in acute leukemia at presentation for early therapy because although moderate the DIC increases the bleeding risk attributed to thrombocytopenia secondary to bone marrow failure.

Key words : Disseminated intravascular coagulation; Acute leukemia.

Introduction

Les hémopathies malignes sont souvent associées à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Elle est définie comme étant un syndrome de défibrination secondaire à une pathologie sous-jacente (1, 2). La CIVD peut compliquer et aggraver une leucémie aigue (LA) mettant ainsi en jeu le pronostic vital au moment de son diagnostic mais aussi suite à une chimiothérapie (3-6). Le tableau clinique et biologique est très hétérogène. En effet, la CIVD peut s'extérioriser par un syndrome thrombohémorragique ou au contraire rester latente avec des formes purement biologiques (3, 7-9).

Patients

36 nouveaux cas de LA ont été diagnostiqués dans notre laboratoire entre juin 2003 et janvier 2005. Ils ont été classés selon les critères morphologiques du groupe FAB. Il s'agit de 19 cas de LA myéloïde (LAM) en dehors de la LA promyélocytaire (5 LAM1, 8 LAM2, 2 LAM4 et 4 LAM5), 4 cas de LA promyélocytaire (LAM3), 12 cas de LA lymphoblastique (LAL) et 1 cas de LA biphenotypique. Notre population malade avait une médiane d'âge de 42 ans (extrêmes 4 et 80 ans) avec un sexe ratio H/F de 1,11.

Méthodes

Nous avons réalisé un bilan d'hémostase systématique à la recherche d'une CIVD pour chaque malade avant l'instauration d'une chimiothérapie. Ce bilan comportait une numération plaquettaire, une détermination du temps de quick (TQ), un dosage du fibrinogène (Fg), une recherche de monomères de fibrine soluble et des produits de dégradation de fibrine/fibrinogène : PDF et D-dimères.

La numération plaquettaire a été réalisée sur un compteur de globules (Coulter type MAXM). La détermination du TQ et du Fg a été faite par des techniques chromométriques coagulométriques sur un semi automate ST4. Le TQ a été effectué en utilisant la Néoplastine®Cl (Diagnostica Stago, Asnières, France). Pour le Fg, nous avons utilisé le Fibri-Prest® (Diagnostica Stago, Asnières, France). La recherche de complexes solubles a été effectuée par un test à l'éthanol. Les produits de dégradation de fibrine PDF et D-dimères ont été recherchés respectivement par des techniques d'agglutination sur latex : FDP Plasma et D-Di Test® (Diagnostica Stago, Asnières, France). Le diagnostic d'une CIVD a été retenu selon les critères de l'ISTH (10, 11).

Résultats

Dans notre étude le diagnostic d'une CIVD a été posé

Tableau I. Algorithme proposé par l'ISTH pour le diagnostic de CIVD décompensée (11).

1) Évaluation du risque : le patient a-t-il une maladie connue pour être associée à une CIVD décompensée ?
Si oui : passer à l'étape 2 ; si non : ne pas utiliser l'algorithme

2) Prescription des tests de coagulation globaux (décompte des plaquettes, TQ, fibrinogène, monomères de fibrine soluble ou D-dimères)

3) Résultats des tests de coagulation
– Plaquettes ($> 100 \text{ G/L} = 0$; $< 100 \text{ G/L} = 1$; $< 50 \text{ G/L} = 2$)
– Augmentation des marqueurs de formation de fibrine soluble (Monomères solubles de fibrine ou D-dimères)
(Pas d'augmentation = 0 ; augmentation modérée = 2 ; augmentation forte = 3)
– Allongement du TQ
($< 3 \text{ sec} = 0$; $> 3 \text{ sec}$ mais $< 6 \text{ sec} = 1$; $> 6 \text{ sec} = 2$)
– Taux du fibrinogène
($> 1 \text{ g/L} = 0$; $< 1 \text{ g/L} = 1$)

4) Calcul du score
Score ≥ 5 : compatible avec une CIVD décompensée
Score < 5 : compatible avec une CIVD latente (débutante), répéter les examens

selon les critères de l'ISTH utilisant un algorithme associant plusieurs tests de routine. Un score ≥ 5 est considéré comme compatible avec le diagnostic d'une CIVD (Tableau I). L'étude de la perturbation de ces différents tests au cours d'une LA compliquée d'une CIVD a montré les résultats illustrés dans le Tableau II. Dans notre

série, la thrombopénie a été retrouvée chez tous nos patients avec des chiffres qui varient de $14000/\text{mm}^3$ à $98000/\text{mm}^3$. Elle est profonde inférieure à $50000/\text{mm}^3$ dans 82% des cas. Le TQ a été perturbé dans 90% des cas. Une hypofibrinogénémie avec des taux inférieurs à 1 g/l a été retrouvée seulement dans 45% des cas.

La recherche des monomères de fibrine soluble a été réalisée par le test à l'éthanol qui s'est montré positif dans 91% des cas alors que les produits de dégradation de fibrinogène/fibrine : PDF et D-dimères étaient élevés dans respectivement 99% et 100% des cas de LA associées à une CIVD.

L'étude de la fréquence de survenue d'une CIVD chez nos patients leucémiques a montré les résultats indiqués dans le Tableau III. Dans notre série, 30% des cas de LA (11/36) sont associés à une CIVD au moment du diagnostic. La CIVD est beaucoup plus fréquente au cours des LAM (31,6%) qu'au cours des LAL (8,3%) et elle est constante au cours des 4 cas de LA promyélocytaire. A l'exception de la LAM3, aucun autre type de LA ne semble être remarquablement associé à une CIVD au moment du diagnostic et avant l'instauration d'une chimiothérapie (Tableau IV).

Discussion

La difficulté diagnostique d'une CIVD est due à l'absence des tests à la fois spécifiques et sensibles, ce qui a amené des groupes d'étude ISTH et JMHW (Japanese Ministry of Health and Welfare) à proposer un système de score compatible avec le diagnostic d'une CIVD associant plusieurs tests de routine en hémostase (1, 11-13).

Tableau II : Perturbation des paramètres de l'hémostase au cours de la CIVD

	Plaquettes		TQ		Fg	Test à l'éthanol	PDF		D-dimères
	$< 50.10^3 / \text{mm}^3$	$50.10^3 - 100.10^3 / \text{mm}^3$	3-6"	$\geq 6"$			10 - 40 $\mu\text{g/ml}$	$> 40 \mu\text{g/ml}$	
Fréquence	82	12	54	36	45	91	81	18	100
Fréquence Totale	100		90		5	91	99		100

Tableau III : Fréquence de CIVD au cours des leucémies aiguës

	LAM		LAM3		LAL		LA biphénotypique	
	Nombre	Fréquence	Nombre	Fréquence	Nombre	Fréquence	Nombre	Fréquence
Positif	6	31,6	4	100	1	8,3	0	0%
Négatif	13	68,4	-	-	11	91,7	1	-
Fréquence Totale	11/36=30%							

Tableau IV : Fréquence de CIVD en fonction du type de LA

Type de LA	Nombre de patients	Fréquence de CIVD
LAM1	2/5	40
LAM2	3/8	37,5
LAM3	4/4	100
LAM4	0/2	0
LAM5	1/4	25
LAL	1/12	8,3
LA biphénotypique	0/1	0

Dans notre série, la numération plaquettaire était diminuée dans tous les cas de CIVD et elle est effondrée dans 82% des cas. Au cours des LA, la thrombopénie n'est pas un paramètre fiable d'une CIVD puisqu'elle peut être d'origine centrale liée à la pathologie elle-même mais elle peut aggraver le pronostic d'une LA (10, 12). La numération plaquettaire a été discutée par plusieurs groupes quant à son inclusion dans l'algorithme utilisé pour établir un score de diagnostic d'une CIVD. L'ISTH inclut ce paramètre dans leur système de scoring au cours des hémopathies malignes alors que le JMHW l'exclut au cours des LA (10, 12, 13). La thrombopénie pourrait avoir plus d'intérêt dans le diagnostic d'une CIVD si ce paramètre est répété dans le temps témoignant ainsi de l'intensité de la consommation (2).

La CIVD est un syndrome de consommation perturbant les tests explorant la coagulation comme le TQ.

Toutefois, il a été noté dans certains cas de CIVD un raccourcissement de ce test du à l'activation des facteurs

de coagulation (12). D'après notre étude, le TQ a été perturbé dans 90% des cas de LA compliquées d'une CIVD ce qui concorde avec la littérature. Ce test fait partie du système de scoring pour le diagnostic d'une CIVD au cours d'une LA par les deux groupes d'étude ISTH et JMHW (10, 12, 13).

Le Fg est le substrat de la thrombine enzyme finale de la coagulation, il est consommé au cours de la CIVD. Tous les groupes d'étude utilisent ce paramètre pour le diagnostic d'une CIVD, toutefois l'interprétation d'une fibrinogénémie doit être vigilante. Etant une protéine inflammatoire, un taux normal n'exclut pas le syndrome (10, 12). Dans la littérature, l'hypofibrinogénémie n'a été rapportée que dans les cas sévères de CIVD ce qui concorde avec nos résultats où les taux bas de Fg n'ont été observés que dans 5/11 cas (soit 45%) et ils étaient effondrés au cours des 4 cas de LA promyélocytaire où une activité fibrinolytique est associée (8, 12, 14).

D'autres tests dérivant de la dégradation de fibrine et de Fg ont été développés tels que les D-dimères et les PDF. Les D-dimères témoignent de la présence d'un caillot de fibrine stabilisée par le facteur XIII. Ces tests sont bien documentés par tous les travaux sur la CIVD du fait de leur valeur prédictive négative (VPN). Néanmoins, ils manquent de spécificité du fait de leur positivité dans d'autres situations pathologiques (thromboses veineuses profondes, syndrome inflammatoire) et par l'absence d'un cut off précis et spécifique d'une CIVD (12, 15). Dans notre série, ces produits de dégradation de fibrine: PDF et D-dimères ont montré une bonne sensibilité, ils étaient positifs dans respectivement 99% et 100% des cas de LA compliquées d'une CIVD.

Le score proposé par l'ISTH pour le diagnostic d'une

CIVD inclut les marqueurs de la formation aiguë de la fibrine et qui sont les monomères de fibrine soluble, les PDF et les D-dimères. Le test utilisé n'a pas été spécifié mais la majorité des équipes ont tendance à utiliser les D-dimères ou les PDF alors que la recherche des monomères de fibrine soluble est de plus en plus écartée (16). Dans notre étude, la recherche des complexes solubles a été réalisée par le test à l'éthanol qui s'est montré positif dans 91% des cas de LA associées à une CIVD. Il est basé sur les propriétés physicochimiques de la fibrine soluble. Ce test a été remplacé par des méthodes immunologiques basées sur l'utilisation des anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes générés lors de la conversion du Fg en fibrine. Certains auteurs ont montré que ce test immunologique présente une bonne corrélation avec les critères de diagnostic d'une CIVD proposés par l'ISTH et le JMHW (17). Ils suggèrent son utilisation comme marqueur de CIVD pour sa valeur prédictive positive (VPP) et parce qu'il présente un meilleur impact pronostique que les D-dimères (16, 18-20).

La CIVD est un syndrome toujours secondaire à une pathologie sous-jacente : infections, traumatismes et cancers (1, 2). Peu de travaux se sont intéressés à ce syndrome au cours des hémopathies malignes où il a été rapporté que 15 à 20% de LA peuvent se compliquer d'une CIVD et particulièrement la LA promyélocytaire (7, 21, 22). Dans notre étude, nous avons noté que 30% de LA sont associées à une CIVD au moment du diagnostic (Tableau III). Nos résultats concordent avec ceux rapportés par Yanada et coll. où 29% des LA nouvellement diagnostiquées présentent une CIVD (23). La différence des résultats entre les différentes équipes pourrait s'expliquer par la différence en échantillonnage mais aussi par la différence entre les critères de diagnostic d'une CIVD.

Dans notre série, la CIVD est plus fréquente au cours des LAM (31,5%) qu'au cours des LAL (8,3%) (Tableau II). Dans la littérature, il a été rapporté que 20 % des LAM et 10 % des LAL sont associées à une CIVD au moment du diagnostic alors que 80% des LAL se compliquent d'une CIVD après une chimiothérapie (7, 24, 25).

A l'exception de la LA promyélocytaire, aucun type de LA n'a été remarquablement associé à une CIVD (Tableau 3),

elle a été retrouvée dans 4/4 cas (100%). Dans la littérature, la CIVD semble compliquer tous les types de LA et particulièrement la LA promyélocytaire, elle était rapportée à une fréquence de 78 à 100% des cas (6, 13, 23). Ceci pourrait s'expliquer par la complexité de sa pathogénie où plusieurs mécanismes s'intriquent à la fois. L'expression du facteur tissulaire FT et la production des enzymes procoagulantes par les cellules blastiques entraînent l'activation de la coagulation et la génération de fibrine. D'autres protéases (élastases) présentes dans la granulation des cellules promyélocytaires sont capables d'activer directement la génération de fibrine par l'activation du FX et de dégrader les inhibiteurs physiologiques de la fibrinolyse (α antiplasmine) entraînant ainsi une réaction fibrinolytique. Tous ces mécanismes contribuent à l'aggravation du syndrome hémorragique lié à la thrombopénie centrale déjà existante (13, 14, 26). Malgré les progrès thérapeutiques surtout avec l'apparition de l'ATRA (all trans retinoic acid) 10% des malades meurent dans un tableau hémorragique (3, 8, 14). Dans notre étude, les cas sévères de CIVD ont été observés chez les 4 cas de LAM3 avec des taux effondrés de plaquettes et de Fg parmi lesquels 3 sont décédés.

Conclusion

Les LA se compliquent souvent d'une CIVD mettant en jeu le pronostic vital des patients, particulièrement la LA promyélocytaire où une activité fibrinolytique est bien documentée.

La difficulté diagnostique d'une CIVD a été palliée par l'utilisation d'un algorithme associant plusieurs tests de routine. Mais des efforts de standardisation des tests utilisés sont encore nécessaires pour une meilleure prise en charge. Au cours des LA, la répétition des tests trouve son intérêt dans la confirmation et le suivi de ce syndrome surtout pour les formes modérées mais aussi pour la détection d'une éventuelle CIVD suite à une chimiothérapie.

Références

1. Franchini M, Lippi G, Manzato F. Recent acquisitions in physiopathology, diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation. *Thromb J* 2006 ; 4:4.
2. Ho L.W, Kam P.C.A, Thong C.L. Disseminated intravascular coagulation. *Current Anesthesia & Critical Care* 2005 ; 16 : 151-161.
3. Rickles F.R, Falanga A, Montesinos P, Sanz M, Brenner B, Barbui T. Bleeding and thrombosis in acute leukemia: What does the future of therapy look like? *Thrombosis Research* 2007 ; 120 (S2) : 99-106.
4. Dixit A, Chatterjee T, Mishra P, Kannan M, Choudhry DR, Mahapatra M et al. Disseminated intravascular coagulation in acute leukaemia at presentation and during induction therapy. *Clin Appl Thromb Hemost* 2007 ; 13 (3) : 292-8.
5. Uchiumi H, Matsushima T, Yamane A, Doki N, Irisawa H, Saitoh T et al. Prevalence and clinical characteristics of acute myeloid leukemia associated with disseminated intravascular coagulation *Int J Hemato* 2007 ; 86 (2) : 137-42.
6. Krimmel T. Disseminated intravascular coagulation. *Clin J Oncol Nurs* 2003 ; 7 (4) : 479-81.
7. Kramer J, Otten H.M, Levi M, Cate H. The association of disseminated intravascular coagulation with specific diseases. *Reanimation* 2002; 11 : 575-83.
8. Falanga A, Rickles F.R. Pathogenesis and management of the bleeding diathesis in acute leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003 Sep; 16 (3) : 463-82.
9. Barbui T, Falanga A. Disseminated intravascular coagulation in acute leukemia. *Semin Thromb Haemost* 2001 ; 27 (6) : 593-604.
10. Wada H, Gabazza EC, Asakura H, Koike K, Okamoto K, Maruyama I, Shiku H, Nobori T. Comparison of Diagnostic Criteria For Disseminated Intravascular Coagulation (DIC): Diagnostic Criteria of the International Society of Thrombosis and Hemostasis (ISTH) and of the Japanese Ministry of Health and Welfare for Overt DIC. *Am J Hematol* 2003 Sep; 74 (1) : 17-22.
11. Toh CH, Hoots WK. The scoring system of the Scientific and Standardisation Committee on Disseminated Intravascular Coagulation of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: a 5year overview. *J Thromb Haemost* 2007; 5 : 604-6.
12. D. de Prost, L. Salomon, P. Verpillat. Utilisation en pratique des marqueurs biologiques de la coagulation et de la fibrinolyse. *Réanimation* 2002; 11 : 608-17.
13. Wada H. Disseminated intravascular coagulation. *Clin Chim Acta* 2004;344 (1-2) : 13-21.
14. Arbutnot C, Wilde J T. Haemostatic problems in acute promyelocytic leukaemia. *Blood Reviews* 2006; 20: 289-297.
15. Ito K, Wada H, Abye Y, Tomatsu H, Nishioka J, Nobori T. Clinical evaluation of a test for plasma fibrin/fibrinogen degradation products (FDP) based on monoclonal anti FDP antibody technology: an application for the scoring system of the disseminated intravascular coagulation diagnostic criteria. *Rinsho Byori* 2003 ; 51 (4) :259-9.
16. Dempfle CE, Wurst M, Smolinski M, Lorenz S, Osika A, Olenik D et al. Use of soluble fibrin antigen instead of D-dimer as fibrin related marker may enhance the prognostic power of the ISTH overt DIC score. *Thromb Haemost* 2004; 91 (4) : 812-8.
17. Wada H, Sase T, Matsumoto T, Kushiya F, Sakakura M, Mori Y et al. Increased soluble fibrin in plasma of patients with disseminated intravascular coagulation. *Clin Appl Thromb Hemost* 2003 Jul; 9 (3) : 233-40.
18. Selim T. E, Ghoneim H. R, Khashaba M. T, Rakha S.A. Plasma soluble fibrin monomer complex is a useful predictor of disseminated intravascular coagulation in neonatal sepsis. *Haematologica* 2005; 90 (3) : 419-421.
19. Watanabe R, Wada H, Yamamuro M, Inoue A, Watanabe M, Kumeda K et al. Good or poor responses of hemostatic molecular markers in hematopoietic disorders after treatment of disseminated intravascular coagulation. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2003 Jan; 9 (1) : 71-7.
20. Koga S. A novel molecular marker for thrombus formation and life prognosis-clinical usefulness of measurement of soluble fibrin monomer-fibrinogen complex (SF). *Rinsho Byori*. 2004; 52 (4) : 355-61.
21. Zuazu I, Canals C, Sempere A, Martin S, Brunet S, Puig J et al. Association of acute leukemia with disseminated intravascular coagulation in adults. Analysis of 14 cases. *Med Clin (Barc)*. 1989; 93 (12) : 441-4.
22. Chojnowski K, Wawrzyniak E, Trelinski J, Niewiarowska J, Cierni C. Assessment of coagulation disorders in patients with acute leukaemia before and after cytostatic treatment. *Leuk Lymphoma* 1999; 36 (1-2) : 77-84.

23. Yanada M, Matsushita T, Suzuki M, Kiyoi H, Yamamoto K, Kinoshita T et al. Disseminated intravascular coagulation in acute leukaemia: clinical and laboratory features at presentation. *Eur J Hematol* 2006; 77 : 282-287.

24. Nur S, Anwar M, Saleem M, Ahmad PA. Disseminated intravascular coagulation in acute leukaemias at first diagnosis. *Eur J Hematol* 1995 Aug; 55 (2) : 78-82.

25. Higuchi T, Mori H, Niikura H, Omine M, Okada S, Terrada H. Disseminated intravascular coagulation in acute lymphoblastic leukemia at presentation and in early phase of remission induction therapy. *Ann Hematol* 1998; 76 : 263-269.

26. Rickles FR, Falanga A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thrombosis Research* 2001; 102 : 215-224.

Interprétation de la digoxinémie : facteurs à prendre en considération

I. HELLARA¹,
L. BOUDHIB²,
F. NEFFATI¹,
W. DOUKI¹,
R. BOUKEF²,
A. BEN AMOR¹,
MF. NAJJAR¹.

Résumé : La digoxine est un cardiotrope à marge thérapeutique étroite pouvant induire des intoxications digitaliques graves. L'objectif de notre travail est d'étudier l'implication de facteurs physiologiques, pathologiques et thérapeutiques dans l'augmentation de la digoxinémie. Il s'agit d'une étude prospective chez 113 patients âgés de 32 à 87 ans, traités par la digoxine, consultant pour présomption de surdosage. La digoxinémie est supérieure aux concentrations thérapeutiques chez 21,1% de nos patients, avec augmentation plus marquée chez les femmes et d'autant plus importante que la dose de digoxine hebdomadaire est élevée. La digoxinémie est plus élevée chez les sujets de plus de 60 ans ($p < 0,02$), ceux présentant une insuffisance cardiaque ($p < 0,02$) et ceux traités par d'autres médicaments à tropisme cardiovasculaire associés à la digoxine : inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC: $p < 0,001$), diurétiques ($p < 0,01$), amiodarone ($p < 0,01$), Vs les patients traités par la digoxine seule. Lorsque d'autres médicaments administrés chez nos patients (β bloquants, diurétiques, AINS ou diltiazem) sont associés à un IEC en plus de la digoxine, les digoxinémies moyennes passent de $1,57 \pm 1,84$ à $2,69 \pm 3,71$ $\mu\text{g/L}$. Dans le cas où ces médicaments sont associés à l'amiodarone et à la digoxine, les digoxinémies moyennes passent de $1,69 \pm 1,32$ à $4,08 \pm 3,60$ $\mu\text{g/L}$. Pour les digoxinémies élevées, l'interprétation devrait prendre en considération l'âge, le sexe, la posologie, l'existence d'une insuffisance cardiaque, et le traitement par les IEC et l'amiodarone.

Mots clés : Digoxinémie, surdosage, interférence.

Digoxinemia interpretation : factors to be considered

Abstract : Digoxin is a narrow therapeutic cardiotropic that can induce severe digitalis poisoning. The objective of our work is to study the involvement of physiological, pathological and therapeutic factors in the increase of digoxinemia. This prospective study includes 113 patients aged 32-87 years treated with digoxin, and consulting for presumption of overdose. Digoxin levels above therapeutic concentrations at 21.1% of our patients, with higher increase among women and even more regarding the weekly dose of digoxin. Digoxinemia is higher in patients over 60 years ($p < 0.02$), those with heart failure ($p < 0.02$) and those treated with other cardiovascular drugs in association : ACE inhibitors ($p < 0.001$), diuretics ($p < 0.01$), amiodarone ($p < 0.01$), Vs. patients treated with digoxin alone. When other medications (β -blockers, diuretics, NSAIDs or diltiazem) were associated with an ACE inhibitor plus digoxin, digoxinemia spend of 1.57 ± 1.84 to 2.69 ± 3.71 mg/L . In cases where these drugs are associated with amiodarone and digoxin, digoxinemia spend of 1.69 ± 1.32 to 4.08 ± 3.60 mg/L . For high digoxinemia, interpretation should take into consideration the age, sex, dosage, the existence of heart failure, and treatment with ACE inhibitors and amiodarone.

Keywords : digoxinemia, overdose, interference.

¹ Laboratoire de
Biochimie -Toxicologie,
² Service de urgences
Hôpital Universitaire
Fattouma Bourguiba.
5000 Monastir.

Introduction

La digoxine est un médicament cardiotrope indiqué dans le traitement de la fibrillation auriculaire avec réponse ventriculaire rapide, de la tachycardie supraventriculaire et de l'insuffisance cardiaque congestive (1). Ce médicament diminuerait de 14% la mortalité liée à l'aggravation de l'insuffisance cardiaque, de 28% le nombre d'hospitalisations pour insuffisance cardiaque et de 25% le nombre combiné de décès et d'hospitalisations pour insuffisance cardiaque (1).

Malgré l'efficacité de la digoxine et la familiarisation des prescripteurs avec cette molécule, plusieurs patients continuent à présenter un risque important d'effets indésirables. Par conséquent, le dépistage précoce des anomalies dues à la toxicité de ce médicament est nécessaire car la digoxine a une marge thérapeutique étroite et une grande variabilité de réponse inter-individuelle, favorisant sa toxicité. Il est donc nécessaire d'instaurer une surveillance thérapeutique adéquate reposant essentiellement sur le dosage de la digoxine plasmatique.

Notre travail a pour objectif d'étudier l'implication de certains facteurs physiologiques et pathologiques et thérapeutiques dans l'augmentation de la digoxinémie, en vue d'une interprétation fiable des concentrations plasmatiques de ce médicament.

Patients et méthodes

Il s'agit d'une étude prospective menée de Mars 2006 à Mars 2007, concernant tous les sujets traités par la digoxine (3 à 14 mg par semaine selon les patients) se présentant aux urgences du CHU de Monastir avec des signes évocateurs de surdosage sans aucun critère d'exclusion.

Notre étude a porté sur 113 patients : 78 femmes (69,0%) et 35 hommes (31,0%), âgés en moyenne de 64 ans (extrêmes : 32-87 ans).

Nous avons recueilli les données relatives au statut sociodémographique du patient, aux antécédents médicaux, au tableau clinique et à la médication, ainsi que les résultats des analyses biologiques effectuées à l'admission, notamment la digoxinémie.

Nous avons dosé la digoxine par immunopolarisation de fluorescence (FPIA) sur analyseur TDx/FLx (Abbott™).

Nous avons interprété les digoxinémies par rapport à une zone thérapeutique de 0,8 à 2 µg/L (selon le kit utilisé pour le dosage), correspondant à la concentration résiduelle mesurée 12 h après la dernière prise.

Nous avons réalisé l'analyse statistique à l'aide du logiciel SPSS version 11.0. Les différences sont considérées significatives pour $p < 0,05$.

Résultats

La digoxinémie est supérieure à 2 µg/L chez 20,4% des patients et à 5 µg/L dans 7,1% des cas (figure 1). L'augmentation est d'autant plus importante que la dose de digoxine par semaine est élevée, il s'agit d'une augmentation exponentielle très importante ($r = 0,9767$, figure 2) et plus marquée chez les femmes (figure 3).

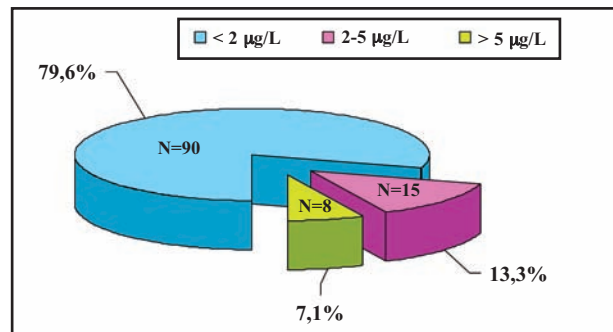


Figure 1 : Répartition des patients selon la digoxinémie (n = 113)

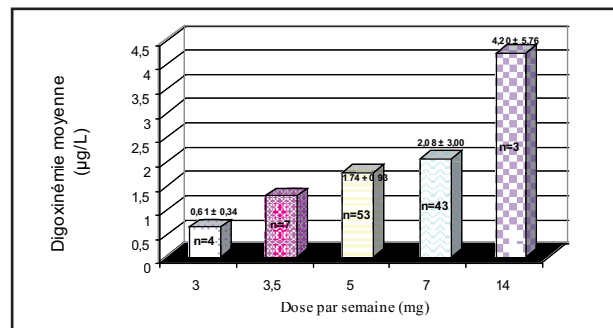


Figure 2 : Variation de la digoxinémie moyenne selon la dose hebdomadaire (n=110)*

* La dose/semaine de digoxine n'a pas été précisée pour 2 patients et seul un patient a reçu la dose de 6 mg /semaine.

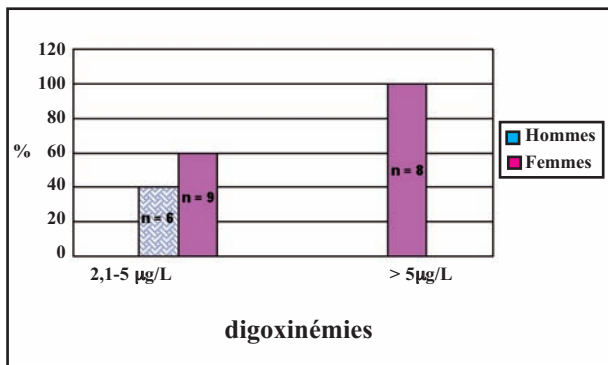


Figure 3 : Répartition des digoxinémies > 2 µg/L selon le sexe (n = 23)

La digoxinémie moyenne est statistiquement plus élevée chez les sujets de plus de 60 ans ($2,15 \pm 3,01$ µg/l; $p < 0,02$) ainsi que ceux présentant une insuffisance cardiaque ($1,25 \pm 3,35$ µg/l; $p < 0,02$).

Chez les patients traités par d'autres médicaments associés à la digoxine (inhibiteurs de l'enzyme de conversion : IEC, anti-inflammatoires non stéroïdiens : AINS, diurétiques, β-bloquants, diltiazem, amiodarone), nous avons retrouvé une augmentation statistiquement significative de la digoxinémie avec les IEC ($p < 0,001$), les diurétiques ($p < 0,01$) et l'amiodarone ($p < 0,01$), par rapport aux patients traités par la digoxine seule (figure 4).

Lorsque d'autres médicaments administrés chez nos patients (β bloquants, diurétiques, AINS ou diltiazem) sont associés à un IEC en plus de la digoxine, les digoxinémies moyennes passent de $1,57 \pm 1,84$ à $2,69 \pm 3,71$ µg/L. Dans le cas où ces médicaments sont associés à l'amiodarone et à la digoxine, les digoxinémies moyennes passent de $1,69 \pm 1,32$ à $4,08 \pm 3,60$ µg/L (figure 5).

Discussion

Chez 23 patients (20,4%), la digoxinémie a dépassé les valeurs thérapeutiques sans que le diagnostic de surdosage en digoxine ne soit retenu. Ce résultat serait en rapport avec différents paramètres, notamment le moment du prélèvement, la variabilité inter-individuelle sur le plan pharmacocinétique et les interférences analytiques.

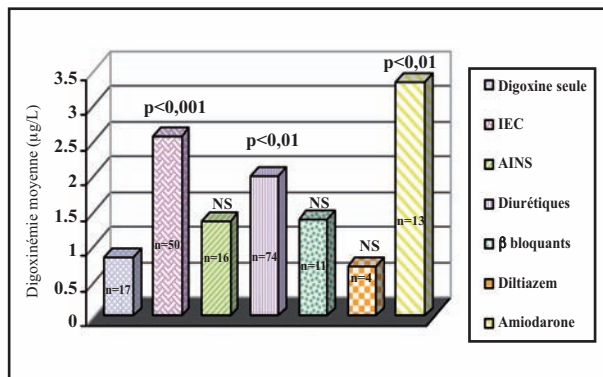


Figure 4 : Variation de la digoxinémie selon l'association médicamenteuse

- IEC : inhibiteurs de l'enzyme de conversion ; AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien.
 - NS : différence non significative et p : valeur de la signification, par rapport à la digoxinémie moyenne chez les sujets traités par la digoxine seule

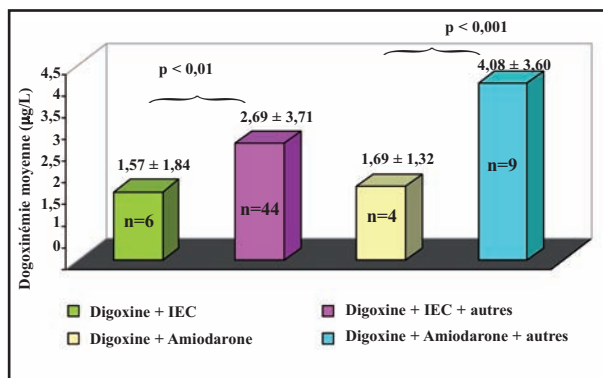


Figure 5 : Variation de la digoxinémie moyenne selon l'association avec des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC), l'amiodarone et/ou d'autres médicaments

Dans notre étude, tous les patients ont été admis en urgence. Par conséquent, la digoxinémie mesurée ne correspond pas forcément à une concentration résiduelle, donc ne permet pas une interprétation par rapport aux zones thérapeutiques utilisées en pratique quotidienne. En effet, la concentration plasmatique maximale est atteinte 30 à 90 min après ingestion et la biodisponibilité varie de 55 à 80 % en fonction de la forme galénique

pour une demi-vie de 40 h (1). Par ailleurs, la métabolisation est variable, pouvant être considérable, expliquant la tolérance aux posologies élevées. En cas d'insuffisance rénale, la clairance de la digoxine est analogue à celle de la créatinine, la demi-vie peut alors être prolongée et atteindre jusqu'à 4 jours. Enfin, l'élévation de la digoxinémie peut être en relation avec une interférence analytique due à la présence d'un composé se comportant comme la digoxine, la DLIS (Digoxin Like Immunoreactive Substance). En effet, la DLIS, composée d'acides gras non estérifiés, de phospholipides et de lysophospholipides, de PM 780 Da, présente une analogie structurale avec la digoxine, expliquant l'immunoréactivité croisée et les concentrations qui peuvent atteindre 2 µg/L en l'absence de tout traitement par la digoxine (2). L'étude de Dasgupta et al (3) a montré que la DLIS est absente dans l'ultrafiltrat plasmatique déprotéinisé, ce qui pourrait constituer une alternative pour neutraliser son interférence. Néanmoins, ils ont montré que le dosage de la digoxine dans cet ultrafiltrat ne détecte que 75% de sa concentration, les 25% restants étant éliminés par la déprotéinisation, car liés à l'albumine. Ces auteurs proposent une méthode de calcul de la concentration de la digoxine totale à partir de la digoxine libre et de l'albumine dans le plasma.

Dans notre série, l'augmentation de la digoxinémie est plus marquée chez la femme. Selon l'étude DIG (4), il y a une différence absolue de 5,8% de l'effet de la digoxine sur la mortalité entre les hommes et les femmes. Ainsi, la digoxine est associée à un risque de mortalité plus élevé chez les femmes, par des manifestations cardiaques ou par majoration de l'insuffisance cardiaque. Rathore et al (5) suggèrent que la progestérone interagit avec la digoxine en inhibant la glycoprotéine P (protéine de transport), ce qui perturbe l'élimination rénale de la digoxine et favorise son accumulation dans le sang. La digoxinémie moyenne est statistiquement plus élevée chez les sujets de plus de 60 ans en raison de la régression de la fonction rénale décrite avec l'âge, ce qui favorise probablement l'élévation de la concentration plasmatique. Nous avons retrouvé une corrélation entre la digoxinémie moyenne et la dose hebdomadaire. McMurray et al (6) rap-

portent que dans les études PROVED et RADIANCE, la posologie moyenne est de 375 µg/j, correspondant à une concentration plasmatique de 1 à 2 µg/L. Dans l'étude DIG (4), la posologie moyenne est de 250 µg, ce qui correspond à une concentration plasmatique de 0,5 à 2 µg/L. Selon Behr et al (7), l'utilisation de faibles doses de digoxine avec un risque de digoxinémie infra-thérapeutique représente l'alternative pour réduire le risque de mortalité suite aux intoxications digitaliques.

Chez nos patients, nous avons retrouvé une augmentation significative de la digoxinémie moyenne lors de l'association de la digoxine avec les IEC, les diurétiques et l'amiodarone, comparée à celle des sujets traités par la digoxine seule. Il est effectivement décrit que la digoxinémie peut être influencée par certains médicaments (8). Elle est diminuée par les antiacides, la néomycine et le métoclopramide par diminution de la résorption digestive et par la thyroxine suite à l'augmentation du volume de distribution et de l'élimination rénale (1,8). La digoxinémie peut être augmentée de 70 à 100% par la quinidine, le vérapamil et l'amiodarone, en raison d'une diminution de l'élimination rénale et/ou du volume de distribution. L'augmentation est de l'ordre de 40 à 100% avec l'érythromycine, l'oméprazole et les tétracyclines, en traitement prolongé, et ce par augmentation de l'absorption de la digoxine. D'autres médicaments, notamment la ciclosporine, le captopril et la nifédipine, entraînent une augmentation variable des concentrations plasmatiques de la digoxine par diminution de son élimination rénale (8). Les diurétiques ont des actions variables : le furosémide augmente la clairance rénale de la digoxine de 70%, réduisant la digoxinémie de 20% environ, la spironolactone augmente la digoxinémie par diminution de sa sécrétion tubulaire, laquelle est également diminuée par le triamterène (8). En dépit du manque de spécificité du dosage de la digoxine par FPIA, de l'absence de corrélation entre la digoxinémie et les signes de toxicité, et la variabilité inter-individuelle, les concentrations plasmatiques de la digoxine représentent un paramètre primordial pour l'estimation de la quantité de ce digitalique présente dans l'organisme. Selon Moritz et Droy (9), cette quantité (exprimée en mg) peut être calculée soit à partir de

la dose supposée ingérée (DSI) : $DSI \times 0,60$; soit à partir du taux plasmatique (TP) selon la formule : $[TP (\mu\text{g/L}) \times 5,6 \times \text{Poids (kg)} \times 10^{-3}]$ sachant que la valeur 5,6 représente le volume de distribution de la digoxine exprimé en L/kg.

Conclusion

La prescription de la digoxine doit faire l'objet d'une vigilance particulière en raison essentiellement de sa marge thérapeutique étroite exposant au risque d'intoxication digitalique. Cette intoxication peut survenir à la suite d'interactions médicamenteuses, d'utilisation de doses supra-thérapeutiques ou lors d'une diminution de l'élimination par insuffisance rénale ou hépatique. Par ailleurs, cette intoxication peut apparaître à des concentrations plasmatiques thérapeutiques lorsque la sensibilité myocardique est augmentée : hypothyroïdie, âge avancé, maladie cardiaque sévère, ischémie myocardique, hypoxémie et désordres électrolytiques. Dans ce cadre, le dosage de la digoxinémie permet un meilleur suivi thérapeutique. Cependant, la digoxinémie s'est avérée faussement augmentée chez des sujets âgés de plus de 60 ans, de sexe féminin, souffrant d'insuffisance cardiaque et /ou traités en plus de la digoxine par un diurétique, un inhibiteur de l'enzyme de conversion ou par l'amiodarone, notamment en cas d'association avec d'autres médicaments. Cette augmentation de la digoxinémie est d'autant plus notable que la posologie est élevée. Cependant, il est souhaitable de prendre en considération le délai écoulé entre le moment du prélèvement et celui de la prise de la digoxine et de recourir à la méthode de référence, la HPLC pour la confirmation des digoxinémies élevées.

Références

1. Galinier MB, Bouhoure J. Tonicardiaques. *Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Cardiologie-Angéiologie*, 11-900-A-10, 1998, 22p.
2. Dasgupta A. Endogenous and exogenous digoxin-like immunoreactive substances. *Am J Clin Pathol* 2002;118:132-140.
3. Dasgupta A, Schammel D, Limmany A, Datta P. Estimating concentrations of total digoxin and digoxin-like immunoreactive substances in volume expanded patients being treated with digoxin. *Ther Drug Monit* 1996;1:34-39.
4. Anonyme. The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. The Digitalis Investigation Group. *N Engl J Med* 1997;336:525-33.
5. Rathore S, Wang Y, Krumholtz H. Sex based differences in the effect of digoxin for the treatment of heart failure. *N Eng J Med* 2002;347:1403-1411.
6. McMurray J, Davie AP. Digoxin for patients with heart failure in sinus rhythm. *Lancet* 1997;350:519.
7. Behr E, Veysey M, Berry D, Volans G. Optimum dose of digoxin. *Lancet* 1997;349:1845.
8. Gotfraind T. Cardiotoniques et médicaments de l'insuffisance cardiaque. In Shorederet et al. *Pharmacologie : des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*. 3 ème édition Slaktine : Ed Frison-Roche ; 1998.p.174-186.
9. Moritz F, Droy JM. Intoxication digitalique. In : Danel V, Barriot P. *Intoxication aiguë en réanimation*. 2ème édition. France : édition Arnette ; 1999.p.409-423.

La recherche négative d'anticorps anti nucléaires en immunofluorescence indirecte doit-elle être suivie d'une détermination des anti-corps anti ENA ?

S.YALAOUI

Résumé : La démarche habituelle de recherche des anticorps antinucléaires (AAN) débute par un dépistage ou screening en immunofluorescence indirecte (IFI) sur cellules Hep-2. Si le résultat est positif et en fonction du titre et de l'aspect de la fluorescence, une détermination des anticorps anti antigènes nucléaires extractibles (ENA) est effectuée. A l'inverse, un résultat négatif du screening n'est pas suivi de la recherche des anti-ENA.

Certains auteurs préconisent toutefois de rechercher les anticorps anti-ENA, en fonction du contexte clinique, malgré un résultat initial négatif pour la recherche des AAN. Cette mise au point discute de cette dernière attitude et souligne la nécessité d'une étroite collaboration entre biologiste et clinicien afin de bien rationaliser ce type de démarche, car les tests pour la recherche des anti-ENA peuvent être onéreux et ne pas avoir l'apport diagnostique souhaité.

Mots-clés : Anticorps Anti-nucléaires-Antigènes nucléaires extractibles- Méthodes

Does a negative IIF screening test for antinuclear antibodies have to be followed by anti-ENA antibodies testing ?

Summary :

Indirect immunofluorescence (IIF) on Hep-2 cells is the initial screening test for detection of antinuclear antibodies (ANA). If the result is positive and depending on the pattern and titre of fluorescence, a search for antibodies to extractable nuclear antigens (ENA) is carried out with other assays. On the contrary, a negative result of the screening for ANA is not followed by anti-ENA antibodies testing. However some authors recommend to seek anti-ENA antibodies, according to the clinical context, in spite of a negative initial result by IIF. This article discusses this last attitude and underlines the need for a close cooperation between biologist and clinician in order to rationalize this type of cascade testing. Assays for the determination of anti-ENA antibodies can be expensive and may not have the desired diagnostic contribution.

Key words : Anti -nuclear antibodies-Extractable nuclear antigens-Methods

Laboratoire de biologie médicale.
EPS Abderrahmane Mami Ariana
Tunisie

Les anticorps antinucléaires (AAN) sont dirigés contre les constituants du noyau cellulaire, leur présence peut orienter vers un diagnostic de connectivité. Dans la pratique courante, la recherche des AAN se fait par une démarche en cascade (1), la première étape consiste à les rechercher par technique d'immunofluorescence indirecte (IFI). Lorsque le résultat est positif, il est pro-

cedé alors au typage de la spécificité des AAN par la recherche des anticorps anti-ADN natif et des anticorps anti antigènes nucléaires extractibles (ENA) tels que les anticorps anti-Sm, RNP, SSA, SSB, Scl70, Jo-1, etc.. qui constituent de bons marqueurs des connectivités (Tableau 1). La technique d'IFI se fait actuellement sur cellules tumorales Hep-2(human épithélioma pharynx

n°2) car ce substrat cellulaire est nettement plus sensible que les substrats traditionnels représentés par les coupes d'organes de rat. Les cellules Hep-2 ont un cytoplasme abondant, de grands noyaux avec plusieurs nucléoles et beaucoup d'entre elles sont en division, ce qui offre l'avantage de détecter des anticorps dirigés contre des antigènes dont l'expression dépend du cycle cellulaire(1). Les cellules Hep-2 offrent un large éventail d'aspects de fluorescences nucléaires et/ou cytoplasmiques qui peuvent suggérer dans certains cas la spécificité des autoanticorps. A titre d'exemple, un aspect moucheté du noyau en une quarantaine de grains avec fluorescence de la plaque équatoriale signe la présence d'anticorps anti centromère avec certitude. La présence d'une forte fluorescence homogène du noyau peut nous faire opter pour la recherche d'anticorps anti-ADN natif par technique d'immunofluorescence indirecte sur crithidia luciliae. Parallèlement à l'aspect de la fluorescence, il est essentiel de mentionner les titres de la fluorescence qui sont exprimés en dilution du sérum (1/40 ou 1/80 etc.). Beaucoup de laboratoires démarrent leurs dilutions

Tableau I : Exemples d'anticorps anti-ENA et leur signification clinique

Pathologie	Fréquence*	spécificité
Anti-ENA		
Connectivite mixte		
U1 RNP	100%	faible
Lupus systémique		
Sm	15- 30%	élevée
Rib P	10-20%	élevée
Sclérodemie diffuse		
Topo-isomérase I	20-40%	élevée
Syndrome de Gougerot-Sjogren		
SSA	50-70 %	faible
SSB	50 %	moyenne
Polymyosite		
Jo-1	20-35%	élevée

*varie en fonction des techniques utilisées et des ethnies

sériques à partir de 1/80 (2).

Un titre faible d'AAN est généralement moins significatif qu'un titre élevé. Des AAN de faible titre sont beaucoup moins associés à une positivité des anticorps anti-ENA (3), ils peuvent en outre être observés chez des sujets âgés en bonne santé (4).

A l'inverse, lorsque le résultat de la recherche en IFI sur cellules Hep-2 est négatif, cette démarche en cascade est interrompue pour des raisons «historiques» de faible probabilité de trouver des anticorps anti-ENA (5).

Néanmoins, la détermination des anticorps anti-ENA est tributaire de la technique utilisée. En effet, actuellement, la recherche des anticorps anti-ENA se fait par des techniques immuno-enzymatiques (ELISA, immunodot) qui ont supplanté les anciennes techniques d'immuno-diffusion en gel d'agarose qui étaient plus longues et beaucoup moins sensibles (6). De plus, les techniques disponibles chez plusieurs fabricants (Euroimmun™, The Binding site™, BMD™, Innogenetics™, Inova™) donnent la possibilité de détection simultanée d'autoanticorps dirigés contre plusieurs ENA. Ces tests offrent un panel important d'antigènes nucléaires extractibles, ce qui améliore la probabilité d'un typage anti-ENA positif (3,7).

L'attitude à adopter lors d'un résultat négatif de *screening* des AAN en IFI peut être toutefois sujette à discussion.

Dans de rares études (8,9) des fréquences de positivité en anticorps anti-ENA de 0.6 % à 1,1% ont été trouvées parmi les sérums ayant eu un *screening* initial négatif. Ces fréquences ne sont pas élevées mais certains auteurs trouvent (8) un certain nombre de malades atteints de connectivites parmi ceux ayant des AAN négatifs en IFI et conjointement des anticorps anti-ENA positifs. D'autres indiquent que la découverte d'anticorps anti-ENA en cas de dépistage négatif en IFI n'aboutit en fait que rarement au diagnostic de connectivite (9).

Quelle attitude adopter lorsque la demande d'analyse prescrite par le clinicien et aboutissant au laboratoire spécifique, quoique rarement, la recherche d'anticorps anti-ENA en première intention ?

Ainsi, le biologiste doit-il satisfaire la demande du clinicien en pratiquant directement la recherche des anticorps anti-ENA ? Faut-il qu'il commence par un *screening* en

IFI sur cellules Hep-2 pour adapter ensuite la démarche en fonction du résultat obtenu : à savoir que si ce résultat est négatif cela équivaut à ne pas effectuer de recherche d'anticorps anti-ENA.

On peut concevoir à cet effet que l'attitude des laboratoires du secteur privé peut être différente par rapport à celle des laboratoires hospitalo-universitaires.

Les biologistes du secteur privé, du moins en Tunisie, ont parfois du mal à obtenir les renseignements cliniques de la part du prescripteur et renoncent assez souvent à faire la démarche dans ce sens. Ainsi, si certains procèdent d'emblée à la recherche des anticorps anti-ENA pour satisfaire la demande du clinicien, cette attitude peut être discutable, en effet, l'étape du *screening* initial par IFI sur Hep-2 est fortement recommandée. Cette étape ne devrait pas être court-circuitée car elle peut donner des indications essentielles sur d'une part la présence d'AAN, leur titre et d'autre part sur l'utilité de déterminer la spécificité anti-ENA (9). Il faut rappeler que le dialogue clinicien-biologiste reste fondamental même dans le secteur privé.

Les laboratoires hospitaliers ou hospitalo-universitaires sont certainement dans une configuration différente, là, les biologistes peuvent exiger que les renseignements cliniques accompagnent la demande de recherche d'AAN et leur exigence est souvent satisfaite. En plus de cela, les biologistes peuvent très souvent accéder aux dossiers médicaux des patients, surtout ceux hospitalisés, et en tenir compte éventuellement avec l'accord des cliniciens pour ajouter ou modifier une demande d'analyse. C'est ainsi que même si la démarche habituelle est de ne pas poursuivre la recherche d'anticorps anti-ENA en cas de résultat négatif du *screening* en IFI, il y a des situations où, devant une forte suspicion clinique de connectivite, certains auteurs préconisent de faire une détermination d'anticorps anti-ENA (8,10).

D'autre part, le clinicien peut de sa propre initiative, dans certains cas comme les lupus cutanés subaigus, demander des anticorps anti-ENA même si le résultat du dépistage des AAN est négatif. En effet, des autoanticorps de valeur diagnostique certaine comme les anti-SSA /Ro peuvent parfois ne pas être détectés par le

screening en IFI sur cellules Hep-2. Pour remédier à cela, certains fabricants (Immunoconcepts™) ont proposé des substrats Hep-2000 qui sont des cellules Hep-2 ayant subi une transfection par des gènes codant la protéine SSA /Ro de 60 kDa pour améliorer la sensibilité de la détection des anticorps anti-SSA/Ro. Il reste que ce genre de substrat est plus cher que les cellules Hep-2. En outre, certaines études (10) montrent qu'il n'a pas prouvé réellement un apport par rapport au substrat cellulaire classique, et qu'il ne parvient pas à détecter les anticorps anti-SSA 52 Kda. Ces derniers lorsqu'ils sont isolés n'ont toutefois pas de valeur diagnostique prouvée (11).

D'autres autoanticorps comme les anticorps anti ribosomes et les anti-Jo-1 ne s'accompagnent pas toujours de fluorescence (dans ce cas cytoplasmique) au cours du *screening* en IFI sur cellules Hep-2(1,8). Le biologiste doit donc pouvoir disposer des fiches de renseignements cliniques accompagnant les demandes d'analyses. Ces fiches doivent être les plus détaillées possibles pour permettre éventuellement d'orienter le biologiste afin que, devant un *screening* négatif, il décide ou non de procéder à une détermination des anticorps anti-ENA. A ces fins, comme il a été mentionné plus haut, la technique de recherche des anticorps anti-ENA est importante. On peut ainsi privilégier des techniques utilisant des panels larges d'ENA.

Certains tests sont des immunodots qui permettent la recherche d'anticorps dirigés contre des antigènes déposés en des positions séparées sur une bandelette. Ce type de test peut être qualifié de multiantigénique à l'instar des tests multiallergiques utilisés en allergologie (CLA 30™, Mediwiss™, Euro-line™).

Les panels, selon les fabricants, peuvent proposer des antigènes de localisation nucléaire comme les antigènes Sm, RNP, centromère, de localisation nucléolaire comme le PM-Scl mais aussi des antigènes cytoplasmiques comme les ribosomes, Jo-1, les antigènes mitochondriaux.

Par ailleurs, l'interprétation des résultats de certains de ces tests peut être facilitée par des lectures densitométriques grâce à des logiciels informatiques qui vont donner des résultats semi-quantitatifs. Ce type de lecture classe les réactivités en fonction de l'intensité des

bandes correspondant aux différents ENA. Ceci permet de trancher lorsque les réactivités sont particulièrement faibles, certaines étant considérées comme limites « *borderline* » et non significatives.

L'attitude par la suite, peut se discuter (fig. 1). Elle est déterminée par les données cliniques qui restent fondamentales (12). Elle peut consister à faire un suivi des réactivités anti-ENA sur un prélèvement ultérieur grâce au même test.

Ce suivi permet de voir s'il y a une négativation, qui en fonction des données cliniques, par exemple en l'absence de prise de traitement immunosuppresseur, peut raisonnablement écarter l'éventualité d'une connectivite. D'un autre côté, la réactivité peut rester faible et ne pas être significative sur le plan diagnostique.

Enfin, et ce n'est pas le moins important, il faut avoir à l'esprit que le biologiste reste confronté à une donnée non négligeable qui est le coût de ces tests. Comme ces tests sont immunoenzymatiques, ils sont nettement plus chers que *le screening* en IFI.

Le même raisonnement s'applique à un screening en IFI sur cellules Hep-2000, plus coûteux que *le screening* sur cellules Hep-2. De ce fait, il est important de peser le pour et le contre, en essayant de trouver les arguments solides grâce aux renseignements cliniques.

En conclusion, Il est essentiel de se souvenir de l'utilité d'une collaboration étroite entre clinicien et biologiste (3,6). En effet, des renseignements cliniques clairs peuvent conforter l'idée que devant *un screening* négatif en IFI, la recherche des anticorps anti-ENA soit réellement superflue. De ce fait cela évitera de continuer par des tests coûteux dont l'apport diagnostique peut se révéler finalement incertain.

Références

1. Rouquette AM. Anticorps anti nucléaires In Meyer O Rouquette AM Youinou P. Autoanticorps: marqueurs des maladies autoimmunes. Paris, BMD éditions, 1999:71-91
2. Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Hiepe F, Krieger T, Kromminga A, von Landenberg P, Messer G, Witte T, Mierau R; German EASI (European Autoimmunity Standardization Initiative). Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells. Ann N Y Acad Sci. 2009 ; 1173:166-73.
3. Damoiseaux JGMC, Cohen Tervaert JW. From ANA to ENA: How to proceed ? Autoimmunity Reviews 2006; 5: 10- 17
4. Juby AG, Davis P, Mc elhaney JE, Gravenstein S. Prevalence of selected autoantibodies in different elderly sub-populations. Brit J Rheumatol 1994; 33:1121-4
5. Manoussakis MN, Garalea KL, Tzioufas AG. Testing for antibodies to ENA and to ds DNA is not indicated in FANA negative sera. Clin Rheumatol 1988; 7:465-9
6. Phan T G, Wong RC W, Adelstein S. Autoantibodies to extractable nuclear antigens: Making detection and interpretation more meaningful. Clin Diagnostic Lab Immunol 2002; 9:1-7
7. Peene I, Meheus L, Veys E M, De Keyser F. Detection and identification of anti nuclear antibodies in a large and consecutive cohort of serum samples referred for ANA testing. Ann Rheum Dis 2001; 60:1131-6
8. Bossuyt X, Luyckx A. Antibodies to extractable nuclear antigens in antinuclear antibody-negative Samples. Clin Chem 2005; 51:2426-7
9. Thomson K F, Murphy A, Goodfield M J D, Misbah S A. Is it useful to test for antibodies to extractable nuclear antigens in the presence of a negative antinuclear antibody on Hep-2 cells? J Clin Pathol 2001; 54,413
10. Hoffman EA, Peene I, Veys E M, De Keyser F. Detection of Specific Antinuclear Reactivities in Patients with Negative Anti-nuclear Antibody Immunofluorescence Screening Tests. Clin Chem 2002 ; 48 : 2172-6
11. Langguth DM, Morris S, Clifford L, Wilson RJ, Neil J, Hogan PG, Wong RCW. Specific testing for isolated anti 52 Kda SSA/Ro antibodies during standard anti ENA testing is of limited clinical value. J Clin Pathol 2007; 60:670-3
12. Kumar Y, Bhatia A, Minz R. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases : a journey revisited. Diagn Pathol 2009;4:1

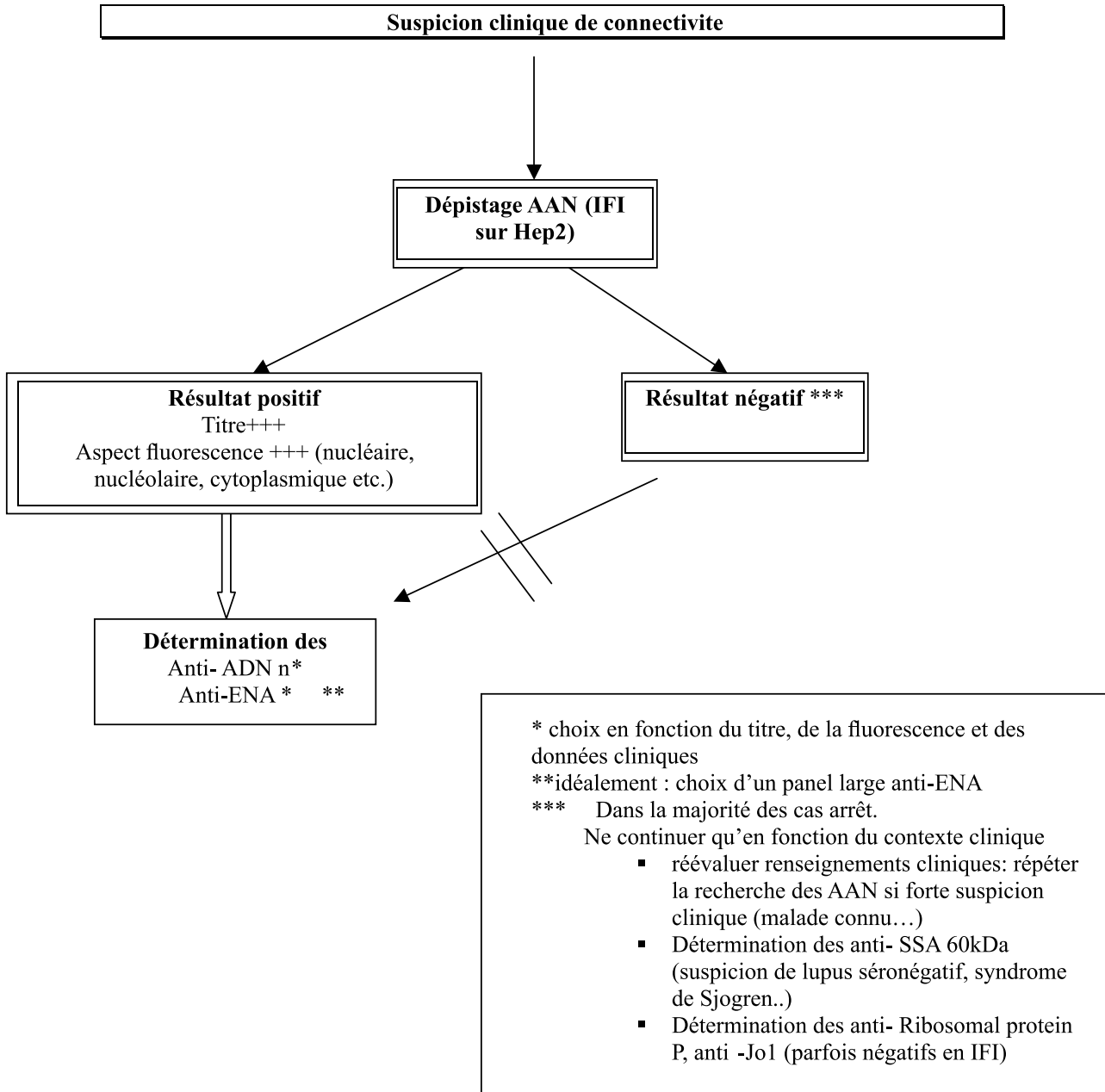


Figure 1 : Algorithme décisionnel pour la recherche d'AAN

Agenda des manifestations scientifiques

Workshop “Mapping the Future of European Laboratory Medicine”

November 4, 2010 - Paris, France
www.jib-sdbio.fr

55es Journées Internationales de Biologie

PARIS (La Défense) - 2-5 novembre 2010
www.jib-sdbio.fr

MEDICA 2010

Interbational World Fair & Congress world Forum for Medecine

17-20 Novembre 2010
Düsseldorf, Germany
www.medica-tradefair.com

European Forum on Diabetes “Recent advances in the use of glycated hemoglobin for a better management of diabetes mellitus”

November 19, 2010 - Milano, Italy
www.ifcc.org

Workshop “European Challenges for Laboratory Medicine : reimbursement of innovative technologies”

November 26, 2010 - Bruxelles, Belgium
<http://www.soagency.be/EDMA/Workshop/Workshop.html>

4th CIRME International Scientific Meeting “Rethinking quality control in the traceability era”

November 30, 2010 - Milano, Italy
www.ifcc.org

57th Congress of the Egyptian Society of Clinical Chemistry

“Latest Advances in Chronic Diseases (Cardiovascular, Diabetes Thyroid Disorders) Laboratory Perspectives”

December 4-5, 2010 - Cairo, Egypt
www.ifcc.org

MEDLAB 2011

24 - 27 Janvier 2011

Dubai International Conention & Exhibition Center
Dubai, EAU
www.arabhealthonline.com/congress/MEDLAB_2010.html

Course on "Laboratory accreditation and ISO 15189”

March 18-19, 2011 - Izmir, Turkey
www.ifcc.org

6th International Conference on Biochemical Markers of Brain Damage - BMBD 2011

May 9-11, 2011 - Lund, Sweden
<http://www.bmbd.org>

XII International Congress of Pediatric Laboratory Medicine (ICPLM)

May 13-15, 2011 - Berlin, Germany
www.icplm2011.org

21st IFCC International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine - Berlin, Germany

19th IFCC-EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine - Berlin

Internationales Congress Centrum - May 15th - 19th, 2011
www.berlin2011.org

European Conference of National Strategies for Chlamydia Trachomatis and Human Papillomavirus

May 26-27, 2011 - Jurmala, Latvia
www.ifcc.org

12th Iranian Congress of Biochemistry and 4th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology

September 6-9, 2011 - Mashhad, Iran
<http://congress12.biochemiran.com/>

**X Congress of the Czech National Society of Clinical
Biochemistry**

September 20-22, 2011 - Pilsen, Czeck Republic
<http://www.sjezdcskb2011.cz/>

Fray International Symposium

December 4-7, 2011 - Cancun, Mexico
www.flogen.com/FraySymposium

**12th International Congress of Therapeutic Drug
Monitoring & Clinical Toxicology**

October 2-6, 2011 - Stuttgart, Germany
www.iatdmct2011.de

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 interference 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.



la Société Tunisienne de Biologie Clinique

Organise un Symposium sur

Les Legionella : De l'environnement à la clinique

Le 4 février 2011

à la Faculté de Médecine de Tunis

Programme :

- 8h30min :** Accueil des participants.
- 9h :** Données tunisiennes et épidémiologie dans le monde *Dr Leila Slim*
- 9h30 min :** Infections à Legionella *Dr Besbes/ Belkhouja*
- 10h :** Discussion
- 10h15 min:** Pause café.
- 10h45 min :** Legionella et environnement *Dr Sophie Jarraud*
- 11h15 min :** Diversité et fitness des Legionella *Dr Sophie Jarraud*
- 11h45 min :** Discussion
- 12h :** Déjeuner
- 14h :** Méthodes de diagnostic : - Diagnostic classique *Dr Asma Ghariani*
- 14h30 min :** Apport des méthodes moléculaires dans le diagnostic et les études Épidémiologiques *Dr Sophie Jarraud*
- 15h :** Enquêtes autour d'un cas de légionellose *Dr Sophie Jarraud*
- 15h30 min:** Pause café
- 16h :** Cas cliniques et partie pratique *Dr Baaboura, Dr Mehiri*

Coordinateurs : Dr E.Mehiri - Laboratoire de Microbiologie EPS A.Mami Ariana -71821822
emna.mehiri@tunet.tn
Dr R.Baaboura - Laboratoire CNGMO Tunis-71565623 - rekaya.bab@gmail.com

Notes

A series of horizontal dotted lines for writing notes.